

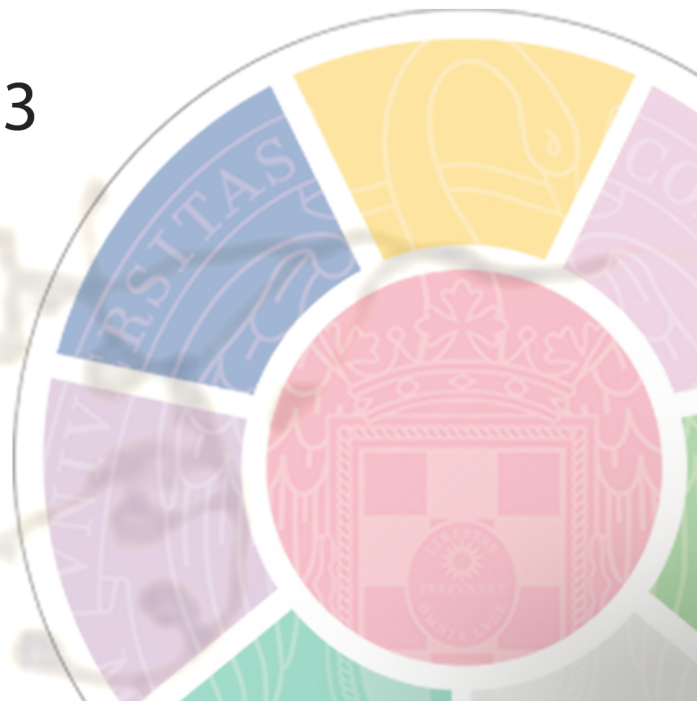


UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE  
MADRID

**XV CONGRESO DE INVESTIGACIÓN  
ESTUDIANTES GRADO CIENCIAS DE LA SALUD**  
**XIX CONGRESO DE CIENCIAS VETERINARIAS Y BIOMÉDICAS**

**TRABAJOS PREMIADOS**

Año 2023





*"Las ideas no duran mucho.  
Hay que hacer algo con ellas"*  
**Santiago Ramón y Cajal**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

XV Congreso de Investigación de Estudiantes de Grado en Ciencias de la Salud.  
XIX Congreso de Ciencias Veterinarias y Biomédicas

TRABAJOS PREMIADOS

EDICIÓN: FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
ISBN: 978-84-09-51425-0



<b>76690</b>	ANSIEDAD EN ODONTOPEDIATRÍA EN NIÑOS DE 4 A 8 AÑOS DE EDAD - ANXIETY IN PEDIATRIC DENTISTRY IN CHILDREN FROM 4 TO 8 YEARS OF AGE	6
<b>76904</b>	"EDUCACIÓN EN SALUD ORAL A INMIGRANTES NORTEAFRICANOS DE MARRUECOS Y ARGELIA"/ "ORAL HEALTH EDUCATION FOR NORTH AFRICAN IMMIGRANTS FROM MOROCCO AND ALGERIA"	13
<b>76951</b>	Estudio sobre la prevalencia de agenesia de terceros molares / Third molars agenesis prevalence study	19
<b>76798</b>	HIPOPLASIA MAXILAR Y OLIGODONCIA ASOCIADAS A MALOCLUSIÓN DE CLASE III EN EL PACIENTE INFANTIL // MAXILLARY HYPOPLASIA AND OLIGODONTIA ASSOCIATED WITH CLASS III MALOCCLUSION IN THE INFANTILE PATIENT	26
<b>76747</b>	ANSIEDAD EN ODONTOPEDIATRÍA EN NIÑOS DE 9 A 14 AÑOS DE EDAD / ANXIETY IN PAEDIATRIC DENTISTRY IN CHILDREN FROM 9 TO 14 YEARS OF AGE	32
<b>76949</b>	PRESERVACIÓN ALVEOLAR CONCENTRADOS PLAQUETARIOS	39
<b>76953</b>	Protocolo clínico para la colocación de un implante PRAMA en el sector estético anterior. Clinical protocol for the placement of a PRAMA implant in the anterior aesthetic sector	46
<b>76967</b>	Técnica del bolsillo perióstico. Reporte de un caso // Periosteal Pocket Flap technique. A case report	53
<b>77039</b>	Efectividad de los simuladores hápticos en el entrenamiento de la destreza manual en Odontología Conservadora. Haptic simulator effectiveness on manual dexterity training in Conservative Dentistry	60
<b>75789</b>	Emulsiones lipídicas y reversión de cardiotoxicidad de bupivacaína versus ropivacaína en un modelo porcino	68
<b>76800</b>	Entamoeba histolytica, ¿uno de los nuestros?; Entamoeba histolytica, one of us?	74
<b>76883</b>	The role of the Type IV CRISPR-Cas accessory protein Csx27 in the regulation of CRISPR-Cas13 mediated anti-viral immunity/ El papel de la proteína accesoria CRISPR-Cas tipo IV Csx27 en la regulación de la inmunidad antiviral mediada por CRISPR-Cas13	80
<b>76670</b>	Uso de nanopartículas liposomales en la reeducación del sistema inmune en diabetes tipo 1 y otras enfermedades autoinmunes. / Liposomal nanoparticles usage for the immune system reeducation in diabetes type 1 and other autoimmune diseases.	87
<b>76796</b>	Transformación por electroporación de Aspergillus niger empleando CRISPR-Cas9   Electroporation-based transformation of Aspergillus niger using CRISPR-Cas9.	97
<b>76808</b>	Efecto ansiogénico de la ghrelina en el teleósteo Carassius auratus. Anxiogenic effect of ghrelin on the teleost Carassius auratus.	103
<b>77042</b>	LA DISRUPCIÓN TEMPORAL DE CB1 ALTERA EL PROGRAMA TRANSCRIPTÓMICO DE LA CORTICOGÉNESIS DEL CÓRTEX PREFRONTAL   TEMPORAL DISRUPTION OF CB1 RECEPTOR ALTERS THE TRANSCRIPTOMIC PROGRAM OF PREFRONTAL CORTEX CORTICOGENESIS	109
<b>77121</b>	Terapia proteica innovadora para la fibrosis quística: el éxito de Kaftrio o Trikafta (ES) // Innovative protein therapy for cystic fibrosis: the success of Kaftrio or Trikafta (EN)	117
<b>76856</b>	Consecuencias de variaciones cromosómicas numéricas en fertilidad: inferencias a partir del estudio del mutante osd1 / Consequences of numerical chromosome variations in fertility: inferences from the study of osd1 mutant	123
<b>76896</b>	Niveles de vitaminas A y E en huevo tras la suplementación con orujo en dieta / Levels of vitamins A and E in eggs after diet supplementation with grape pomace	130
<b>77003</b>	Dinámica estacional y transmisión de Leishmania infantum de la subfamilia Phlebotominae en el parque zoológico Faunia / Seasonal dynamics and Leishmania infantum transmission of the subfamily Phlebotominae in Faunia zoological park	137

77030	Enfermedad renal crónica: modalidades y tratamientos en el desarrollo de un fenotipo secretor senescente (SASP). Chronic kidney disease: modalities and treatments in the development of a senescent secretory phenotype (SASP).	145
76292	EN: Risk of suicide on nursing students after COVID-19 pandemic. ES: Riesgo de suicidio en estudiantes de Enfermería tras la pandemia por COVID-19	152
76840	Estudio transversal del consumo de tabaco en los estudiantes de ciencias de la salud Universidad Complutense. Cross-sectional study of tobacco consumption in students of the area of health sciences at the Complutense University.	159
76831	Corea de Huntington: acercando la fisioterapia a las enfermedades raras. Huntington's disease: a Physical Therapy approach to rare diseases	165
76905	EVOLUCIÓN DE LOS PACIENTES CON FASCITIS PLANTAR TRAS INFILTRACIÓN CON PLASMA RICO EN PLAQUETAS (PRP)./EVOLUTION OF PATIENTS WITH PLANTAR FASCIITIS AFTER PLATELET-RICH PLASMA INFILTRATION (PRP).	172
76644	Desarrollo de un vector de expresión para la sobreexpresión de MYC mediante CRISPR/SAM. Development of an expression vector for MYC overexpression using CRISPR/SAM	181
76805	Prueba de expresión de proteínas amiloides en diferentes cepas de Escherichia coli.	187
76782	Actividad antimicrobiana y antibiopelículas de compuestos nitrogenados aislados de Rubus boliviensis Focke (Khari Khari). Antimicrobial and antibiofilm activities of nitrogenous compounds isolated from Rubus boliviensis Focke (Khari Khari).	194
76986	Identification and analysis of ALS9 allelic variation in C. albicans clinical and commensal strains	201
77022	Síntesis y caracterización de glicopolímeros de hidroxipropilmetilcelulosa funcionalizados con ácido glucurónico mediante Click-Chemistry / Synthesis and characterization of hydroxypropylmethylcellulose glyccopolymers functionalized with glucuronic acid by Click-Chemistry	208
77086	MicroMundo™ y Crónicas Microbianas 2.0: innovación para divulgar la resistencia a los antibióticos	215
77096	Niveles séricos de IgA frente a Anisakis simplex en donantes de la Comunidad de Madrid	221
76720	MTP COMO DIANA TERAPÉUTICA DE LA DISLIPIDEMIA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE RATAS DIABÉTICAS. MTP AS A PROMISING TARGET FOR THE TREATMENT OF DYSLIPIDEMIA IN A LATE-STAGE DIABETIC RAT MODEL	228
76894	Oxidative stress increases in the liver of the offspring of lactating rats exposed to BPA-low-dose - Estrés oxidativo hepático aumenta en la descendencia de ratas expuestas a dosis bajas de BFA	234
76784	Tomografía de Coherencia Óptica en modelos murinos de Alzheimer. Una revisión. / Optical Coherence Tomography in murine models of Alzheimer. A review.	241
76837	ROLE OF LRRK2 IN THE ACTIVITY OF MICROGLIAL CELLS / PAPEL DE LRRK2 EN LA ACTIVIDAD DE LA MICROGLÍA	249
76984	PAPEL DE TPL2 EN MACRÓFAGOS Y SU RELACIÓN CON EL DESARROLLO DE LA ArLD. ROLE OF TPL2 IN MACROPHAGES AND ITS RELATION WITH THE DEVELOPMENT OF ArLD.	256
76329	VÍA VISUAL Y ENFERMEDAD DE ALZHEIMER // VISUAL PATHWAY AND ALZHEIMER'S DISEASE	263
76877	Hidatidosis en Turkana: un estudio epidemiológico de una Enfermedad Tropical Desatendida/ Hydatidosis in Turkana: an epidemiological study of a neglected tropical disease	271
76871	Efecto protector del cannabidiol frente al envejecimiento en hígado - Cannabidiol's protective effect against aging in kidney	278

<b>76799</b>	Efectos antiinflamatorios y antioxidantes de los principales metabolitos fenólicos del café en células 3T3-L1. Anti-inflammatory and antioxidant effects of the main colonic coffee phenols metabolites in 3T3-L1 cells	285
<b>77025</b>	Estudio de asociación genética entre Diabetes Mellitus tipo 1 y Enfermedad Celiaca - Genetic association study between Type 1 Diabetes Mellitus and Celiac Disease	292
<b>76707</b>	EVIDENCIAS CIENTÍFICAS DE LA TERAPIA OCUPACIONAL EN LA RIZARTROSIS. SCIENTIFIC EVIDENCE OF OCCUPATIONAL THERAPY IN RHIZARTHROSIS	299
<b>76770</b>	SCREENING VISUAL A PERSONAS CON TRASTORNO DEL ESPECTRO DEL AUTISMO (TEA) / VISUAL SCREENING OF PEOPLE WITH AUTISM SPECTRUM DISORDER (ASD)	305
<b>76829</b>	SESGOS COGNITIVOS Y CATEGORIZACIÓN EN ANIMALES DE CONSUMO	311
<b>77032</b>	¿Qué son esas voces? Estudio de las bases neurales de las alucinaciones auditivas verbales	318
<b>77106</b>	¿Existe la conservación del número en el ámbito musical? / Does conservation of number exist in music?	325
<b>76648</b>	La toxicidad por aminoglucósidos como un factor limitante en aves. Aminoglycosides toxicity as a limiting factor in birds	333
<b>77078</b>	Efecto del orujo de uva en piensos de gallinas sobre calidad y conservación del huevo/ Effect of grape pomace in hen feed on egg quality and preservation	340
<b>76738</b>	Presencia de comportamientos repetitivos anormales como medida de bienestar en perros de refugio. Presence of abnormal repetitive behaviors as a measure of welfare in shelter dogs.	348

**76690: ANSIEDAD EN ODONTOPEDIATRÍA EN NIÑOS DE 4 A 8 AÑOS DE EDAD - ANXIETY IN PEDIATRIC DENTISTRY IN CHILDREN FROM 4 TO 8 YEARS OF AGE****Área de conocimiento:** ODONTOLOGÍA**Autor(es):** Berta García Soriano, Paloma Sánchez Portillo**Tutor(es):** MARTA BRUNA DEL COJO., CARIDAD ARIAS MACIAS.**Universidad:** universidad CEU San Pablo**Facultad:** Facultad de Medicina**Titulación:** Grado en Odontología**Formato:** Comunicación Oral - Investigación clínica**Palabras Clave:** "miedo dental", "ansiedad dental", "paciente odontopediátrico". "dental fear", "dental anxiety", "pediatric dentistry patient".

El miedo y la ansiedad dental (MAD) incrementados, en el paciente pediátrico, pueden hacer que el paciente sufra, dando lugar a importantes problemas entre el odontólogo, el paciente y su familia. Para detectar y evaluar el MAD de los niños, se ha utilizado la Facial Image Scale (FIS), pudiendo así, garantizar un tratamiento exitoso. En este trabajo se describieron los niveles de MAD de 90 pacientes de entre 4 y 8 años, 42 niñas y 48 niños, de los cuales, solo el 15'6% (14 participantes) presentó MAD en algún momento de la cita. Debido a la importancia del estudio del MAD entre los pacientes de la consulta de Odontopediatria se deberían seguir realizando estudios para poder establecer protocolos de actuación encaminados a ofrecer una mejor atención a nuestros pacientes y ayudar a construir una buena relación de confianza tanto con el niño, como con sus padres.

Increased dental fear and anxiety (DFA) in the pediatric patient can cause the patient to suffer, leading to significant problems between the dentist, the patient and their family. To detect and evaluate DFA in children, the Facial Image Scale (FIS) has been used, thus being able to guarantee successful treatment. In this work, the DFA levels of 90 patients between 4 and 8 years old, 42 girls and 48 boys, were described, of which only 15.6% (14 participants) presented DFA at some point during the appointment. Due to the importance of the study of the DFA among the patients of the Pediatric Dentistry consultation, studies should continue to be carried out in order to establish action protocols aimed at offering better care to our patients and helping to build a good relationship of trust with both the Child and the parents.



## ANSIEDAD EN ODONTOPEDIATRÍA EN NIÑOS DE 4 A 8 AÑOS DE EDAD

### ANXIETY IN PEDIATRIC DENTISTRY IN CHILDREN FROM 4 TO 8 YEARS OF AGE

Nº Identificador del primer autor: BERTA GARCIA SORIANO. b.garcia128@usp.ceu.es

Nº Identificador del segundo autor: PALOMA SANCHEZ PORTILLO. p.sanchez89@usp.ceu.es

Tutor 1: MARTA BRUNA DEL COJO. marta.brunacojo@ceu.es

Tutor 2: CARIDAD ARIAS MACIAS. cmargarita@ceu.es

Afiliaciones: UNIVERSIDAD CEU SAN PABLO. Grado en Odontología. Facultad de Medicina.

Identificador del recibo en Eventos: 1492638

#### **Resumen (Abstract):**

El miedo y la ansiedad dental (MAD) incrementados, en el paciente pediátrico, pueden hacer que el paciente sufra, dando lugar a importantes problemas entre el odontólogo, el paciente y su familia. Para detectar y evaluar el MAD de los niños, se ha utilizado la Facial Image Scale (FIS), pudiendo así, garantizar un tratamiento exitoso. En este trabajo se describieron los niveles de MAD de 90 pacientes de entre 4 y 8 años, 42 niñas y 48 niños, de los cuales, solo el 15'6% (14 participantes) presentó MAD en algún momento de la cita. Debido a la importancia del estudio del MAD entre los pacientes de la consulta de Odontopediatría se deberían seguir realizando estudios para poder establecer protocolos de actuación encaminados a ofrecer una mejor atención a nuestros pacientes y ayudar a construir una buena relación de confianza tanto con el niño, como con sus padres.

**Palabras clave:** *"miedo dental", "ansiedad dental", "paciente odontopediátrico"*.

Increased dental fear and anxiety (DFA) in the pediatric patient can cause the patient to suffer, leading to significant problems between the dentist, the patient and their family. To detect and evaluate DFA in children, the Facial Image Scale (FIS) has been used, thus being able to guarantee successful treatment. In this work, the DFA levels of 90 patients between 4 and 8 years old, 42 girls and 48 boys, were described, of which only 15.6% (14 participants) presented DFA at some point during the appointment. Due to the importance of the study of the DFA among the patients of the Pediatric Dentistry consultation, studies should continue to be carried out in order to establish action protocols aimed at offering better care to our patients and helping to build a good relationship of trust with both the Child and the parents.

**Keywords:** "dental fear", "dental anxiety", "pediatric dentistry patient".

## 1. INTRODUCCION

Todos conocemos los términos de miedo ansiedad y fobia dental, pero, ¿hasta qué punto sabemos diferenciarlos y sabemos controlarlos, en niños, en el gabinete dental?

El miedo dental (MD), se define como un estado de angustia y malestar generalizado en el paciente y va asociado a una situación de desconocimiento. Por ejemplo, cuando asisten por primera vez a la consulta dental y desconocen por completo el ambiente, el odontólogo y el personal auxiliar o cuando le realizan el primer tto invasivo, la primera obturación, la primera extracción... al final ellos no saben lo que van a sentir<sup>1</sup>.

La ansiedad es un mecanismo adaptativo natural que nos permite ponernos alerta ante sucesos comprometidos. Este fenómeno debe entenderse como un concepto multidimensional, que a su vez consta de tres respuestas diferentes por parte del cuerpo: una cognitiva, que afecta a la concentración; una fisiológica, que afecta al sistema nervioso autónomo y una motora, que implica comportamientos poco ajustados que pueden ir desde la evitación hasta el escape de la consulta dental<sup>2</sup>.

La fobia dental (FD) representa un tipo severo de AD. Da como resultado, la evitación del tratamiento dental o la resistencia a este. Interfiere significativamente con la vida diaria.

Consecuencias de que el niño tenga ansiedad<sup>3</sup>:

- Presentar un mayor número de caries por no querer ser tratados.
- Convertirse en pacientes difíciles y requerir más tiempo.
- La resistencia, el retraso o la negativa a la visita al dentista.
- Mayores patologías, tratamientos más invasivos y un coste más elevado.

El objetivo principal de este trabajo es, conocer los niveles de ansiedad y de miedo en niños de 4 a 8 años que acuden al Servicio de Odontología de la Policlínica Universitaria de la Universidad CEU San Pablo durante el periodo de noviembre 2022 a marzo de 2023.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS


- Tipo de estudio: descriptivo, observacional de tipo transversal.
- Población de estudio: pacientes pediátricos de 4 a 8 años de edad
- Criterios de exclusión: pacientes con alguna condición o situación psicológico, ajena a la visita dental, que pueda influir en su nivel de ansiedad. También pacientes con alteración visual y/o cognitiva.
- Tamaño de la muestra: 90 participantes

Para llevar a cabo esta investigación, se diseñó un cuestionario (figura 1), y tras obtener la aprobación del Comité de Ética de Investigación, el 2 de noviembre de 2022, se inicia este proyecto.

Pasos a llevar a cabo:

1. Informar a los responsables legales y obtener su aprobación verbal.
2. Rellenar al cuestionario (edad, sexo, alteraciones visuales, visitas anteriores a otro dentista, tipo de cita).
3. Estado emocional del niño antes y después de la cita.
4. Valorar el comportamiento según la escala de Frankl<sup>4</sup>.

TFG Grado Odontología



Universidad CEU San Pablo

### ANSIEDAD EN ODONTOPEDIATRÍA EN NIÑOS DE 4 A 8 AÑOS DE EDAD

- Los datos recogidos son **anónimos**.

- La participación es completamente **voluntaria**; si no desea hacerlo, su profesional continuará con su atención habitual y su negativa no le traerá ningún inconveniente.

- El profesional rellenará los **datos** sobre: Sexo, Edad (en años), si presenta alguna alteración visual o cognitiva, si ha acudido con ansiedad a otro centro odontológico o médico al que se está realizando la encuesta, el tipo de cita.

- El propósito del estudio es la realización de un **Trabajo de fin de Grado** del Grado de Odontología de la Universidad CEU San Pablo durante el curso 2022-2023, sobre la **valoración del nivel de ansiedad** de los pacientes pediátricos que acuden a la clínica odontológica.

- **Sexo:** V / M      **Edad:** \_\_\_\_\_ AÑOS

- **Alteración visual, cognitiva que le impidiera participar:** SÍ / NO

- **Ha acudido alguna vez al dentista anteriormente?:** SÍ / NO (1ª CITA)

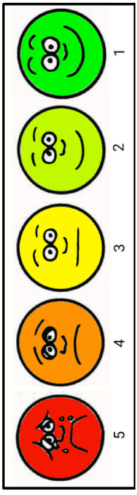
- **Tipo de cita:** Diagnóstico / Revisión / Tratamiento; especificar Nº de cita: 1ª, 2ª, 3ª, 4ª.

Otro: \_\_\_\_\_ / Otra especificar: \_\_\_\_\_

- **FRANKL:** \_\_\_\_\_

1. Satisfacción	Respecto al tratamiento, bien mucho, bien medio o cualquier otra conducta subjetivamente positiva
2. Negativa	Respecto al tratamiento, bien mucho, bien medio o cualquier otra conducta subjetivamente negativa de carácter negativo como podría ser el malhumorado.
3. Pasiva	Antes el tratamiento se veía con preocupación, ahora cuando, ahora se veía a base de indiferencia.
4. Adaptación con dificultad	El niño se adaptó con dificultad, de manera que, según fuera, reacción poco regular en el taller dental.
5. Adaptación con facilidad	El niño se adaptó con facilidad, de manera que, según fuera, reacción poco regular en el taller dental.

ANTES DE LA CITA



AL TERMINAR LA CITA

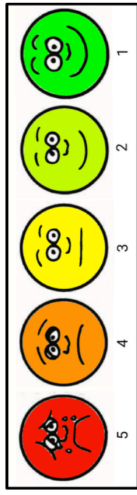


Figura 1. Cuestionario de recogida de datos

### 3. RESULTADOS

El procesamiento de los datos se realizó en una tabla usando Microsoft Excel para Mac.

#### 3.1 Nivel de MAD de los participantes del estudio

El análisis global, mediante las pruebas empleadas, permitió observar que:

- el 15'6 % (14 participantes) de los niños/as del presente estudio manifestó MAD, en algún momento de la cita odontológica.
- el 84'4 % (76 participantes) de los niños/as del presente estudio no manifestó MAD, en ningún momento de la cita odontológica.

#### 3.2 Nivel de MAD según la edad de los pacientes del estudio

El estudio del de MAD de los participantes de nuestro trabajo, según la edad, reveló que:

- el 3'4 % de los niños/as (1 participantes) de 4 a 6 años de edad (29 participantes), expresó MAD.
- el 21'3 % de los niños/as (13 participantes) de 7 y 8 años de edad (61 participantes), expresó MAD

#### 3.3 Nivel de MAD según el sexo de los pacientes del estudio

La observación del MAD de los participantes del presente estudio, según su sexo, manifestó que:

- el 21'4 % (9 participantes) de las niñas (42 participantes) presentó MAD.
- el 10'4 % (5 participantes) de los niños (48 participantes) presentó MAD.

#### 3.4 Nivel de MAD según si habían tenido alguna experiencia dental previa

Del análisis del nivel de MAD, según si los participantes habían tenido o no tenido una experiencia dental previa, se observó que:

- el 14'3 % (9 participantes) de los niños/as que habían tenido una experiencia dental previa (63 participantes), presentó MAD.
- el 22'7 % (5 participantes) de los que no habían tenido una experiencia dental previa (22 participantes), presentó MAD.

### 3.5 Nivel de MAD según el tipo de cita de asistencia dental recibida

Del examen del nivel de MAD, según el tipo de cita de asistencia recibida, se percibió que:

- el 12'5 % (4 participantes) de los niños/as de 1ª cita de diagnóstico (32 participantes), manifestaron MAD.
- el 25 % (1 participantes) de los niños/as de 1ª cita de tratamiento (4 participantes), manifestaron MAD.
- el 20 % (2 participantes) de los niños/as de 2ª cita de tratamiento (10 participantes), manifestaron MAD.
- el 15 % (6 participantes) de los niños/as de otro número de cita de tratamiento (40 participantes), manifestaron MAD.
- el 25 % (1 participantes) de los niños/as de cita de urgencia (4 participantes), manifestaron MAD.

### 3.6 Relación entre el MAD y el grado de colaboración del paciente

El examen del nivel de MAD, según el grado de colaboración del paciente, reveló que:

- el 66'7 % (2 participantes) de los niños/as "1" (3 participantes), según la escala de valoración del comportamiento de Frankl, mostró MAD.
- el 14'3 % (1 participantes) de los niños/as "2" (7 participantes), según la escala de valoración del comportamiento de Frankl, mostró MAD.
- el 21'4 % (6 participantes) de los niños/as "3" (28 participantes), según la escala de valoración del comportamiento de Frankl, mostró MAD.
- el 15'8 % (3 participantes) de los niños/as "4" (19 participantes), según la escala de valoración del comportamiento de Frankl, mostró MAD.
- el 6,1 % (2 participantes) de los niños/as "5" (33 participantes), según la escala de valoración del comportamiento de Frankl, mostró MAD.

### 3.7 Nivel de MAD según el momento de la cita odontológica

El análisis del nivel de MAD, según el momento de cita de asistencia odontológica, reveló que:

- del 84,4 % de los niños/as (76 participantes) que no mostraron MAD al inicio de la cita, ninguno mostró MAD al final de la cita.
- del 15'6 % de los niños/as (14 participantes) que sí mostraron MAD al inicio de la cita:
  - el 78'6 % (11 participantes) no mostraron MAD al final de la cita.
  - el 21'4 % (3 participantes) sí mostraron MAD al final de la cita.

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1 Tipo y Diseño del estudio

Aunque algunos autores han realizado estudios longitudinales para valorar el MAD de sus pacientes y/o poblaciones<sup>5</sup>, la mayoría de los investigadores de los trabajos revisados, al igual que en este trabajo, realizaron un estudio de descriptivo de tipo transversal<sup>6-14</sup>.

### 4.2 Distribución de la muestra

El tamaño de la muestra de los estudios analizados varió de 1.546<sup>13</sup> a 29<sup>6</sup> niños. La muestra del presente estudio estuvo constituida por 90 participantes. Prácticamente todos los trabajos revisados coincidieron en la distribución equitativa por sexo de la muestra<sup>7,9,16,17,22-27</sup>. En este trabajo participaron 48 niños (53'3 %) y 42 niñas (46'7 %).



## 5. CONCLUSIONES

A continuación, se exponen las conclusiones de esta investigación:

1. El 15'6 % de los niños/as de 4 a 8 años que acudieron al Servicio de Odontología de la Universidad CEU San Pablo, manifestaron MAD en algún momento de la cita odontológica.
2. El 3'4 % de los participantes de 4 a 6 años y el 21'3 % de los participantes de 7 y 8 años, presentaron MAD en algún momento de la cita.
3. El 21'4 % de las niñas y el 10'4 % de los niños mostraron MAD en algún momento de la cita.
4. El 14'3 % de los participantes con experiencia dental previa y el 22'7 % sin experiencia dental previa, revelaron MAD en algún momento de la cita.
5. El MAD está presente en la 1ª cita de tratamiento y en las urgencias, con un 25 % ambos.
6. El 66'7 % de los participantes "1", el 14'3 % de los "2", el 21'4 % de los "3", el 15'8 % "4" y el 6'1 % de los "5", según la escala de valoración del comportamiento de Frankl, manifestaron MAD en algún momento de la cita.
7. Un 84'4 % de los participantes no mostró MAD en ningún momento de la cita, y del 15'6 % que si mostro MAD al inicio, solo el 21'4 % mostró también MAD al final de la consulta.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Klinberg G. Dental anxiety and behaviour management problems in paediatric dentistry-a review of background factors and diagnostics. *European archives of paediatric dentistry: official journal of the European Academy of Paediatric Dentistry*. 2008; 11-5.
2. Ríos M, Herrera R, Rojas G. Ansiedad dental: Evaluación y tratamiento. *Av Odontoestomatol*. 2014; 30 (1): 39- 46.
3. Al-Harasi S, Ashley PF, Moles DR, Parekh S, Walters V. Hypnosis for children undergoing dental treatment (Review). *Cochrane Database Syst Rev*. 2010; 4:8.
4. Boj JR, Catalá M, García Ballesta C, Mendoza A, Planells P. *Odontopediatría. L Bebés, niños y adolescentes*. Ed. Odontología Books. 2019
5. Gao S, Lu J, Li P, Yu D, Zhao W. Prevalence and risk factors of children's dental anxiety in China: a longitudinal study. *BMJ Open*. 2021; 11(4): 1-9.
6. Sias Salas SS, Ayala Escandón CL, Pichardo Solís VA. El dibujo como medio de evaluación del miedo/ansiedad en niños de 5 a 8 años en atención dental. Estudio descriptivo. *Revista de Odontopediatría Latinoamericana*. 2018; 8 (2): 179-93.
7. Donoso Delgado LC, Capos Campos KJ. Comparación de tres escalas de ansiedad RMS Pictorial Scale(RMS-PS) Venham Picture Test (VPT) y Facial Image Scale (FIS). *Odontol Pediatr*. 2019; 18 (2): 26-34.
8. Buchanan H, Niven N. Validation of a Facial Image Scale to assess child dental anxiety. *Int J Paediatr Dent*. 2002; 12(1): 47-52.
9. Rodríguez Peinado N, Olmo Boluda R, Mourelle Martínez R, Gallardo López NE. Estudio de la ansiedad infantil ante el tratamiento odontológico. *Gaceta Dental*. 2008; 195: 150-63.
10. Yon MJY, Chen KJ, Gao SS, Duangthip D, Lo ECM, Chu CH. Dental Fear and Anxiety of Kindergarten Children in Hong Kong: A Cross-Sectional Study. *Int J Environ Res Public Health*. 2020; 17(8): 2827.
11. Mautz-Miranda C y cols. Prevalencia de ansiedad dental en niños atendidos en los Servicios de Salud Públicos de Valdivia, Chile. *Odontoestomatología*. 2017; 19(30): 59-64.

12. Marcano AA, Figueredo AM, Orozco G. Evaluación de la ansiedad y miedo en niños escolares en la consulta odontopediátrica. *Revista de Odontopediatría Latinoamericana*. 2012; 2(2): 65-71.
13. Alsatat FA, El-Housseiny AA, Alamoudi NM, Elderwi DA, Ainoso AM, Dardeer FM. Dental fear in primary school children and its relation to dental caries. *Niger J Clin Pract*. 2018; 21(11): 1454-60.
14. Carrillo-Díaz, M., Migueláñez-Medrán, B. C., Nieto-Moraleda, C., Romero-Maroto, M., & González-Olmo, M. J. ¿How Can We Reduce Dental Fear in Children? The Importance of the First Dental Visit. *Children (Basel, Switzerland)*. 2021; 8(12): 1167.
15. Lee, C. Y, Chang, Y. Y, & Huang, S. T. Prevalence of dental anxiety among 5- to 8-year-old Taiwanese children. *Journal of public health dentistry*. 2007; 67(1): 36-41.
16. Wong DL, Baker CM. Pain in children: comparison of assessment scales. *Pediatr Nurs*. 1988; 14(1): 9-17.
17. Gao S, Lu J, Li P, Yu D, Zhao W. Prevalence and risk factors of children's dental anxiety in China: a longitudinal study. *BMJ Open*. 2021; 11(4): 1-9.
18. Raadal, M.; Milgrom, P.; Weinstein, P.; Mancl, L.; Cauce, A.M. The Prevalence of Dental Anxiety in Children from Low-income Families and its Relationship to Personality Traits. *Journal of Dental Research*. 1995; 74(8): 1439-43.
19. Gonzalo Rojas Alcayaga; Paola Harwardt Montalva; André Sassenfeld Jonquera; Yerko Molina Muñoz; Andrea Herrera Ronda; Matías Ríos Erazo; Clara Misrachi Launert. Eficacia de las técnicas de percepción de control y relajación en la reducción de ansiedad dental. *Acta Odontológica Venezolana*. 2011; Volumen 49, No. 4.
20. KILINÇ, Gulser et al. Evaluation of children's dental anxiety levels at a kindergarten and at a dental clinic. *Brazilian Oral Research*. 2016, v. 30, n. 1, e72.
21. De Menezes Abreu DM, Leal SC, Mulder J, Frencken JE. Dental anxiety in 6-7-year-old children treated in accordance with conventional restorative treatment, ART and ultra-conservative treatment protocols. *Acta Odontol Scand*. 2011; 69(6): 410-6.
22. Cianetti S, Lombardo G, Lupatelli E, Pagano S, Abraha I, Montedori A, et al. Dental fear/anxiety among children and adolescents. A systematic review. *Eur J Paediatr Dent*. 2017; 18(2): 121-30.
23. Clinical Affairs Committee-Behavior Management Subcommittee, American Academy of Pediatric Dentistry. Guideline on Behavior Guidance for the Pediatric Dental Patient. *Pediatric Dentistry Reference Manual*. 2016 – 2017; 38(6): 185-98.
24. Clinical Affairs Committee-Behavior Management Subcommittee, American Academy of Pediatric Dentistry. Guideline on Behavior Guidance for the Pediatric Dental Patient. *Pediatric Dentistry Reference Manual*. 2016 – 2017; 38(6): 185-98.
25. Tiwari S, Kulkarni P, Agrawal N, Mali S, Kale S, Jaiswal N. Dental Anxiety Scales Used in Pediatric Dentistry: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Contemp Dent Pract*. 2021; 22(11): 1338-45.
26. Humphris GM, Morrison T, Lindsay SJ. The Modified Dental Anxiety Scale: validation and United Kingdom norms. *Community Dent Health*. 1995; 12(3): 143-50.
27. Nilsson S, Buchholz M, Thunberg G. Assessing Children's Anxiety Using the Modified Short State-Trait Anxiety Inventory and Talking Mats: A Pilot Study. *Nurs Res Pract*. 2012; 2012:932570.

**76904: "EDUCACIÓN EN SALUD ORAL A INMIGRANTES NORTEAFRICANOS DE MARRUECOS Y ARGELIA" / "ORAL HEALTH EDUCATION FOR NORTH AFRICAN IMMIGRANTS FROM MOROCCO AND ALGERIA"****Área de conocimiento:** ODONTOLOGÍA**Autor(es):** Celeste María Muelas Yunta, Marta Zavala Chulilla, Martín Domínguez Aguado, Carolina Costales Moreno**Tutor(es):** José Francisco Martín Morales, María del Rosario Garcillán Izquierdo**Universidad:** Universidad Complutense de Madrid**Facultad:** Facultad de Odontología**Titulación:** Grado en Odontología**Formato:** Póster - Revisiones bibliográficas**Palabras Clave:** "Salud oral", "Higiene oral", "Inmigrantes", "Jóvenes". "Oral health", "Oral hygiene", "Immigrants", "Youth".**RESUMEN**

Los jóvenes inmigrantes que viven en España se enfrentan a importantes retos en sus necesidades de atención a su salud general y oral debido a múltiples dificultades, entre ellas las barreras culturales y lingüísticas. Por lo tanto, es crucial que a los jóvenes migrantes en España se les instruya y eduque en la importancia de la salud oral y reciban la atención odontológica necesaria para mantener una adecuada salud bucal. Este trabajo está basado en la experiencia obtenida al presentar a este colectivo una charla de educación en salud odontológica, junto con la cumplimentación de un cuestionario sobre salud oral, antes y después de realizar la charla. En base a los resultados extraídos de nuestra encuesta y de la bibliografía revisada y, dado el importante flujo migratorio hacia nuestro país de inmigrantes norteafricanos, concluimos que los Programas Preventivos en salud oral dirigidos a este colectivo específico son necesarios e imprescindibles.

**ABSTRACT**

Young immigrants living in Spain face significant challenges in accessing general and oral healthcare due to multiple difficulties, including cultural and language barriers. Therefore, it is crucial to provide them with an appropriate education on the importance of oral health and to ensure that young migrants receive necessary dental care to maintain adequate oral health. This study is based on the experience gained from presenting a dental health education talk to this group, together with the completion of a questionnaire on oral health, before and after giving the talk. Based on the results extracted from our survey and from the reviewed bibliography, and given the significant migratory flow of North African immigrants to our country, we conclude that Preventive Programs in oral health aimed at this specific group are necessary and essential.

## **EDUCACIÓN EN SALUD ORAL A INMIGRANTES NORTEAFRICANOS DE MARRUECOS Y ARGELIA**

1509978, Celeste M<sup>a</sup> Muelas Yunta, [cmuelas@ucm.es](mailto:cmuelas@ucm.es)

1512706, Marta Zavala Chulilla, [martazav@ucm.es](mailto:martazav@ucm.es)

1512708, Martín Domínguez Aguado, [martindo@ucm.es](mailto:martindo@ucm.es)

1514843, Carolina Costales Moreno, [ccostale@ucm.es](mailto:ccostale@ucm.es)

Tutor: José Francisco Martín Morales, [josefrma@ucm.es](mailto:josefrma@ucm.es)

Tutora: María del Rosario Garcillán Izquierdo, [mrgarcil@ucm.es](mailto:mrgarcil@ucm.es)

Afiliaciones: Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Odontología.

### **RESUMEN**

Los jóvenes inmigrantes que viven en España se enfrentan a importantes retos en sus necesidades de atención a su salud general y oral debido a múltiples dificultades, entre ellas las barreras culturales y lingüísticas. Por lo tanto, es crucial que a los jóvenes migrantes en España se les instruya y eduque en la importancia de la salud oral y reciban la atención odontológica necesaria para mantener una adecuada salud bucal. Este trabajo está basado en la experiencia obtenida al presentar a este colectivo una charla de educación en salud odontológica, junto con la cumplimentación de un cuestionario sobre salud oral, antes y después de realizar la charla. En base a los resultados extraídos de nuestra encuesta y de la bibliografía revisada y, dado el importante flujo migratorio hacia nuestro país de inmigrantes norteafricanos, concluimos que los Programas Preventivos en salud oral dirigidos a este colectivo específico son necesarios e imprescindibles.

Palabras clave: "Salud oral", "Higiene oral", "Inmigrantes", "Jóvenes".

### **ABSTRACT**

Young immigrants living in Spain face significant challenges in accessing general and oral healthcare due to multiple difficulties, including cultural and language barriers. Therefore, it is crucial to provide them with an appropriate education on the importance of oral health and to ensure that young migrants receive necessary dental care to maintain adequate oral health. This study is based on the experience gained from presenting a dental health education talk to this group, together with the completion of a questionnaire on oral health, before and after giving the talk. Based on the results extracted from our survey and from the reviewed bibliography, and given the significant migratory flow of North African immigrants to our country, we conclude that Preventive Programs in oral health aimed at this specific group are necessary and essential.

Keywords: "Oral health", "Oral hygiene", "Immigrants", "Youth".



## 1. INTRODUCCIÓN

La salud oral es un aspecto fundamental para el bienestar general de las personas. Los jóvenes inmigrantes que viven en España se encuentran en situación de vulnerabilidad, exclusión social y sufren desigualdades sociales en salud, presentan peores condiciones de vida y de trabajo que se manifiestan en la salud en general, y en su salud dental en particular. Las barreras culturales y lingüísticas, así como la falta de acceso a la atención médico-odontológica adecuada agravan esta situación. (2)

La falta de atención dental apropiada puede llevar a una serie de problemas de salud, desde la caries dental y enfermedades periodontales, hasta problemas más graves, como infecciones y enfermedades sistémicas. Por lo tanto, es crucial que los jóvenes migrantes en España reciban educación en salud oral y comprendan la importancia de ésta y se les facilite, por parte de los poderes públicos sanitarios, el acceso a esta atención necesaria para su bienestar físico, psicológico y social, de tal manera que puedan mantener una vida saludable en todos los aspectos.

Nuestros **OBJETIVOS** son informar sobre la importancia de la salud oral a un grupo de jóvenes norteafricanos provenientes de Marruecos y Argelia debido a la baja atención asistencial que esta población recibe y constatar la importancia de realizar programas preventivos específicos.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio ha sido desarrollado en la ONG española "CEPAIM", Fundación que promueve una sociedad intercultural e igualitaria donde las personas más vulnerables tengan pleno acceso a sus derechos de ciudadanía, entre ellos el acceso a la salud. Esta ONG ofrece un recurso residencial, cobertura de las necesidades básicas y acompañamiento socioeducativo integral.

En dicha Fundación realizamos una charla de promoción de la salud oral donde voluntariamente participaron 14 jóvenes, 10 procedentes de Marruecos y 4 de Argelia. Antes y después de la charla se administra un cuestionario "ad hoc" con preguntas relacionadas con la salud oral.

Además, se ha realizado una búsqueda bibliográfica de los estudios afines publicados, utilizando los siguientes buscadores bibliográficos: Pubmed, Medline, Cochrane y Sci-hub. Se han escogido aquellas publicaciones escritas tanto en español como en inglés, usando como palabras clave: "salud oral", "técnicas de higiene oral", "inmigrantes" y "jóvenes".

Criterios de inclusión: jóvenes entre los 18 y 25 años con o sin patologías previas que sean inmigrantes en España y Criterios de exclusión: artículos con más de 10 años de antigüedad.

## 3. RESULTADOS

En la ONG, "CEPAIM", se citó voluntariamente a los inmigrantes residentes para distribuir un cuestionario "ad hoc", dividido en 3 apartados, para que lo cumplimentasen antes y después de ofrecerles una charla sobre salud oral.

Los resultados obtenidos del primer apartado del cuestionario son los siguientes:

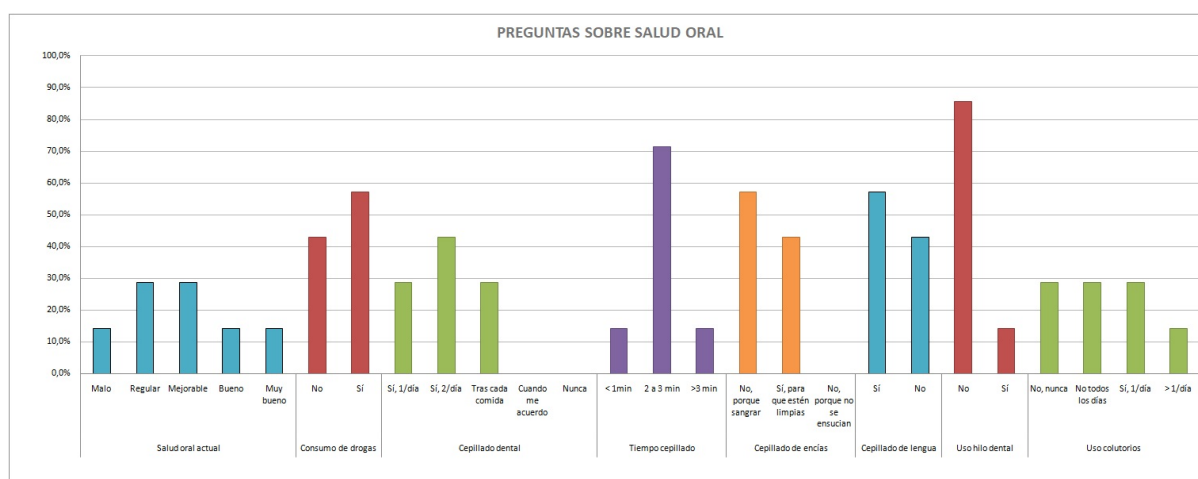
La totalidad de los encuestados considera que la salud oral es muy importante, ya que todos referían dolor en boca en algún momento de su vida, y para resolver este dolor el 71.4% acudieron al odontólogo, mientras que el resto, toleraron el dolor o tomaron medicación sin prescripción.

En cuanto al cepillado, todos afirman que saben cepillarse correctamente los dientes y que se debe cambiar el cepillo frecuentemente, además reseñan que el objetivo del cepillado es la eliminación de bacterias y restos de comida.

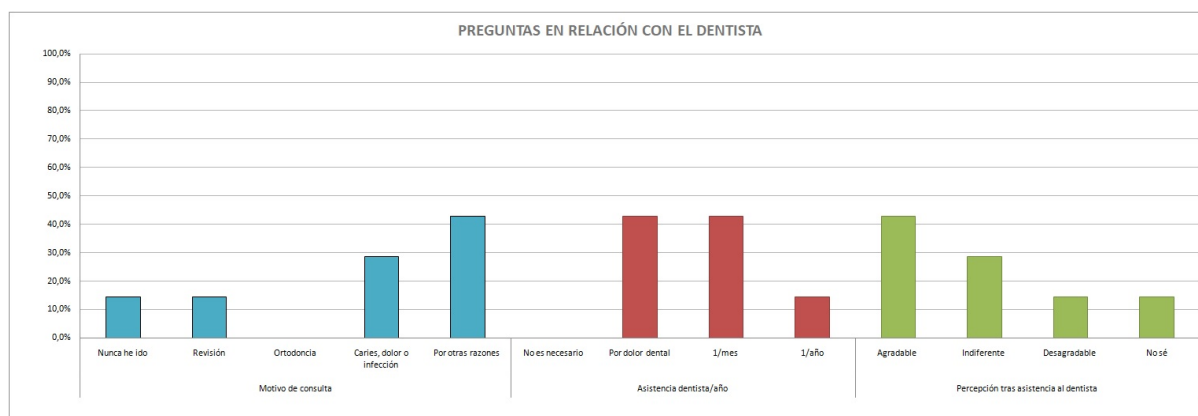
Con respecto al sangrado de las encías, todos ellos afirman que les sangran, considerando que el sangrado es normal el 57.1% y el resto que no lo es. Todos desconocen que es tener gingivitis.

Con respecto al consumo de drogas (en las que se incluye tabaco, alcohol, cannabis, entre otras) algo menos de la mitad, no consume nada, pero el 57.1% sí consumen, siendo un 28.5% consumidores de tabaco, 14.2% de cachimba y 14,2% de cannabis.

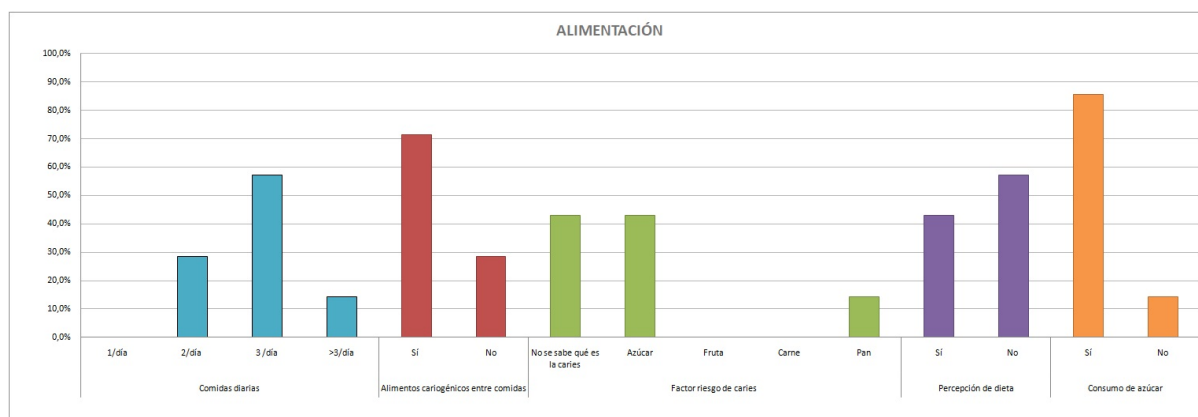
El resto de las respuestas sobre salud oral general, se contemplan en la siguiente Tabla 1:



El segundo apartado del cuestionario, fueron preguntas para conocer la relación que los participantes tienen con el odontólogo. El 14.2% nunca ha ido al dentista, frente al 85.6% que han acudido en los últimos 6 meses, siendo estos mismos porcentajes los que acudieron alguna vez al odontólogo en su país de origen. Con relación a la necesidad de acudir al dentista cada año, menos de la mitad considera que hay que acudir sólo cuando le duelen los dientes. (Tabla 2)



El último apartado del cuestionario expresado en la Tabla 3 fue sobre los hábitos alimenticios. En este, todos los encuestados respondieron que se cepillan los dientes a pesar de no haber desayunado además de:



Tras la charla, en la que explicamos la importancia de la higiene oral, los hábitos nocivos y los factores predeterminantes para padecer enfermedades como la caries dental y las enfermedades periodontales, entregamos el cuestionario, de nuevo, para comprobar los conocimientos adquiridos tras la presentación y los resultados fueron los siguientes:

La totalidad de los jóvenes opina que es importante acudir al dentista, la necesidad de cepillarse dientes, encía y lengua durante 2-3 minutos y que el cambio del cepillo es necesario realizarlo cada tres meses. Todos ya conocen, también, que no es saludable tomar dulces y refrescos entre comidas. Por el contrario, tras la charla, más de la mitad sigue considerando que el sangrado de encías es normal, casi el 30% que sólo acudirían al dentista cuando tienen dolor y el 15% que la ingesta de fruta es un hábito cariogénico.

#### 4. DISCUSIÓN

Tras analizar los resultados observamos que, después del atento seguimiento de la charla por el grupo de inmigrantes, las respuestas al cuestionario son mucho más precisas que las contestaciones al cuestionario realizado al principio, por lo que podemos asegurar que la educación sanitaria oral es imprescindible para este colectivo.

Los inmigrantes en España se encuentran en una situación de desigualdad debido a múltiples factores como las barreras lingüísticas, culturales y el menor apoyo social, entre otros. Como consecuencia, no suelen tener acceso a la información y educación sanitaria, lo cual repercute de manera directa en el estado de salud oral que presentan. El estudio de Rodríguez E. y cols (2) sobre inmigrantes en España es coincidente con el nuestro en cuanto al menor acceso que tiene esta población a la sanidad y la necesidad de ofrecer mayor cobertura a este colectivo.

Al igual que nosotros, Klein J y Lauritano D., en sus respectivas publicaciones, encontraron que la utilización del sistema de salud en personas inmigrantes en Alemania es significativamente más baja que en personas autóctonas, esto, apuntan, se puede deber a diferencias en las necesidades, preferencias o información. (3,4)

En la revisión sistemática realizada por Pabbla A. y cols (5) llegan a la conclusión, al igual que nosotros, que la población inmigrante acude en menor medida a los servicios sanitarios que los autóctonos, pero ellos encuentran que la utilización de los servicios de emergencia es superior en los primeros. Todas estas afirmaciones apoyan nuestra hipótesis sobre la situación desigual con respecto a los inmigrantes en países europeos.

Por otro lado, en un estudio sobre población inmigrante en EEUU desarrollado por Dahlan R. et al. (6), se llega a la conclusión que los inmigrantes, que experimentan el apoyo social del gobierno y de su entorno cercano, mejoran su estado de salud bucal.

Comparando hábitos de higiene oral de nuestra muestra con datos obtenidos en la última Encuesta de Salud Oral 2015 en España (1), vemos que, en cuanto a la frecuencia de cepillado, el 70% de los autóctonos lo realizan más de una vez al día, mientras que en nuestra muestra es el 42,9%. Otro dato comparado es la presencia de dolor dental alguna vez en su vida, en nuestra muestra el 100% afirmaba que sí, sin embargo, en la referida encuesta el 87% indicaba que nunca lo había padecido. El 54% de los encuestados en salud oral en España con 15 años presentan gingivitis, mientras que el 100% de nuestros encuestados nos indican que al cepillarse los dientes les sangran las encías.

## 5. CONCLUSIONES

- 1.- Los inmigrantes están sometidos a un alto nivel de estrés debido a su nivel socioeconómico, barrera lingüística, cultura, autopercepción de salud, conocimientos de salud, educación, etc.
- 2.- La Salud general y, especialmente, la oral es más deficiente en la población inmigrante.
- 3.- La asistencia al odontólogo es baja por parte de esta población.
- 4.- Concluimos que es necesario realizar programas preventivos de salud bucodental para inmigrantes.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Bravo Perez M, Erich Silla JM, Ausina Marquez V, Aviles Gutierrez P, Blanco Gonzalez JM. Encuesta de salud oral en España 2015. RCOE. junio de 2016;21(1):41.
2. Rodríguez Álvarez E, González-Rábago Y, Bacigalupe A, Martín U, Lanborena Elordui N. Inmigración y salud: desigualdades entre la población autóctona e inmigrante en el País Vasco. Gac Sanit. julio de 2014;28(4):274-80.
3. Klein J, von dem Knesebeck O. Inequalities in health care utilization among migrants and non-migrants in Germany: a systematic review. Int J Equity Health. diciembre de 2018;17(1):160.
4. Lauritano D, Moreo G, Carinci F, Campanella V, Della Vella F, Petruzzi M. Oral Health Status among Migrants from Middle- and Low-Income Countries to Europe: A Systematic Review. Int J Environ Res Public Health. 20 de noviembre de 2021;18(22):12203.
5. Pabbla A, Duijster D, Grasveld A, Sekundo C, Agyemang C, van der Heijden G. Oral Health Status, Oral Health Behaviours and Oral Health Care Utilisation Among Migrants Residing in Europe: A Systematic Review. J Immigr Minor Health. abril de 2021;23(2):373-88.
6. Dahlan R, Ghazal E, Saltaji H, Salami B, Amin M. Impact of social support on oral health among immigrants and ethnic minorities: A systematic review. Kamperman AM, editor. PLOS ONE. 20 de junio de 2019;14(6):e0218678.



**76951: Estudio sobre la prevalencia de agenesia de terceros molares / Third molars agenesis prevalence study****Área de conocimiento:** ODONTOLOGÍA**Autor(es):** Bixia Gao**Tutor(es):** María Isabel Leco Berrocal, Carmen López Carriches**Universidad:** Universidad Complutense de Madrid**Facultad:** Facultad de Odontología**Titulación:** Grado en Odontología**Formato:** Póster - Investigación clínica**Palabras Clave:** Agenesia; Terceros molares; Prevalencia / Agensis; Third molars; Prevalence**Resumen:**

El desarrollo de los terceros molares surge de la interacción entre la lámina dental ectodermal y el mesénquima de los maxilares, entre los 5 o 6 años de vida extrauterina y son radiográficamente visibles a los 8 y 9 años. Cualquier factor que interrumpa dicho proceso de formación dará lugar a numerosas alteraciones entre las que se encuentran las agenesias.

Mediante este estudio se quiere estudiar la prevalencia de la agenesia de terceros molares, mediante radiografías panorámicas y comparar la prevalencia según, el sexo, el número y la localización. Para ello se estudió a pacientes que acudieron a la Clínica Odontológica Complutense de entre 10 y 14 años, no sindrómicos y que tuvieran radiografías panorámicas. El registro de datos se realizó en una ficha para cada caso, la cual incluyó datos demográficos de la muestra, edad y sexo.

De las 250 radiografías panorámicas estudiadas, 56 pacientes mostraron agenesias de terceros molares, lo cual representa el 22,4% de la población estudiada. Siendo 37 de ellos mujeres (14,8%) y 19 hombres (7,6%). Por otro lado, las agenesias en un solo tercer molar fueron las más frecuentes, representando el 35,71%. Por último, la localización maxilar es donde se presentó la mayor prevalencia de agenesia de terceros molares.

El estudio de las agenesias es importante, debido a que muchas veces están asociadas a otras muchas anomalías dentarias.

**Abstract:**

The development of the third molars emerges from the interaction between the ectodermal dental lamina and the jaws mesenchyme between 5 or 6 years of extrauterine life and they are radiographically visible at 8 and 9 years of age. Any factor that interrupts this formation process will give rise to numerous alterations, among which are agenesis. Through this study we want to study the prevalence of agenesis of third molars, through panoramic radiographs and compare the prevalence according to sex, number and location. For this, non-syndromic patients who attended the Complutense Dental Clinic between the ages of 10 and 14, and who had panoramic radiographs, were studied. The data was recorded in a file for each case, which included demographic data of the sample, age and sex.

Of the 250 panoramic radiographs of the patients studied, 56 people showed agenesis of third molars, which represents 22.4% of the population studied. Being 37 of them women (14.8%) and 19 men (7.6%). On the other hand, agenesis in a single third molar was the most frequent, representing 35.71%. Finally, the maxillary location is where the highest prevalence of agenesis of third molars occurred.

The study of agenesis is important, because they are often associated with many other dental anomalies.

## Estudio sobre la prevalencia de agenesia de terceros molares

### Third molars agenesis prevalence study

1461959, Bixia Gao, [bixiagao@ucm.es](mailto:bixiagao@ucm.es)

**Tutor 1:** María Isabel Leco Berrocal, [mileco@ucm.es](mailto:mileco@ucm.es)

**Tutor 2:** Carmen López Carriches, [maclopez@pdi.ucm.es](mailto:maclopez@pdi.ucm.es)

**Afiliación:** Facultad de odontología de la Universidad Complutense de Madrid

#### Resumen:

El desarrollo de los terceros molares surge de la interacción entre la lámina dental ectodermal y el mesénquima de los maxilares, entre los 5 o 6 años de vida extrauterina y son radiográficamente visibles a los 8 y 9 años. Cualquier factor que interrumpa dicho proceso de formación dará lugar a numerosas alteraciones entre las que se encuentran las agenesias.

Mediante este estudio se quiere estudiar la prevalencia de la agenesia de terceros molares, mediante radiografías panorámicas y comparar la prevalencia según, el sexo, el número y la localización. Para ello se estudió a pacientes que acudieron a la Clínica Odontológica Complutense de entre 10 y 14 años, no sindrómicos y que tuvieran radiografías panorámicas. El registro de datos se realizó en una ficha para cada caso, la cual incluyó datos demográficos de la muestra, edad y sexo.

De las 250 radiografías panorámicas estudiadas, 56 pacientes mostraron agenesias de terceros molares, lo cual representa el 22,4% de la población estudiada. Siendo 37 de ellos mujeres (14,8%) y 19 hombres (7,6%). Por otro lado, las agenesias en un solo tercer molar fueron las más frecuentes, representando el 35,71%. Por último, la localización maxilar es donde se presentó la mayor prevalencia de agenesia de terceros molares.

El estudio de las agenesias es importante, debido a que muchas veces están asociadas a otras muchas anomalías dentarias.

#### Abstract:

The development of the third molars emerges from the interaction between the ectodermal dental lamina and the jaws mesenchyme between 5 or 6 years of extrauterine life and they are radiographically visible at 8 and 9 years of age. Any factor that interrupts this formation process will give rise to numerous alterations, among which are agenesis.

Through this study we want to study the prevalence of agenesis of third molars, through panoramic radiographs and compare the prevalence according to sex, number and location. For this, non-syndromic patients who attended the Complutense Dental Clinic between the ages of 10 and 14, and who had panoramic radiographs, were studied. The data was recorded in a file for each case, which included demographic data of the sample, age and sex.

Of the 250 panoramic radiographs of the patients studied, 56 people showed agenesis of third molars, which represents 22.4% of the population studied. Being 37 of them women (14.8%) and 19 men (7.6%). On the other hand, agenesis in a single third molar was the most frequent, representing 35.71%. Finally, the maxillary location is where the highest prevalence of agenesis of third molars occurred.

The study of agenesis is important, because they are often associated with many other dental anomalies.

**Palabras claves:** Agenesia; Terceros molares; Prevalencia / Agenesis; Third molars; Prevalence

## **Introducción**

Los dientes de cada individuo son distintos, presentando variaciones en cuanto a su formación, morfología y erupción, principalmente en los terceros molares (Shah y Parekh, 2014).

El desarrollo de los terceros molares tiene lugar alrededor de los 5 o 6 años de vida extrauterina, cuando interaccionan la lámina dental ectodermal con el mesénquima de los maxilares (Scheuer y Black, 2020; Kwon y Jiang, 2018). Todos los factores, incluyendo los genéticos, evolutivos y ambientales, que alteran este proceso, conducen a problemas (Masood y Benavides, 2018) como la agenesia, que es la ausencia dentaria congénita o adquirida y puede presentarse como un caso aislado o asociada a un síndrome (Kolenc-Fusé, 2004) o factores locales o sistémicos (Masood y Benavides, 2018); alteraciones en el tamaño, como la microdoncia o macrodoncia, producidos por fallos en la morfogénesis dentaria durante los periodos de casquete y campana (Kwon y Jiang, 2018), y alteraciones en la erupción, como la inclusión, retención o impactación (Valmaseda-Castellón, et al., 1999).

El problema de la erupción de los terceros molares se debe a su posición (Kumar, et al., 2014). Los superiores tienen una dirección hacia vestibular y distal, mientras que los inferiores la mayoría no consiguen una buena oclusión, debido a su localización en el ángulo mandibular y no son clínicamente visibles (Williams y Ceen, 1982; Alkhuraiji, 2019).

Los terceros molares son radiológicamente visibles entre los 8 y 9 años (Bolaños, et al., 2003), aunque erupcionan entre los 18 y 25 años, y no es hasta los 25 años cuando se terminan de mineralizar los ápices.

En la actualidad, no hay ninguna teoría evolutiva de la agenesia comprobada; pero, la más aceptada es la basada en la evolución dentaria. Esta teoría indica que la disminución de la demanda de las fuerzas masticatorias es lo que ha causado una reducción del tamaño de los músculos masticatorios y los maxilares. Así como la tendencia de que dejen de formarse algunos dientes (Silvestri y Singh, 2003; Carter, 2016).

Es importante estudiar la presencia de agenesia debido a que está muchas veces se asocia a otras anomalías dentales, como microdoncias (Garn y Lewis, 1970), malposiciones de caninos (Camilleri, 2005), erupción ectópica de primeros molares permanentes, infraerupción de molares deciduos (Bjerklin, et al., 1992).

## **Objetivos**

Determinar la prevalencia de agenesia de terceros molares, mediante radiografías panorámicas y analizar si existen diferencias según, el sexo, el número y la localización.

## **Material y métodos**

Estudio observacional en pacientes que acudieron a la Clínica Odontológica Complutense con edades comprendidas entre los 10 y 14 años, no sindrómicos y que tuvieran radiografía panorámica.

Se evaluó la presencia o ausencia de cada uno de los terceros molares para determinar la agenesia congénita de aquellos dientes. Para ello se consideró que no hubiera evidencia radiográfica de mineralización de la corona y, en el caso de que no existiera tal evidencia y se contará con radiografías panorámicas tomadas posteriormente, se procedió a examinarlas para determinar si efectivamente se trataba de un caso de agenesia. Además, se comprobó que los terceros molares no hubieran sido extraídos, mediante la revisión de historias clínicas.

El registro de datos se realizó en una ficha para cada caso, la cual incluyó datos demográficos de la muestra, edad y sexo.

## Resultados

Se analizó una población de 250 pacientes de edades comprendidas entre 10,04 y 14,84 años (media de 12,38 años) entre mujeres y hombres, obteniendo los valores reflejados en la Tabla 1. La prevalencia de agenesia de terceros molares en la población analizada ha sido del 22,4%. Según los resultados obtenidos, el 14,8% de las mujeres presentaron agenesia, frente al 7,6% de los hombres. Concluyendo que la agenesia de los terceros molares es más frecuente en mujeres en pacientes de entre 10 y 14 años (Tabla 1).

<b>Tabla 1. Distribución de la muestra según el sexo</b>			
	<b>Mujer</b>	<b>Hombre</b>	<b>Total</b>
Radiografías panorámicas analizadas (n)	138	112	250
Porcentaje de radiografía panorámicas analizadas	55,2%	44,8%	100%
Número de pacientes con agenesia en los terceros molares (n)	37	19	56
Porcentaje de pacientes con agenesia de terceros molares	14,8%	7,6%	22,4%

El análisis del número de agenesias por paciente mostró que el 35,71% de los pacientes presentaron una agenesia, seguido de del 26,79% que presentaron dos o cuatro agenesias de terceros molares, siendo menos frecuente la agenesia de tres molares (10,71%) (Tabla 2).

<b>Tabla 2. Prevalencia de pacientes con agenesias de terceros molares según el número</b>					
	Agenesia en un tercer molar	Agenesia en dos terceros molares	Agenesia en tres terceros molares	Agenesia en cuatro terceros molares	Agenesia de al menos uno de los terceros molares
Valor numérico (n)	20	15	6	15	56
Porcentaje	35,71%	26,79%	10,71%	26,79%	100%

El número total de molares que presentaron agenesia fue de 128, el 60,15% (77) de localización maxilar y el 39,85% (51) de localización mandibular (Tabla 3).

<b>Tabla 3. Prevalencia de agenesia de terceros molares según localización</b>			
	Maxilar	Mandíbula	Total
Valor numérico (n)	77	51	128
Porcentaje	60,15%	39,85%	100%

## Discusión

Los resultados obtenidos concuerdan con los estudios realizados en diferentes poblaciones, como las investigaciones de Gómez de Diego et al. (2017), García Hernández et al. (2008), Hattab et al. (1995), John et al. (2012), San Román et al. (2018) y Huang et al. (2017), mostrando una prevalencia de agenesia de terceros molares en aproximadamente la cuarta parte de la población. Destacar que hay cierta discrepancia entre un estudio realizado en las poblaciones latinoamericanas (García-Hernández et al., 2008; San Román et al., 2018) que presentaron una prevalencia de agenesia de terceros molares de un promedio de 26,03% que no concuerda con el estudio, realizado en una población japonesa, que indica una prevalencia del 41,70% (Hirakata et al., 2016). Esto se podría deber, según Carter & Worthington (2015), a que los individuos asiáticos tienen mayor prevalencia de agenesia de terceros molares. Exponiendo la posibilidad de que el factor demográfico fuera un determinante de la ausencia congénita de terceros molares.

La agenesia de terceros molares se presentó con una frecuencia estadísticamente mayor en los dientes maxilares en la muestra total. Estos resultados estarían respaldados por los estudios de Goyal et al. (2016) y Singh et al. (2017), que detallaron que los terceros molares maxilares presentan agenesia más frecuentemente que los mandibulares.

La prevalencia de agenesia de terceros molares en mujeres fue mayor que en hombres en la muestra total. Los resultados de la muestra total estarían respaldados por los estudios previos realizados por Celikoglu et al. (2010), García Hernández et al. (2008) y John et al. (2012). Carter & Worthington (2015) exponen que las mujeres presentan una frecuencia de agenesia de terceros molares mucho mayor que los hombres a causa de un tamaño reducido de los maxilares. Sin embargo, existe la posibilidad que en muestras de diferentes procedencias y en las que exista mayor cantidad de individuos de sexo masculino se encuentren resultados diferentes.

### **Conclusión**

La agenesia de terceros molares afecta a cerca de un cuarto de la población. siendo más frecuente la ausencia de un tercer molar, en mujeres que en hombres y la localización maxilar.

### **Bibliografía**

1. Alkhurairi A. Theories that underlie the prevalence of third molar impaction: New theory. Saudi Dent J. 2019;31:576-82
2. Bjerklin K, Kurol J, Valentin J. Ectopic eruption of maxillary first permanent molars and association with other tooth and developmental disturbances. Eur J Orthod 1992 Oct;14(5):369-75.
3. Bolaños MV, Moussa H, Manrique MC, Bolaños MJ. Radiographic evaluation of third molar development in Spanish children and young people. Forensic Sci Int. mayo de 2003;133(3):212-9.
4. Camilleri S. Maxillary canine anomalies and tooth agenesis. Eur J Orthod 2005 Oct;27(5):450-6.
5. Carter K. The Evolution of Third Molar Agenesis and Impaction. En 2016.
6. Carter K, Worthington S. Morphologic and Demographic Predictors of Third Molar Agenesis: A Systematic Review and Meta-analysis. J Dent Res. 2015;94:84
7. Celikoglu M, Miloglu O, Kazanci F. Frequency of Agenesis, Impaction, Angulation, and Related Pathologic Changes of Third Molar Teeth in Orthodontic Patients. J Oral Maxillofac Surg. mayo de 2010;68(5):990-5.
8. García-Hernández F, Toro Yagui O, Vega Vidal M, Verdejo Meneses M. Agenesia del Tercer Molar en Jóvenes entre 14 y 20 Años de Edad, Antofagasta, Chile. Int J Morphol [Internet]. diciembre de 2008 [citado 6 de abril de 2020];26(4). Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-95022008000400008&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022008000400008&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
9. Garn SM, Lewis AB. The gradient and the pattern of crown-size reduction in simple hypodontia. Angle Orthod 1970 Jan;40(1):51-8.
10. Gomez de Diego R, Montero J, Lopez-Valverde N, Ignacio de Nieves J, Prados Frutos J, Lopez-Valverde A. Epidemiological survey on third molar agenesis and facial pattern among adolescents requiring orthodontic treatment. J Clin Exp Dent. 2017;9:0-0.
11. Goyal S, Verma P, Department of Oral Medicine & Radiology, Surendera Dental College & Research Institute, Sriganganagar, 335001 Rajasthan, India, Sunder Raj S, Department of Oral Medicine & Radiology, Surendera Dental College & Research Institute, Sriganganagar, 335001 Rajasthan, India. Radiographic Evaluation of the Status of Third

- Molars in Sriganaganagar Population – A Digital Panoramic Study. *Malays J Med Sci.* 2016;23(6):103-12.
12. Hattab FN, Rawashdeh MA, Fahmy MS. Impaction status of third molars in Jordanian students. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* enero de 1995;79(1):24-9.
  13. Hirakata C, Sanpei S, Sanpei S, Tanaka S, Endo T, Sekimoto T. Symmetrical agenesis of the mandibular third molars and agenesis of other teeth in a Japanese orthodontic population. *J Oral Sci.* 2016;58(2):171-6.
  14. Huang Y, Yan Y, Cao J, Xie B, Xiao X, Luo M, et al. Observations on association between third molar agenesis and craniofacial morphology. *J Orofac Orthop Fortschritte Kieferorthopädie.* noviembre de 2017;78(6):504-10.
  15. John J, Nambiar P, Mani SA, Mohamed NH, Ahmad NF, Murad NA. Third molar agenesis among children and youths from three major races of Malaysians. *J Dent Sci.* septiembre de 2012;7(3):211-7.
  16. Kolenc-Fusé FJ. Tooth agenesis: in search of mutations behind failed dental development. *Med Oral Patol Oral Cirugia Bucal.* diciembre de 2004;9(5):390-5; 385-90.
  17. Kumar Pillai A, Thomas S, Paul G, Singh SK, Moghe S. Incidence of impacted third molars: A radiographic study in People's Hospital, Bhopal, India. *J Oral Biol Craniofacial Res.* mayo de 2014;4(2):76-81.
  18. Kwon H-JE, Jiang R. Development of Teeth. En: Reference Module in Biomedical Sciences [Internet]. Elsevier; 2018 [citado 6 de abril de 2020]. p. B9780128012383642000. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128012383641132>
  19. Masood F, Benavides E. Alterations in Tooth Structure and Associated Systemic Conditions. *Radiol Clin North Am.* enero de 2018;56(1):125-40.
  20. San Román-Hernández DDS JV, Pozos-Guillén DDS, PhD A, Martínez-Rider DDS R, Ruiz-Rodríguez DDS, MS S, Garrocho-Rangel DDS, PhD A, Rosales-Berber DDS MÁ. Radiographic Evaluation of the Presence/Agenesis of Third Molars in a Mexican Child Population. *Odontos - Int J Dent Sci.* 7 de mayo de 2018;179-87.
  21. Scheuer L, Black S. CHAPTER FIVE - The Head, Neck and Dentition. En: Scheuer L, Black S, editores. *Developmental Juvenile Osteology* [Internet]. London: Academic Press; 2000 [citado 8 de abril de 2020]. p. 36-170. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012624000950006X>
  22. Shah AP, Parekh PA. An Evaluation of Genesis and Impaction of 3rd Molar in Adolescents. *Int J Med Dent Sci.* 1 de enero de 2014;3(1):329.
  23. Silvestri AR, Singh I. The unresolved problem of the third molar. *J Am Dent Assoc.* abril de 2003;134(4):450-5. 83
  24. Singh N, Chaudhari S, Chaudhari R, Nagare S, Kulkarni A, Parkarwar P. A radiographic survey of agenesis of the third molar: A panoramic study. *J Forensic Dent Sci.* 2017;9(3):6.
  25. Valmaseda-Castellón E, De-la-Rosa-Gay C, Gay-Escoda C. Eruption disturbances of the first and second permanent molars: Results of treatment in 43 cases. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* diciembre de 1999;116(6):651-8.
  26. Williams RE, Ceen RF. Craniofacial Growth and the Dentition. *Pediatr Clin North Am.* junio de 1982;29(3):503-22.

**76798: HIPOPLASIA MAXILAR Y OLIGODONCIA ASOCIADAS A MALOCCLUSIÓN DE CLASE III EN EL PACIENTE INFANTIL // MAXILLARY HYPOPLASIA AND OLIGODONTIA ASSOCIATED WITH CLASS III MALOCCLUSION IN THE INFANTILE PATIENT****Área de conocimiento:** ODONTOLOGÍA**Autor(es):** Celia López Sevilla, Rocío Durante Lacambra**Tutor(es):** María Esther Nevado Rodríguez**Universidad:** Universidad Complutense de Madrid**Facultad:** Facultad de Odontología**Titulación:** Grado en Odontología**Formato:** Comunicación Oral - Revisiones bibliográficas**Palabras Clave:** Hipoplasia maxilar, agenesia, maloclusión clase III, ortodoncia. Maxillary hypoplasia, agenesis, class III malocclusion, orthodontics.

La ausencia congénita de dientes permanentes se asocia a trastornos craneofaciales de diferente índole que suponen desafíos terapéuticos. En este sentido las agenesias múltiples repercuten clínicamente en el desarrollo de maloclusiones esqueléticas que pueden afectar a la relación maxilo-mandibular en los tres planos del espacio. Cuando se localizan predominantemente en el maxilar superior, falta el estímulo natural para el desarrollo del mismo lo que puede desembocar en la aparición de diferentes maloclusiones. El propósito de este estudio es analizar la relación entre agenesias múltiples y la hipoplasia maxilar y de qué forma el diagnóstico precoz facilitaría la puesta en marcha de un tratamiento ortodóncico temprano lo que podría influir en una menor repercusión esquelética del problema. Nuestro trabajo pretende también aumentar la conciencia de los profesionales acerca de la relación entre la presencia de anomalías dentarias y el desarrollo de la maloclusión. Con este fin se adjunta un caso clínico diagnosticado en la Clínica Odontológica Infantil (COI) de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid que presenta múltiples agenesias dentarias e hipoplasia maxilar.

The congenital absence of permanent teeth is associated with different craniofacial anomalies that entail therapeutic challenges. On this basis, multiple agenesis have a clinical effect on the development of skeletal malocclusions that may affect the maxillomandibular relationship in the three planes of the space. When the agenesis are predominantly located in the upper maxilla, there is a lack of the natural stimulus for the development of it which may lead to the appearance of malocclusions. The aim of this study is the analysis of the relationship between multiple agenesis and maxillary hypoplasia, while considering how early diagnosis may facilitate the launch of an early orthodontic treatment which could influence on the reduction of the skeletal repercussion. In addition, our study pretends to increase the awareness among professionals regarding the relationship between dental anomalies and the development of malocclusion. In order to study this, a diagnosed case report in the Integrated Odontological Clinics in Children in the Faculty of Dentistry of the Complutense University of Madrid is attached who has multiple dental agenesis and maxillary hypoplasia.



## HIPOPLASIA MAXILAR Y OLIGODONCIA ASOCIADAS A MALOCCLUSIÓN DE CLASE III EN EL PACIENTE INFANTIL

### MAXILLARY HYPOPLASIA AND OLIGODONTIA ASSOCIATED WITH CLASS III MALOCCLUSION IN THE INFANTILE PATIENT

Primer autor: Celia López Sevilla. [cellop01@ucm.es](mailto:cellop01@ucm.es)

Segundo autor: Rocío Durante Lacambra. [rdurante@ucm.es](mailto:rdurante@ucm.es)

Tutor 1: María Esther Nevado Rodríguez. [nevadoester@odon.ucm.es](mailto:nevadoester@odon.ucm.es)

Facultad de Odontología. Universidad Complutense de Madrid.

Número de identificador del recibo de eventos: 1505576

#### Resumen:

La ausencia congénita de dientes permanentes se asocia a trastornos craneofaciales de diferente índole que suponen desafíos terapéuticos. En este sentido las agenesias múltiples repercuten clínicamente en el desarrollo de maloclusiones esqueléticas que pueden afectar a la relación maxilo-mandibular en los tres planos del espacio. Cuando se localizan predominantemente en el maxilar superior, falta el estímulo natural para el desarrollo del mismo lo que puede desembocar en la aparición de diferentes maloclusiones. El propósito de este estudio es analizar la relación entre agenesias múltiples y la hipoplasia maxilar y de qué forma el diagnóstico precoz facilitaría la puesta en marcha de un tratamiento ortodóncico temprano lo que podría influir en una menor repercusión esquelética del problema. Nuestro trabajo pretende también aumentar la conciencia de los profesionales acerca de la relación entre la presencia de anomalías dentarias y el desarrollo de la maloclusión. Con este fin se adjunta un caso clínico diagnosticado en la Clínica Odontológica Infantil (COI) de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid que presenta múltiples agenesias dentarias e hipoplasia maxilar.

Palabras clave: hipoplasia maxilar, agenesia, maloclusión clase III, ortodoncia.

#### Abstract

The congenital absence of permanent teeth is associated with different craniofacial anomalies that entail therapeutic challenges. On this basis, multiple agenesia have a clinical effect on the development of skeletal malocclusions that may affect the maxillomandibular relationship in the three planes of the space. When the agenesia are predominantly located in the upper maxilla, there is a lack of the natural stimulus for the development of it which may lead to the appearance of malocclusions. The aim of this study is the analysis of the relationship between multiple agenesia and maxillary hypoplasia, while considering how early diagnosis may facilitate the launch of an early orthodontic treatment which could influence on the reduction of the skeletal repercussion. In addition, our study pretends to increase the awareness among professionals regarding the relationship between dental anomalies and the development of malocclusion. In order to study this, a diagnosed case report in the Integrated Odontological Clinics in Children in the Faculty of Dentistry of the Complutense University of Madrid is attached who has multiple dental agenesia and maxillary hypoplasia.

Key words: maxillary hypoplasia, agenesia, class III malocclusion, orthodontics.

## **Introducción**

La maloclusión es una de las alteraciones más prevalentes en odontología. Las ausencias dentarias múltiples se asocian con frecuencia a hipoplasia o retrognacia del maxilar superior lo que condiciona el desarrollo de clase III ósea de origen maxilar (Canut et al., 1988). Los factores etiológicos son múltiples pero el factor etiológico más comúnmente asociado a la mayoría de las maloclusiones es la genética, siendo un hallazgo frecuente que más de un miembro de la misma familia presente la misma anomalía (Proffit et al., 2019).

La agenesia dental de dientes aislados es una anomalía dentaria muy prevalente, contrastando con la oligodoncia o ausencia de múltiples dientes, que no son un hallazgo tan frecuente (Kanchanasevee et al., 2020). Se sugiere que el hallazgo de múltiples agenesias dentales puede explicar la deficiencia maxilar, que es una de las características de la maloclusión de clase III esquelética (Fernandez et al., 2018).

Los objetivos de este trabajo han sido analizar la relación que existe entre la oligodoncia y la deficiencia del maxilar en los tres planos del espacio, así como evaluar si el diagnóstico y tratamiento precoz tiene utilidad de cara a mejorar el pronóstico futuro del paciente infantil. Es importante tener en cuenta que el tratamiento de estos casos representa un reto para el profesional ya que es necesario reponer los dientes ausentes con implantes, pero esto no puede realizarse hasta que finaliza el crecimiento. Por este motivo es necesario recurrir a otras opciones terapéuticas durante la infancia para estimular el desarrollo del maxilar hasta que sea posible realizar el tratamiento definitivo. Por todo ello, nuestro trabajo se complementa con un caso clínico tratado en la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid.

## **Material y métodos**

Se realizaron búsquedas en 4 bases de datos electrónicas (MEDLINE, Embase, Cochrane y Google Scholar) además de una búsqueda manual. Se emplearon filtros para eliminar de la búsqueda estudios que fueran de un solo caso clínico, así como series de casos. Los artículos seleccionados fueron publicados en entre 1977 y 2021.

Se tuvieron en cuenta los siguientes criterios de inclusión: pacientes con rango de edad entre los 2 y 54 años, tratados o no previamente con ortodoncia, con maloclusión clase III dental y/o esquelética; con agenesias dentarias. Se excluyeron los pacientes con agenesia de terceros molares, labio leporino, paladar hendido, deformidades y síndromes craneofaciales.

## **Resultados**

Para explicar nuestro trabajo adjuntamos un caso de un paciente infantil con ausencias dentarias múltiples. Se siguieron los pasos habituales para el diagnóstico ortodóncico del caso: historia clínica general y específica odontológica, exploración facial e intraoral, fotografías extra e intraorales, análisis radiográfico (ortopantomografía y telerradiografía lateral de cráneo). Se completó el estudio realizando trazados cefalométricos para determinar el problema esquelético, dentario y estético del paciente.

### Introducción del caso

Paciente varón de 5 años que acude a nuestra consulta porque sus padres han observado que “no muerde bien”. En la exploración clínica, se observa que presenta dentición temporal, clase III molar y canina, y mordida cruzada anterior (Figura 1). En el análisis de la ortopantomografía se diagnostican 6 agenesias de dientes permanentes: 1.5, 1.4, 2.4, 2.5, 3.4 y 4.5 (Figura 2). La familia refiere que hay otros miembros de la familia que presentan múltiples agenesias por lo que han tenido que recibir diferentes tratamientos ortodóncicos. El padre del paciente necesitó un tratamiento combinado de ortodoncia y cirugía ortognática. Se adjuntan los registros diagnósticos realizados en nuestro paciente donde se concluye que presenta maloclusión de clase III ósea de causa mixta con hipoplasia maxilar severa ligada a las agenesias dentales (Figura 3).



Figura 1: fotografías extraorales del paciente de frente (a); en perfil (b), y fotografías intraorales del paciente (c).



Figura 2: ortopantomografía del paciente con agenesia en 1.4, 1.5, 2.4, 2.5, 3.5, 4.5.

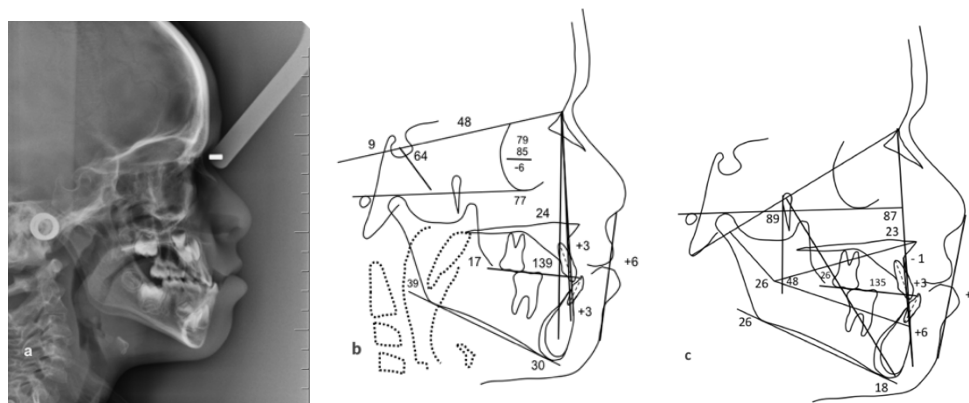


Figura 3: telerradiografía lateral de cráneo (a); cefalometría de Steiner (b) y Ricketts (c).

Los pacientes con múltiples agenesias con frecuencia presentan hipoplasia maxilar en ocasiones asociada a prognacia mandibular (Lisson & Scholtes, 2005). El estudio realizado en 2009 por Ben-Bassat & Brin, confirmaba que la existencia de múltiples agenesias condiciona defecto de desarrollo sagital del maxilar. Estos pacientes tenían mayor tendencia hacia una maloclusión de clase III (Acharya et al., 2010). El estudio de (Fernández et al., 2018), mostró diferencias significativas en cuanto a la asociación de agenesias dentarias y la maloclusión de clase III. Por otro lado, el estudio de (Lisson & Scholtes, 2005) evaluó los cambios cefalométricos en pacientes con múltiples agenesias. Estos pacientes presentaban diferencias estadísticamente significativas en los valores de SNB que aumentaban respecto a pacientes sin agenesias dentarias. El estudio de (Acharya et al., 2010) añade que los valores de SNA disminuían 0.3 grados por cada diente ausente.

Como en la mayoría de los casos de múltiples agenesias diagnosticados en la infancia, hay que postponer la colocación de implantes hasta que se haya completado el crecimiento (Bohner et al., 2019), por lo que las opciones terapéuticas irán encaminadas a estimular con ortopedia el desarrollo del maxilar superior asociado en algunos casos al control del crecimiento mandibular (Ngan & Moon, 2015).

Diversos estudios evaluaron el tratamiento de la hipoplasia maxilar mediante expansión rápida de maxilar (ERM) y tracción anterior del maxilar (TAM). Un estudio evaluó los cambios

tridimensionales que se producían en el maxilar mediante ERM o ERM y TAM. Se concluyó que la RME como la ERM y TAM, producían un movimiento hacia delante y abajo del maxilar. Tras la etapa de expansión y tracción, se conseguía un aumento de la anchura maxilar bilateral y el punto A avanzaba ( $3,06 \pm 1,29$  mm). Sin embargo, cuando se realizaba únicamente expansión del maxilar, el punto A avanzaba ( $2,16 \pm 1,27$ ) mm (Wang et al., 2018).

Para redirigir el crecimiento mandibular de estos casos se estudiaron tratamientos con mentonera, siendo recomendable su uso en edades entre 5-9 años (Graber, 1977). El estudio de (Nucci et al., 2021) analizó el tratamiento interceptivo de la maloclusión de clase III ósea en pacientes en etapa prepuberal y puberal mediante aparatos intraorales, elásticos de clase III y mentonera. El tratamiento realizado durante la etapa prepuberal obtuvo diferencias en Wits respecto al grupo tratado durante la etapa puberal; el valor de Wits disminuyó 3.1 mm tras el tratamiento realizado en etapa prepuberal, mientras que disminuyó 1.9 mm en la etapa puberal. El tratamiento en ambos grupos produjo un aumento del ángulo SNA; ANB, y disminución del ángulo SNB, lo que produjo resultados sagitales favorables.

### **Discusión**

La agenesia de múltiples dientes se relaciona con una deficiencia de desarrollo del maxilar, que es la forma más habitual de clase III ósea (Adobes Martin et al., 2020). En estos casos, para poder instaurar un tratamiento interceptivo es importante comprender la correlación entre ausencia congénita severa de dientes permanentes e hipoplasia maxilar (Fernandez et al., 2018).

La agenesia dentaria múltiple como único hallazgo clínico tiene etiología oligogenética. Durante organogénesis participa la vía de señalización celular Wnt/ $\beta$ -catenina. Dentro de su genoma, la mutación del gen WNT10A se asocia a la hipodoncia y oligodoncia. Además, todos los pacientes con mutación en este gen tienen agenesia del segundo premolar (Kanchanaseeve et al., 2020). Se ha visto que la mutación en este gen tiene una interconexión con vías de señalización de la carcinogénesis, siendo la agenesia dental un marcador temprano de predisposición de cáncer. Esto serviría como dianas terapéuticas para conocer el pronóstico en el cáncer (Bonczek et al., 2021) y un nuevo método de evaluación del riesgo genético, que permiten a los familiares recurrir a estudios genéticos.

Las múltiples agenesias diagnosticadas en la infancia suponen un problema puesto que no se puede realizar tratamiento implantológico en el paciente en crecimiento. Hay que diseñar estrategias terapéuticas que estimulen el desarrollo del maxilar. Es por ello que el tratamiento combinado mediante ERM y TAM puede ser una opción eficaz para expandir y traccionar el maxilar superior, lo que favorece la relación en los tres planos del espacio.

El segundo problema que se plantea es la complejidad de mantener los espacios para sustituir los dientes ausentes desde la infancia hasta que se completa el crecimiento. Las opciones terapéuticas incluyen diferentes tipos de mantenedores de espacio y prótesis (Canut et al., 1988).

En nuestro estudio hemos podido comprobar que el tratamiento temprano de los casos con agenesias dentarias múltiples y clase III ósea, la terapia ortopédica en el paciente infantil con oligodoncia tiene como objetivo simplificar el tratamiento posterior tanto en los casos susceptibles de tratarse con ortodoncia aislada como en los casos que requieren tratamiento combinado de ortodoncia y cirugía (Nucci et al., 2021).

### **Conclusión**

1. Los pacientes con múltiples agenesias dentarias con frecuencia desarrollan una deficiencia maxilar en los tres planos del espacio.
2. Los pacientes con oligodoncia con frecuencia presentan clase III esquelética por hipoplasia maxilar.
3. El tratamiento ortopédico-ortodóntico precoz de estos pacientes ha demostrado ser beneficioso.

## Bibliografía

- Acharya, P. N., Jones, S. P., Moles, D., Gill, D., & Hunt, N. P. (2010). A cephalometric study to investigate the skeletal relationships in patients with increasing severity of hypodontia. *The Angle Orthodontist*, *80*, 511–518. <https://doi.org/10.2319/072309-411.1>
- Adobes Martin, M., Lipani, E., Alvarado Lorenzo, A., Bernes Martinez, L., Aiuto, R., Dioguardi, M., Re, D., Paglia, L., & Garcovich, D. (2020). The effect of maxillary protraction, with or without rapid palatal expansion, on airway dimensions: A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Paediatric Dentistry*, *21*, 262–270. <https://doi.org/10.23804/ejpd.2020.21.04.2>
- Ben-Bassat, Y., & Brin, I. (2009). Skeletal and dental patterns in patients with severe congenital absence of teeth. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics : Official Publication of the American Association of Orthodontists, Its Constituent Societies, and the American Board of Orthodontics*, *135*, 349–356. <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2008.09.002>
- Bohner, L., Hanisch, M., Kleinheinz, J., & Jung, S. (2019). Dental implants in growing patients: a systematic review. *The British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery*, *57*, 397–406. <https://doi.org/10.1016/j.bjoms.2019.04.011>
- Bonczek, O., Krejci, P., Izakovicova-Holla, L., Cernochova, P., Kiss, I., & Vojtesek, B. (2021). Tooth agenesis: What do we know and is there a connection to cancer? *Clinical Genetics*, *99*, 493–502. <https://doi.org/10.1111/cge.13892>
- Canut Brusola José Antonio, & Plasencia Alcina, E. (1988). *Ortodoncia clínica*. Salvat.
- Fernandez, C. C. A., Pereira, C. V. C. A., Luiz, R. R., Vieira, A. R., & De Castro Costa, M. (2018). Dental anomalies in different growth and skeletal malocclusion patterns. *The Angle Orthodontist*, *88*, 195–201. <https://doi.org/10.2319/071917-482.1>
- Graber, L. W. (1977). Chin cup therapy for mandibular prognathism. *American Journal of Orthodontics*, *72*, 23–41. [https://doi.org/10.1016/0002-9416\(77\)90122-1](https://doi.org/10.1016/0002-9416(77)90122-1)
- Kanchanaseevee, C., Sriwattanapong, K., Theerapanon, T., Thaweesapphithak, S., Chetruengchai, W., Porntaveetus, T., & Shotelersuk, V. (2020). Phenotypic and Genotypic Features of Thai Patients With Nonsyndromic Tooth Agenesis and WNT10A Variants. *Frontiers in Physiology*, *11*, 573214. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.573214>
- Khosravi, M., Ugolini, A., Miresmaeili, A., Mirzaei, H., Shahidi-Zandi, V., Soheilifar, S., Karami, M., & Mahmoudzadeh, M. (2019). Tooth-borne versus bone-borne rapid maxillary expansion for transverse maxillary deficiency: A systematic review. *International Orthodontics*, *17*, 425–436. <https://doi.org/10.1016/j.ortho.2019.06.003>
- Lisson, J. A., & Scholtes, S. (2005). Investigation of craniofacial morphology in patients with hypodontia and oligodontia. *Journal of Orofacial Orthopedics = Fortschritte Der Kieferorthopädie : Organ/Official Journal Deutsche Gesellschaft Fur Kieferorthopädie*, *66*, 197–207. <https://doi.org/10.1007/s00056-005-0437-0>
- Ngan, P., & Moon, W. (2015). Evolution of Class III treatment in orthodontics. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics : Official Publication of the American Association of Orthodontists, Its Constituent Societies, and the American Board of Orthodontics*, *148*, 22–36. <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2015.04.012>
- Nucci, L., Costanzo, C., Carfora, M., d'Apuzzo, F., Franchi, L., & Perillo, L. (2021). Dentoskeletal effects of early class III treatment protocol based on timing of intervention in children. *Progress in Orthodontics*, *22*, 49. <https://doi.org/10.1186/s40510-021-00392-2>
- Proffit, W. R. (2019). *Ortodoncia contemporánea (6ª)*. Elsevier España.
- Wang, Y. R., Zhou, Y. H., Wang, X. D., Wei, S., & Liu, W. T. (2018). [Evaluation of maxillary three-dimensional changes in maxillary protraction with alternating rapid palatal expansion and constriction based on the cone-beam computed tomography]. *Beijing da xue xue bao. Yi xue ban = Journal of Peking University. Health sciences*, *50*, 685–692.

**76747: ANSIEDAD EN ODONTOPIEDIATRÍA EN NIÑOS DE 9 A 14 AÑOS DE EDAD / ANXIETY IN PAEDIATRIC DENTISTRY IN CHILDREN FROM 9 TO 14 YEARS OF AGE****Área de conocimiento:** ODONTOLOGÍA**Autor(es):** Paloma Sánchez Portillo, Berta García Soriano**Tutor(es):** Marta Bruna del Cojo, Caridad Margarita Arias Macias**Universidad:** Universidad CEU San Pablo**Facultad:** Facultad de Medicina**Titulación:** Grado en Odontología**Formato:** Comunicación Oral - Investigación clínica**Palabras Clave:** “ansiedad dental”, “odontopediatría”, “miedo dental “ / “dental anxiety”, “paediatric dentistry”, “dental fear”.

Resumen (Abstract):

Según la OMS, los trastornos de ansiedad son la 6ª causa de pérdidas de salud no mortales a nivel mundial. Hoy en día, la ansiedad se trata de un verdadero problema a nivel de salud pública, cerca de un 3,6% de personas padecen algún trastorno de ansiedad. Se trata de un trastorno que afecta al estado de ánimo e incluso aspectos de la vida cotidiana de la persona, por lo tanto, debe ser tratada. El objetivo del presente proyecto es describir los niveles de ansiedad y miedo en niños de 9 a 14 años, a través de un cuestionario que incluye la escala es la prueba de imagen de Venham (VTP) y la escala de Frankl como métodos diagnósticos de la ansiedad y miedo dental. El 9,5% (7 participantes) de los participantes del presente estudio manifestó MAD, en algún momento de la cita odontológica. Debido a la importancia del estudio del MAD entre los pacientes de la consulta de Odontopediatría es necesaria la continuación en investigación de este campo, con el fin de establecer protocolos y medidas destinadas al diagnóstico, prevención y control del MAD en los pacientes odontopediátricos.

According to the WHO, anxiety disorders are the 6th leading cause of non-fatal health losses worldwide. Nowadays, anxiety is a real public health problem, about 3.6% of people suffer from an anxiety disorder. It is a disorder that affects mood and even aspects of a person's daily life and therefore needs to be treated. The aim of the present project is to describe the levels of anxiety and fear in children aged 9 to 14 years, using a questionnaire that includes the Venham Picture Test (VTP) scale and the Frankl scale as diagnostic methods for dental anxiety and fear. Of the participants in the present study, 9.5% (7 participants) reported MAD at some point during the dental appointment. Due to the importance of the study of MAD among paediatric dentistry patients, it is necessary to continue research in this field in order to establish protocols and measures aimed at the diagnosis, prevention and control of MAD in paediatric dentistry patients.

## ANSIEDAD EN ODONTOPEDIATRIA EN NIÑOS DE 9 A 14 AÑOS DE EDAD

### ANXIETY IN PAEDIATRIC DENTISTRY IN CHILDREN FROM 9 TO 14 YEARS OF AGE

Nº Identificador del primer autor: Paloma Sánchez Portillo [p.sanchez89@usp.ceu.es](mailto:p.sanchez89@usp.ceu.es)

Nº Identificador del segundo autor: Berta García Soriano [b.garcia128@usp.ceu.es](mailto:b.garcia128@usp.ceu.es)

Tutor 1: Marta Bruna del Cojo [marta.brunacojo@ceu.es](mailto:marta.brunacojo@ceu.es)

Tutor 2: Caridad Margarita Arias Macias [cmargarita@ceu.es](mailto:cmargarita@ceu.es)

Afiliaciones: Facultad de Medicina, Universidad CEU San Pablo

Nº Identificador del recibo en eventos: 1492639

#### **Resumen (Abstract):**

Según la OMS, los trastornos de ansiedad son la 6ª causa de pérdidas de salud no mortales a nivel mundial. Hoy en día, la ansiedad se trata de un verdadero problema a nivel de salud pública, cerca de un 3,6% de personas padecen algún trastorno de ansiedad. Se trata de un trastorno que afecta al estado de ánimo e incluso aspectos de la vida cotidiana de la persona, por lo tanto, debe ser tratada. El objetivo del presente proyecto es describir los niveles de ansiedad y miedo en niños de 9 a 14 años, a través de un cuestionario que incluye la escala de prueba de imagen de Venham (VTP) y la escala de Frankl como métodos diagnósticos de la ansiedad y miedo dental. El 9,5% (7 participantes) de los participantes del presente estudio manifestó MAD, en algún momento de la cita odontológica. Debido a la importancia del estudio del MAD entre los pacientes de la consulta de Odontopediatría es necesaria la continuación en investigación de este campo, con el fin de establecer protocolos y medidas destinadas al diagnóstico, prevención y control del MAD en los pacientes odontopediátricos.

**Palabras clave:** “ansiedad dental”, “odontopediatría”, “miedo dental”.

According to the WHO, anxiety disorders are the 6th leading cause of non-fatal health losses worldwide. Nowadays, anxiety is a real public health problem, about 3.6% of people suffer from an anxiety disorder. It is a disorder that affects mood and even aspects of a person's daily life and therefore needs to be treated. The aim of the present project is to describe the levels of anxiety and fear in children aged 9 to 14 years, using a questionnaire that includes the Venham Picture Test (VTP) scale and the Frankl scale as diagnostic methods for dental anxiety and fear. Of the participants in the present study, 9.5% (7 participants) reported MAD at some point during the dental appointment. Due to the importance of the study of MAD among paediatric dentistry patients, it is necessary to continue research in this field in order to establish protocols and measures aimed at the diagnosis, prevention and control of MAD in paediatric dentistry patients.

**Key words:** “dental anxiety”, “paediatric dentistry”, “dental fear”.

## INTRODUCCIÓN

Según la OMS, los trastornos de ansiedad son la 6ª causa de pérdidas de salud no mortales a nivel mundial. Hoy en día, la ansiedad se trata de un verdadero problema a nivel de salud pública, cerca de un 3,6% de personas padecen algún trastorno de ansiedad.<sup>(1,2)</sup> Se trata de un trastorno que afecta al estado de ánimo e incluso aspectos de la vida cotidiana de la persona, por lo tanto, debe ser tratada.<sup>(1,3)</sup> Si nos centramos en nuestro ámbito de estudio, la odontología, encontramos que los datos sobre la miedo o ansiedad dental (MAD) en niños, también han aumentado en los últimos años.<sup>(4,5)</sup> En la atención odontopediátrica lidiar con este tipo de trastornos supone un reto para el profesional.<sup>(3,7,8)</sup> La dificultad de la comunicación, el amplio rango de edades, así como la afinidad odontólogo – paciente, son algunos de los motivos por los que en ciertas situaciones se debe recurrir a técnicas de modificación de la conducta.<sup>(3,9)</sup> Por este motivo la necesidad del diagnóstico e identificación del MAD, requiere formación en la materia de psicología infantil clínica y del desarrollo. El fin de todo ello es poder garantizar el mejor tratamiento para el paciente evitando una situación traumática o desagradable para él y sus familiares.<sup>(2,3)</sup>

El objetivo principal es describir los niveles de ansiedad y de miedo en niños de 9 a 14 años al Servicio de Odontología de la Policlínica Universitaria de la Universidad CEU San Pablo durante el periodo de noviembre 2022 a marzo de 2023.

## MATERIAL Y METODOS

Para llevar a cabo esta investigación, se diseñó cuestionario (figura1). Tras obtener la aprobación del Comité de Ética de Investigación de la Universidad San Pablo CEU se inicia este proyecto. Los pasos seguidos fueron los siguientes: Se comentó a los responsables legales de los pacientes el tipo y propósito del estudio, seguidamente se procede a la cumplimentación del cuestionario recogiendo las siguientes variables: Escala de valoración visual del estado emocional en el gabinete dental se les muestra la ficha y se les pide que indiquen el estado emocional en el que se encuentran. Se repite el mismo procedimiento después de haber finalizado el tratamiento odontológico. La escala a analizar consta de 8 pares de figuras que muestran al mismo niño en dos estados de ánimo diferentes que son identificados como “ansioso” y “no ansioso”. La escala es la prueba de imagen de Venham (VPT) que ha sido validada como medio para medir el nivel de ansiedad en niños y de preferencia entre los niños más mayores. Los resultados se medirán con valores de 0 a 8 clasificando la puntuación: de 0 a 4 como “no ansioso” y de 5 a 8 como “ansioso”.<sup>(12)</sup> La valoración del grado de colaboración del paciente durante la cita, en el gabinete odontológico, se realizará según la escala de Frankl, que es un sistema clásico muy utilizado para clasificar la conducta del niño en la consulta dental.

TRES Grado Odontología  
 Universidad CEU San Pablo

**VALORACIÓN DE LA ANSIEDAD DENTAL NIÑOS de 9 a 14 años**  
 Las estas escalas se miden:  
 - La participación es completamente voluntaria, si no desea hacerlo su profesional continuará con su atención habitual y no se le hará ningún inconveniente.  
 - El estudio se realizará en un entorno odontológico seguro de que se está realizando la encuesta, el consentimiento informado de los padres y la autorización de la Universidad CEU San Pablo.  
 - El propósito del estudio es la realización de un Trabajo de Fin de Grado del Grado de Odontología de la Universidad CEU San Pablo durante el curso 2022-2023, sobre la valoración del nivel de ansiedad de los pacientes pediátricos que acuden al centro odontológico.

-Sexo: V / M      Edad: \_\_\_\_AÑOS  
 -¿Recibe visual, cognitiva que le impide participar: SI / NO  
 -¿Ha acudido alguna vez al dentista anteriormente?: SI / NO (¿CITA)  
 -¿Cita de CITA, Odontológico / Revisión / Tratamiento específico? nº de cita: 1º, 2º, 3º, 4º.  
 -Otro: \_\_\_\_\_ / Otro especialista: \_\_\_\_\_

-FRANKL:  
 1. ¿Está cooperando? (SI/NO) \_\_\_\_\_  
 2. ¿Está colaborando? (SI/NO) \_\_\_\_\_  
 3. ¿Está participando? (SI/NO) \_\_\_\_\_  
 4. ¿Está ayudando? (SI/NO) \_\_\_\_\_  
 5. ¿Está siguiendo instrucciones? (SI/NO) \_\_\_\_\_  
 6. ¿Está escuchando? (SI/NO) \_\_\_\_\_  
 7. ¿Está mirando? (SI/NO) \_\_\_\_\_  
 8. ¿Está hablando? (SI/NO) \_\_\_\_\_

ANTES DE LA CITA      AL TERMINAR LA CITA

Figura 1. Cuestionario de recogida de datos



## RESULTADOS

El análisis global, mediante las pruebas empleadas, permitió observar que: El 9,5% (7 participantes) de los participantes del presente estudio manifestó MAD, en algún momento de la cita odontológica, mientras que el 90,5% (67 participantes) de los participantes no manifestó MAD. El estudio de la presencia de MAD de los participantes de nuestro trabajo, según la edad, reveló que: El 14,29% de los niños/as (7 participantes) de 9 -11 años de edad (49 participantes), expresó MAD. Ninguno de los niños/as de 12-14 años edad (25 participantes), expresó MAD. La observación de la presencia de MAD de los participantes del presente estudio, según su sexo, manifestó que: El 5,12% (2 participantes) de las niñas (39 participantes) presentó MAD. Y El 14,28% (5 participantes) de los niños (35 participantes) presentó MAD. Del análisis del nivel de MAD, según si los participantes habían tenido o no tenido una experiencia dental previa, se observó que: El 9,52% (6 participantes) de los niños/as que habían tenido una experiencia dental previa (63 participantes), presentó MAD. El 9,09% (1 participantes) de los que no habían tenido una experiencia dental previa (11 participantes), presentó MAD. Del examen del nivel de MAD, según el tipo de cita de asistencia odontológica recibida, se percibió que: El 6,98% (3 participantes) de los niños/as de 1ª cita de diagnóstico (43 participantes), manifestaron MAD. El 23,07% (3 participantes) de los niños/as de 1ª cita de tratamiento (13 participantes), manifestaron MAD. El 0% (0 participantes) de los niños/as de 2ª cita de tratamiento (3 participantes), manifestaron MAD. El 0% (0 participantes) de los niños/as de otro número de cita de tratamiento (14 participantes), manifestaron MAD. El 100% (1 participantes) de los niños/as de cita de urgencia (1 participantes), manifestaron MAD. El examen del nivel de MAD, según el grado de colaboración del paciente, reveló que: El 66,67% (2 participantes) de los niños/as "1" (3 participantes), según la escala de valoración del comportamiento de Frankl, mostró MAD. El 50% (3 participantes) de los niños/as "2" (6 participantes), según la escala de valoración del comportamiento de Frankl, mostró MAD. El 3,13 % (1 participantes) de los niños/as "3" (32 participantes), según la escala de valoración del comportamiento de Frankl, mostró MAD. El 14,29% (1 participantes) de los niños/as "4" (7 participantes), según la escala de valoración del comportamiento de Frankl, mostró MAD. El 0% (0 participantes) de los niños/as "5" (26 participantes), según la escala de valoración del comportamiento de Frankl, mostró MAD. El análisis del nivel de MAD, según el momento de cita de asistencia odontológica, reveló que: Del 90,5% (67 participantes) que no mostraron MAD al inicio de la cita, el 100 % (67 participantes) no mostraron MAD al final de la cita. Y del 9,5% (7 participantes) que sí mostraron MAD al inicio de la cita, el 71,43% (5 participantes) no mostraron MAD al final de la cita, mientras que el 28,57% (2 participantes) sí mostraron MAD al final de la cita.

## DISCUSION

A excepción de dos autores que realizaron estudios longitudinales para el estudio de la ansiedad dental<sup>(12,13)</sup> la mayoría de ellos, al igual que en este trabajo, realizaron estudios de tipo transversal.<sup>(9,12-24)</sup> Según los tamaños muestrales estudiados por los diferentes autores, las cifras variaron de 50<sup>(9)</sup> hasta 1546<sup>(20)</sup> sujetos. La muestra de este proyecto estuvo conformada por 74 participantes. A pesar de que algunos estudios no mostraron la distribución según el sexo,<sup>(9,23)</sup> la mayoría de ellos mostraba una distribución equitativa.<sup>(9,12-18,21,22,24)</sup> En este estudio participaron 47,3% niños y 52,7% niñas. Respecto a la edad es importante destacar que se revisaron trabajos con rangos de edades muy amplios. La mayoría de los estudios<sup>(9,12-15,17-20,21,23,24)</sup> incluyeron sujetos en edad escolar y preescolar en sus estudios a excepción de dos de ellos que estudiaron exclusivamente sujetos preadolescentes.<sup>(16,22)</sup> En este trabajo se ha comprobado que existen múltiples maneras de enfocar el análisis y evaluación de la ansiedad. A lo largo de la literatura se ha observado el estudio de biomarcadores como el cortisol en saliva,<sup>(13)</sup> presión arterial sistólica y diastólica, frecuencia cardíaca, saturación de oxígeno o

frecuencia respiratoria.<sup>(16)</sup> A pesar de que se considera que la cuantificación del MAD es más completa combinando distintos métodos, los resultados obtenidos no fueron relevantes.<sup>(15,16)</sup> Además, existe la hipótesis de que el simple hecho de realizar estas mediciones podría ser el desencadenante del MAD. Razón por la que se decidió no evaluar el MAD desde estos parámetros. Otro método muy popular son los cuestionarios autoinforme, sin embargo, ninguna de las múltiples medidas autoinforme puede considerarse ideal y adecuada para evaluar la ansiedad dental de los niños en todo el mundo. Esto es porque debemos tener en cuenta numerosas características y factores que pueden contribuir al MAD.<sup>(15)</sup> Se ha observado que uno de los métodos autoinformados de tipo cuestionario más empleados fue el CFSS-DS (*Children's Fear Survey Schedule*), sirve para medir la presencia y la severidad del MAD. Otro instrumento popular es la escala de Corah (*Corah's Dental Anxiety Scale*).<sup>(16,22)</sup> Se ha observado que numerosos cuestionarios se dan tanto a los niños como a los padres como es el caso del CFSS-DS citado anteriormente, el MDAS y el MCDA.<sup>(14,22,23)</sup> Otra forma de presentar estos cuestionarios es dando posibles respuestas a las preguntas formuladas como es el caso del ACDAS (*Abeer Children Dental Anxiety Scale*).<sup>(14)</sup> Con respecto a los métodos autoinforme tipo imagen, se caracterizan por el empleo de figuras que hacen referencia al estado emocional del niño en ese preciso momento. Algunos de los más empleados en la literatura consultada han sido la escala de FIS y el Test de imagen de Veham (VPT).<sup>(9)</sup> Otros ejemplos encontrados en la literatura son la Escala de Calificación del Dolor de Rostros de Wong Baker (WBF) o la escala de imágenes RMS.<sup>(9,14)</sup> El VPT, comprende ocho pares de figuras que muestran al mismo niño en dos estados de ánimo diferentes, "ansioso" y "no ansioso", a cada niño se le pidió elegir entre las dos situaciones mostradas en cada cartilla.<sup>(9)</sup> En este estudio se ha utilizado el VPT como método diagnóstico del MAD, por haber sido ampliamente utilizado de manera previa por otros autores y recomendado en niños menores de 13 años.<sup>(19)</sup> En los artículos revisados que evaluaron la conducta o el grado de colaboración del paciente durante la estancia en el gabinete dental emplearon la Escala de Frankl.<sup>(13,16,22)</sup> Se basa en la observación y valoración del profesional y es considerado uno de los elementos más fiables para la evaluación del comportamiento.<sup>(4,9)</sup> En este trabajo se decidió emplear el mismo método para la valoración del comportamiento del paciente pediátrico durante la estancia en el gabinete odontológico. La prevalencia del MAD reportado por los autores fue muy variada, desde un 65%<sup>(19)</sup> hasta un 6%<sup>(9)</sup> de MAD. En esta investigación el 9,5% de los participantes manifestó MAD, en algún momento de la cita odontológica. La mayoría de los autores que, si estudiaron la edad como factor determinante del MAD, observaron que las puntuaciones eran significativamente menores en los grupos de más edad en comparación con los más pequeños.<sup>(12,14,18,24)</sup> Solo uno de los autores afirma que el grupo de edad con más tasa de ansiedad dental fueron los de mayor edad.<sup>(19)</sup> En esta investigación el grupo de edad que más MAD presentó fue el de 9 a 11 años, en comparación con el de 12 a 14 años de edad. La mayoría de los autores coincidieron en que el nivel del MAD es mayor en niñas que en niños,<sup>(14-18,21)</sup> sin embargo, otros no encontraron diferencias significativas acerca del sexo de los niños.<sup>(12,23)</sup> En este trabajo el 5,12% de las niñas y 14,28% de los niños presentaron algún nivel de MAD en algún momento de la cita. Los resultados estadísticamente superiores en niñas se cree que puede deberse a que las mujeres a que estas informan de forma más fiable.<sup>(15)</sup> Un gran número de estudios no evaluó la ansiedad en relación con la experiencia dental previa.<sup>(9,12-15,22)</sup> De los que si se encontraron resultados, la mayoría de autores obtuvieron mayores niveles de ansiedad en aquellos pacientes que no habían tenido experiencias previas en una clínica dental<sup>(16,21,24)</sup> y solo uno de ellos afirmó no encontrar diferencias significativas entre ambos grupos.<sup>(21)</sup> En este estudio, manifestaron MAD el 9,52% de los participantes que habían tenido una experiencia dental previa y el 9,09% de los que no habían tenido una experiencia dental previa. Se ha comprobado que el tipo de cita influye en los niveles de MAD, siendo menores para los niños que acudían por control que aquellos que acudían por un tratamiento o por una urgencia.<sup>(18)</sup> En este trabajo, presentaron MAD el 6,98% de los niños/as de 1a cita de diagnóstico, el 23,07% de los de 1a cita de tratamiento y el 0% de los de otro número de cita de tratamiento. Según la literatura consultada, existe una correlación

entre un comportamiento no cooperativo y una puntuación alta para el MAD.<sup>(12,13,17,23)</sup> En el resto de los trabajos no se encontraron resultados que relacionaran ambas variables. En esta investigación, mostraron mayor nivel de MAD pacientes tipo “1” y “2” según la escala de valoración del comportamiento de Frankl. Se encontraron pocos artículos que relacionaran el inicio y el fin de la cita con el nivel de MAD. De los resultados obtenidos en estos artículos, dos de ellos coincidían en que los niños presentaban niveles de ansiedad más baja después del tratamiento,<sup>(14,23)</sup> frente a uno que afirmaba no encontrar diferencias según el momento de la cita.<sup>(15)</sup> En este trabajo se observó que: aquellos que no mostraron MAD al inicio (90,5%) (67 participantes), el 100 % no mostraron MAD al final de la cita. Del 9,5% (7 participantes) que sí mostraron MAD al inicio de la cita: el 71,43% (5 participantes) no mostraron MAD al final de la cita y el 28,57% (2 participantes) sí mostraron MAD al final de la cita.

## CONCLUSIONES

El 9,5% de los niños/as de 9 a 14 años que se atendieron en el servicio odontológico de la Policlínica Universitaria San Pablo Ceu, manifestó MAD en algún momento de la cita odontológica. El 14,29% de los niños/as de 9 a 11 años y el 0% de los niños/as de 12 a 14 años expresó MAD en algún momento de la cita. El 5,12% de las niñas y el 14,28% de los niños presentó MAD en algún momento de la cita. El 9,52% de los sujetos que habían tenido una experiencia dental previa y el 9,09% de aquellos que no habían tenido experiencias previas en el gabinete dental mostraron MAD a lo largo de la cita. Los pacientes presentaron MAD en la 1ª cita de diagnóstico, la 1ª cita de tratamiento y en las citas de urgencias. El 66,67% de los pacientes “1”, el 50% de los pacientes “2”, y el 14,29% de los pacientes “4” mostraron MAD en algún momento de la cita. El 90,5% de los sujetos no mostraron MAD ni al inicio ni al final de la cita y del 9,5% de aquellos que sí presentaron MAD al inicio de la cita, el 28,57% también mostró MAD al final. Es necesaria la continuación en investigación de este campo, con el fin de establecer protocolos y medidas destinadas al diagnóstico, prevención y control del MAD en los pacientes odontopediátricos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- (1) Global Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates. Geneva: World Health Organization; 2017.
- (2) Vanhee T, Mourali S, Bottenberg P, Jacquet W, Vanden Abbeele A. Stimuli involved in dental anxiety: What are patients afraid of: A descriptive study. *Int J Paediatr Dent.* 2020; 30(3): 276-285.
- (3) Klingberg G, Broberg AG. Dental fear/anxiety and dental behaviour management problems in children and adolescents: a review of prevalence and concomitant psychological factors. *Int J Paediatr Dent.* 2007; 17(6): 391-406.
- (4) Steinsbekk S, Ranum B, Wichstrøm L. Prevalence and course of anxiety disorders and symptoms from preschool to adolescence: a 6-wave community study. *J Child Psychol Psychiatry.* 2022; 63(5): 527-534.
- (5) Grisolia BM, dos Santos APP, Dhyppolito IM, Buchanan H, Hill K, Oliveira BH. Prevalence of dental anxiety in children and adolescents globally: A systematic review with meta-analyses. *Int J Paediatr Dent.* 2021; 31(2): 168-183.
- (6) APA Dictionary of Psychology. [Internet]. [Consultado 3 Dic 2022] Disponible en: <https://dictionary.apa.org/>.
- (7) Costa Junior ÁL. Psychology applied to pediatric dentistry: an introduction. *Artigo 5.* 2002.
- (8) Tiwari S, Kulkarni P, Agrawal N, Shikha M, Saurabh Kale, Jaiswal N. Dental Anxiety Scales used in Pediatric Dentistry: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Contemp Dent Pract.* 2021; 22(11): 1338–1345.

- (9) Donoso-Delgado L, Campos- Campos K. Comparación de tres escalas de ansiedad RMS Pictorial Scale(rms-ps) Venham picture test (VPT) y facial image scale (FIS). *Odontol Pediatr*. 2019; 18(2); 26-34.
- (10) Venham L, Quatrocelli S. The Young Child's Response to Repeated Dental Procedures. *Journal of dental research* 1977; 56(7):734-738.
- (11) Gao S, Lu J, Li P, Yu D, Zhao W. Prevalence and risk factors of children's dental anxiety in China: a longitudinal study. *BMJ Open* 2021;11(4).
- (12) Cademartori MG, Cara G, Pinto GdS, Costa VPP. Validity of the Brazilian version of the Dental Subscale of Children's Fear Survey Schedule. *Int J Paediatr Dent* .2019; 29(6):736-747.
- (13) Kumar V, Goud E, Turagam N, Mudrakola D, Ealla K, Bhoopathi P. Prevalence of dental anxiety level in 6- to 12-year-old South Indian children. *JPBS* 2019; 11(6):321-324.
- (14) Vlad R, Pop AM, Olah P, Monea M. The Evaluation of Dental Anxiety in Primary School Children: A Cross-Sectional Study from Romania. *Children (Basel)* 2020 Oct;7(10):158.
- (15) de Camargo Smolarek P, da Silva LS, Martins PRD, da Cruz Hartman K, Bortoluzzi MC, Chibinski ACR. The influence of distinct techniques of local dental anesthesia in 9- to 12-year-old children: randomized clinical trial on pain and anxiety. *Clin Oral Invest* 2021; 25(6):3831-3843.
- (16) Raadal M, Milgrom P, Weinstein P, Mancl L, Cauce AM. The Prevalence of Dental Anxiety in Children from Low-income Families and its Relationship to Personality Traits. *Journal of dental research* 1995; 74(8):1439-1443.
- (17) Lima DSM, Barreto KA, Rank RCIC, Vilela JER, Corrêa MSNP, Colares V. Does previous dental care experience make the child less anxious? An evaluation of anxiety and fear of pain. *Eur Arch Paediatr Dent* 2021 Apr;22(2):139-143.
- (18) Mautz-Miranda C, Fernández-Delgadillo C, Saldivia-Ojeda C, Rodríguez-Salinas C, Riquelme-Carrasco S, Linco-Olave J. R. Prevalencia de ansiedad dental en niños atendidos en los Servicios de Salud Públicos de Valdivia, Chile. 2017.
- (19) Marcano, A. A., Figueredo, A., & Orozco, G. (2021). Evaluación de la ansiedad y miedo en niños escolares en la consulta odontopediátrica. *Revista De Odontopediatria Latinoamericana*, 2(2).
- (20) Alsadat F, El-Housseiny A, Alamoudi N, Elderwi D, Ainos A, Dardeer F. Dental fear in primary school children and its relation to dental caries. *Niger J Clin Pract* .2018;21(11):1454-1460.
- (21) Laureano ICC, Farias L, Fernandes LHF, Alencar CRBd, Forte FDS, Honório DR, et al. Dental Fear in Children: Association with Dental Caries and Molar Incisor Hypomineralization. *Braz Dent J* . 2020;31(6):673-679.
- (22) Porritt J, Morgan A, Rodd H, Gupta E, Gilchrist F, Baker S, et al. Development and evaluation of the children's experiences of dental anxiety measure. *Int J Paediatr Dent* 2018 ;28(2):140-151.
- (23) Shekhar S, Suprabha BS, Shenoy R, Rao A, Rao A. Effect of active and passive distraction techniques while administering local anaesthesia on the dental anxiety, behaviour and pain levels of children: a randomised controlled trial. *Eur Arch Paediatr Dent* 2022;23(3):417-427.
- (24) Cademartori MG, Rosa DPd, Brancher LC, Costa VPP, Goettems ML. Association of Dental Anxiety with Psychosocial Characteristics among Children Aged 7-13 Years. *Pesqui Bras Odontopediatria Clin*. 2020; 20

**76949: PRESERVACIÓN ALVEOLAR CONCENTRADOS PLAQUETARIOS****Área de conocimiento:** ODONTOLOGÍA**Autor(es):** Marina Martín Jordán, Beatriz Losantos Pulido**Tutor(es):** Francisco González Fernández-Tresguerres**Universidad:** Universidad Complutense de Madrid**Facultad:** Facultad de Odontología**Titulación:** Grado en Odontología**Formato:** Comunicación Oral - Revisiones bibliográficas**Palabras Clave:** Concentrados plaquetarios; preservación alveolar; fibrina rica en plaquetas (PRF); plasma rico en plaquetas (PRP); plasma rico en factores de crecimiento (PRGF).**Resumen**

**OBJETIVO:** el objetivo de esta revisión es determinar la importancia y eficacia de los concentrados plaquetarios en la preservación alveolar.

**MATERIAL Y MÉTODOS:** se realizaron búsquedas computarizadas en PubMed, Medline, Cochrane, Scielo, Science Direct de artículos y publicaciones disponibles, tanto en español como en inglés. También se utilizó el apoyo de libros manuales de la biblioteca del centro.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN:** tras una extracción alveolar se producen cambios en el hueso, en sentido vertical y horizontal, siendo más evidentes en éste último y llegando a producirse una reabsorción horizontal de hasta un 50%. Para reducir los cambios producidos recurrimos a distintas técnicas de preservación alveolar, entre las que destaca el uso de concentrados plaquetarios. A pesar de que los resultados son contradictorios, se ha observado que estos materiales fomentan la cicatrización de los tejidos duros, mejoran notablemente la cicatrización de los tejidos blandos, así como reducen la sintomatología postoperatoria.

**CONCLUSIÓN:** los concentrados plaquetarios son biomateriales adecuados para la preservación alveolar, tanto para favorecer la regeneración como para reducir la sintomatología postoperatoria. Aun así, se requieren más estudios.

**Abstract**

**OBJECTIVES:** the aim of this review is to determine the importance and effectiveness of platelet concentrates in alveolar preservation.

**MATERIAL AND METHODS:** computerized searches of available articles and publications were performed in PubMed, Medline, Cochrane, Scielo, Science Direct, both in Spanish and English. We also used the support of manual books from the centre's library.

**RESULTS AND DISCUSSION:** after alveolar extraction, changes occur in the bone, both vertically, and horizontally, being more evident in the latter with a horizontal resorption of up to 50%. To reduce the changes produced we turn to different alveolar preservation techniques, including the use of platelet concentrates. Although the results are contradictory, it has been observed that these materials promote hard tissue healing, significantly improve soft tissue healing, and reduce postoperative symptoms.

**CONCLUSION:** platelet concentrates are suitable biomaterials for alveolar preservation, both to promote regeneration and to reduce post-operative symptomatology. However, further studies are required.



# REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE LA PRESERVACIÓN ALVEOLAR MEDIANTE CONCENTRADOS PLAQUETARIOS

Realizado por:

1522664 Marina Martín Jordán - marinm33@ucm.es

1522664 Beatriz Losantos Pulido - bealosan@ucm.es

Tutor: Dr. Francisco González Fernández-Tresguerres - frango09@ucm.es

Facultad de Odontología - Universidad Complutense de Madrid

## Resumen

**OBJETIVO:** el objetivo de esta revisión es determinar la importancia y eficacia de los concentrados plaquetarios en la preservación alveolar.

**MATERIAL Y MÉTODOS:** se realizaron búsquedas computarizadas en PubMed, Medline, Cochrane, Scielo, Science Direct de artículos y publicaciones disponibles, tanto en español como en inglés. También se utilizó el apoyo de libros manuales de la biblioteca del centro.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN:** tras una extracción alveolar se producen cambios en el hueso, en sentido vertical y horizontal, siendo más evidentes en éste último y llegando a producirse una reabsorción horizontal de hasta un 50%. Para reducir los cambios producidos recurrimos a distintas técnicas de preservación alveolar, entre las que destaca el uso de concentrados plaquetarios. A pesar de que los resultados son contradictorios, se ha observado que estos materiales fomentan la cicatrización de los tejidos duros, mejoran notablemente la cicatrización de los tejidos blandos, así como reducen la sintomatología postoperatoria.

**CONCLUSIÓN:** los concentrados plaquetarios son biomateriales adecuados para la preservación alveolar, tanto para favorecer la regeneración como para reducir la sintomatología postoperatoria. Aun así, se requieren más estudios.

**Palabras clave:** concentrados plaquetarios; preservación alveolar; fibrina rica en plaquetas (PRF); plasma rico en plaquetas (PRP); plasma rico en factores de crecimiento (PRGF).

## Abstract

**OBJECTIVES:** the aim of this review is to determine the importance and effectiveness of platelet concentrates in alveolar preservation.

**MATERIAL AND METHODS:** computerized searches of available articles and publications were performed in PubMed, Medline, Cochrane, Scielo, Science Direct, both in Spanish and English. We also used the support of manual books from the centre's library.

**RESULTS AND DISCUSSION:** after alveolar extraction, changes occur in the bone, both vertically, and horizontally, being more evident in the latter with a horizontal resorption of up to 50%. To reduce the changes produced we turn to different alveolar preservation techniques, including the use of platelet concentrates. Although the results are contradictory, it has been observed that these materials promote hard tissue healing, significantly improve soft tissue healing, and reduce postoperative symptoms.

**CONCLUSION:** platelet concentrates are suitable biomaterials for alveolar preservation, both to promote regeneration and to reduce post-operative symptomatology. However, further studies are required.

**Key words:** concentrate platelets; alveolar preservation; platelet-rich fibrin (PRF); platelet-rich plasma (PRP); plasma rich in growth factors (PRGF).

## INTRODUCCIÓN

Tras la extracción dental se produce un proceso de remodelación ósea significativo con un crecimiento óseo dentro del alvéolo combinado con una reabsorción del proceso alveolar en todas sus dimensiones. La pérdida dentaria conduce a una serie de cambios adaptativos que afectan tanto a los tejidos duros como a los tejidos blandos. *(Tan et al., 2018) (Araújo et al., 2018)*

Para disminuir lo máximo posible esta reabsorción en vistas a obtener un buen lecho sobre el que poder colocar implantes podemos emplear distintos biomateriales. Entre ellos los concentrados plaquetarios. El objetivo de esta revisión es evaluar la eficacia que tienen los concentrados plaquetarios en la preservación alveolar de un alveolo post-extracción y compararla con la cicatrización espontánea. *(Horvath et al., 2018)*

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de esta revisión narrativa se realizaron búsquedas computarizadas en PubMed, Medline, Cochrane, Scielo, Science Direct. Como apoyo para la investigación sobre este tema se utilizaron libros de texto que se encontraban disponibles en la biblioteca del centro. Las palabras clave que se utilizaron en cada uno de los buscadores fueron concentrados plaquetarios; preservación alveolar; fibrina rica en plaquetas (PRF); plasma rico en plaquetas (PRP); plasma rico en factores de crecimiento (PRGF).. También se utilizaron filtros para determinar los criterios de inclusión y exclusión en la búsqueda, que comprenden aquellos artículos con texto completo gratuito, publicados en español o inglés, publicados en los últimos 10 años y que sean una revisión sistemática, o un ensayo clínico.

Para enfocar mejor la búsqueda se procedió a la lectura de los abstracts de cada uno de los artículos y se eligieron aquellos que aportaban la información necesaria según los objetivos establecidos. Por eso, a pesar de obtener muchos resultados el número de artículos seleccionados fue mucho menor.

Respecto al origen de los artículos, se dio prioridad a aquellos que fueron publicados en revistas americanas, europeas o internacionales. No se trata de una decisión tomada a la ligera, sino que se tuvo en cuenta que hay un mayor porcentaje de revistas europeas y americanas dentro de la categoría Q1 de revistas según el factor de impacto.

## RESULTADOS

Tras varios estudios preclínicos y clínicos finalmente se ha demostrado que la pérdida de volumen del reborde alveolar tras realizar una extracción dentaria es un proceso irreversible que implica una reducción tanto horizontal como vertical del reborde en cuestión. *(Ávila-Ortiz et al., 2018)*

Los concentrados plaquetarios son un biomaterial autólogo, obtenido mediante centrifugación diferencial de la sangre venosa del paciente, logrando un aumento del concentrado de plaquetas y de sus respectivos factores de crecimiento en un volumen pequeño de plasma. *(Vega et al., 2021)*

Los factores de crecimiento son sustancias que generan señales bioquímicas capaces de modificar las respuestas de las células del organismo. Están involucrados en el control del crecimiento y en la diferenciación celular. Dado que las plaquetas son fuente de factores de crecimiento, el PRP se usa para la regeneración ósea, la cicatrización de heridas cutáneas y en traumatología. (Stähli et al., 2018)

Los concentrados plaquetarios se pueden clasificar en cuatro categorías, según su contenido en leucocitos y fibrina. Esta clasificación pretende proporcionar un enfoque objetivo para el desarrollo posterior de cada una de los métodos disponibles de producción de los concentrados plaquetarios. *Figura 1 (Dohan et al., 2009)*. Cada tipo se puede obtener por medio de protocolos automáticos o bien mediante protocolos manuales. (Vega et al., 2021)

Clasificación	Presencia de leucocitos	Arquitectura de fibrina
PRP Puro (P-PRP)	No	Baja densidad
Plasma rico en plaquetas y en leucocitos (L-PRP)	Si	Baja densidad
Fibrina rica en plaquetas pura (P-PRF)	No	Alta densidad
Fibrina rica en plaquetas y leucocitos (L-PRF)	Si	Alta densidad

*Figura 1. Clasificación de los concentrados plaquetarios basada en su composición. Dohan et al., 2009*

La fibrina rica en plaquetas (PRF) aparece como una segunda generación de concentrados plaquetarios con ciertas ventajas sobre el plasma rico en plaquetas (PRP). Las grandes diferencias que presenta este biomaterial en comparación con el PRP, es que no se le añade trombina durante su preparación y muestra una liberación sostenida de los factores de crecimiento en el tiempo. (He et al., 2018) (Mihaylova et al., 2018)

Por todo esto, los científicos han concluido que las propiedades químicas de estos preparados resultan mucho mejores que las del PRP. (He et al., 2018)

## DISCUSIÓN

El uso del plasma rico en plaquetas puede aportar beneficios en cuanto a la regeneración de los tejidos blandos o de la densidad ósea, pero los resultados son conflictivos. Analicemos distintos resultados:

En el año 2018, **Annunziata M.** y cols realizaron una revisión sistemática sobre la prevención de la reabsorción post-extracción. En la revisión se concluyó que los concentrados plaquetarios apenas influyen, o no influyen nada, sobre la cicatrización ósea. Aunque sí inducen y aceleran la cicatrización de los tejidos blandos tras la extracción, además de disminuir el dolor postoperatorio. Se observó que el PRF es de liberación más lenta que el PRP, liberando factores de crecimiento hasta 10 días tras su colocación. (Annunziata et al., 2018)

En 2018 **Liu Y.** y cols realizaron un estudio sobre animales sobre el efecto del PRF empleado en distintos tratamientos. En uno de los estudios, tras realizar extracciones, en el seguimiento realizado 6 semanas después, se observó mediante la realización de estudios histomorfométricos una tasa de ocupación del hueso significativamente mayor en el lado de relleno con PRF.

En el caso de elevaciones de seno, en el grupo 1 (relleno con xenoinjerto bovino mezclado con hueso autólogo particulado) se observó neoformación de hueso desde el tercer mes y al noveno mes no era



posible diferenciarlo del previamente presente. Sin embargo en el grupo 2 (relleno únicamente con PRF) se observó neoformación ósea a partir del sexto mes y al noveno mes seguía pudiendo diferenciarse el hueso nuevo. Así pues, en el caso del relleno de las elevaciones de seno, la mezcla de xenoinjerto bovino y hueso autólogo particulado es mejor que el PRF, ya que el PRF empleado solo puede tener un efecto limitado en la osteogénesis. (*Liu et al., 2019*)

En 2019 **Clark D.** y *cols* realizaron un estudio clínico para evaluar la eficacia sobre la preservación alveolar del A-PRF (fibrina rica en plaquetas avanzada); FDBA (aloinjerto cortical particulado liofilizado); ambos combinados; y cicatrización espontánea. Se observó una mayor pérdida a nivel vertical en la cicatrización espontánea, una preservación del alveolo similar con A-PRF y con A-PRF+FDBA, así como se obtuvo una densidad ósea significativamente mayor en el grupo de FDBA en comparación con la cicatrización espontánea. (*Clark et al., 2019*)

En el año 2020, **Anitua E.** y *cols* realizaron una revisión narrativa sobre la eficacia de los concentrados plaquetarios según su composición. De ella concluyeron que el uso de PRP en cirugía es una buena estrategia para mejorar la regeneración de los tejidos, tanto duros como blandos. Además, el plasma puro rico en plaquetas (P-PRP) ha demostrado obtener mejores resultados en cuanto a la preservación alveolar y ganancia ósea en comparación al plasma rico en leucocitos y plaquetas (L-PRP), mientras que el L-PRP obtuvo mejor cicatrización del tejido blando y menor dolor postoperatorio. (*Anitua et al., 2020*)

Por otro lado, **Fortunato L.** y *cols* realizaron en 2020 una revisión sistemática sobre la eficacia del uso de concentrados plaquetarios en osteonecrosis por medicamento (ONM). Se comprobó que los concentrados plaquetarios estimulan la cicatrización de tejidos blandos, así como poseen propiedades inmunomoduladoras. Además, pueden ser efectivos en la prevención de ONM ya que es posible que favorezcan el proceso de angiogénesis. Sin embargo, en cuanto al tratamiento de la ONM no hay diferencias significativas con su uso de momento. (*Fortunato et al., 2020*)

**Strauss FJ.** y *cols* en 2020 elaboraron una revisión narrativa sobre los concentrados plaquetarios. De ella concluyeron que la PRF propicia la proliferación, migración, adhesión, diferenciación y activación celular de diversas células implicadas en la regeneración ósea; además de reducir la inflamación, suprimir la osteoclastogénesis e incrementar la expresión de algunos factores de crecimiento. (*Strauss et al., 2020*)

En 2022, **Farshidfar N.** y *cols* de su revisión sistemática sobre el efecto de la fibrina rica en plaquetas inyectada (I-PRF) en la regeneración de los tejidos orales. Se comprobó su capacidad antiinflamatoria y anti-microbial, así como la capacidad de fomentar la regeneración de tejidos blandos, periodonto, hueso, cartílago y pulpa. Además, acelera el movimiento dentario durante los tratamientos de ortodoncia. Respecto a la cicatrización de los tejidos blandos, se observó en un estudio in vitro que la I-PRF induce la angiogénesis y cicatrización. Por otro lado, se menciona un estudio clínico retrospectivo realizado por Gülsen y Dereci en 2019, en el que tras usar I-PRF en una técnica de elevación de seno y colocación de implantes simultáneo y pasar 6 meses de cicatrización, hubo neoformación de hueso significativa tanto por mesial como por distal de los implantes. (*Farshidfar et al., 2022*)

En 2022, **Mijiritsky E.** y *cols* realizaron una revisión literaria sobre los concentrados plaquetarios. Referente a la preservación alveolar existen distintos resultados según el autor:

- Célio-Mariano y *cols* observaron una neoformación ósea significativamente mayor en el alveolo con PRP

tras 1-3 meses, en comparación con la cicatrización espontánea. Cannellas y cols reportaron también mayor neoformación ósea, pero empleando L-PRF.

- Ivanova y cols, al igual que Marenzi y cols, estudiaron el uso de PRF+FDDBA en comparación con la cicatrización espontánea y reportaron una neoformación ósea significativamente mayor con el uso PRF-FDDBA.

- Yelameli y cols comparan el PRF con el PRP, determinando que la cicatrización de tejidos tanto duros como blandos 4 meses post-extracción es significativamente mayor en PRF que PRP.

- Por otro lado, Baslarli y cols plantean la posibilidad de que el PRF no mejore la cicatrización ósea.

- Bilginaylar y cols, hacen referencia a la sintomatología postoperatoria, indicando que el uso de concentrados plaquetarios la disminuye significativamente. Aftab y cols opinan lo mismo, además de que la densidad ósea es mayor en los casos de uso de PRP. (Mijiritsky et al., 2022)

## CONCLUSIONES

1. A pesar de que existen diversos tipos de biomateriales empleados en la preservación alveolar, ninguno es capaz de frenar por completo la pérdida de hueso alveolar post-extracción.
2. El PRF empleado por sí solo tiene un efecto limitado sobre la osteogénesis en comparación a otros biomateriales. Al combinar el PRF con otros biomateriales podemos obtener mayor formación ósea.
3. Aunque haya estudios con resultados bastante prometedores, existen resultados controvertidos sobre los concentrados plaquetarios y su influencia en la preservación del alveolo post-extracción.
4. Los concentrados plaquetarios aceleran la cicatrización de los tejidos blandos y disminuyen la sintomatología postoperatoria.
5. Concluimos que los concentrados plaquetarios son biomateriales adecuados para la preservación alveolar. Aun así, se requieren más estudios in vivo.

## BIBLIOGRAFÍA

- Anitua, E., Fernández-de-Retana, S., & Alkhraisat, M. H. (2020). Platelet rich plasma in oral and maxillofacial surgery from the perspective of composition. *Platelets*, 32(2), 174-182. <https://doi.org/10.1080/09537104.2020.1856361>
- Annunziata, M., Guida, L., Nastri, L., Piccirillo, A., Sommese, L., & Napoli, C. (2018). The Role of Autologous Platelet Concentrates in Alveolar Socket Preservation: A Systematic Review. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 45(3), 195-203. <https://doi.org/10.1159/000488061>
- Araújo, M. G., & Lindhe, J. (2005). Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *Journal of clinical periodontology*, 32(2), 212–218. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2005.00642.x>
- Vega, H. I. A. (2021, 16 abril). Efectividad de los concentrados plaquetarios en el tratamiento de los desórdenes temporomandibulares | Arbildo Vega | *Rev Cubana Estomatol.* <https://revestomatologia.sld.cu/index.php/est/article/view/3053>
- Avila-Ortiz, G., Elangovan, S., Kramer, K. W., Blanchette, D., & Dawson, D. V. (2014). Effect of alveolar ridge preservation after tooth extraction: a systematic review and meta-analysis. *Journal of dental research*, 93(10), 950–958. <https://doi.org/10.1177/0022034514541127>
- Clark, D., Rajendran, Y., Paydar, S., Ho, S., Cox, D., Ryder, M., Dollard, J., & Kao, R. T. (2018). Advanced platelet-rich fibrin and freeze-dried bone allograft for ridge preservation: A randomized controlled clinical trial. *Journal of Periodontology*, 89(4), 379-387. <https://doi.org/10.1002/jper.17-0466>

- Dohan Ehrenfest, D. M., Rasmusson, L., & Albrektsson, T. (2009c). Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends in Biotechnology*, 27(3), 158-167. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.11.009>
- Farshidfar, N., Jafarpour, D., Firoozi, P., Sahmeddini, S., Hamedani, S., de Souza, R. F., & Tayebi, L. (2022). The application of injectable platelet-rich fibrin in regenerative dentistry: A systematic scoping review of In vitro and In vivo studies. *Japanese Dental Science Review*, 58, 89-123. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2022.02.003>
- Fortunato, L., Bennardo, F., Buffone, C., & Giudice, A. (2020). Is the application of platelet concentrates effective in the prevention and treatment of medication-related osteonecrosis of the jaw? A systematic review. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 48(3), 268-285. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2020.01.014>
- He, L., Lin, Y., Hu, X., Zhang, Y., & Wu, H. (2009). A comparative study of platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and differentiation of rat osteoblasts in vitro. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*, 108(5), 707–713. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2009.06.044>
- Horváth, A., Mardas, N., Mezzomo, L. A., Needleman, I. G., & Donos, N. (2013). Alveolar ridge preservation. A systematic review. *Clinical oral investigations*, 17(2), 341–363. <https://doi.org/10.1007/s00784-012-0758-5>
- Liu, Y., Sun, X., Yu, J., Wang, J., Zhai, P., Chen, S., Liu, M., & Zhou, Y. (2019). Platelet-Rich Fibrin as a Bone Graft Material in Oral and Maxillofacial Bone Regeneration: Classification and Summary for Better Application. *BioMed Research International*, 2019, 1-16. <https://doi.org/10.1155/2019/3295756>
- Mihaylova, Z., Mitev, V., Stanimirov, P., Isaeva, A., Gateva, N., & Ishkitiev, N. (2017). Use of platelet concentrates in oral and maxillofacial surgery: an overview. *Acta odontológica Scandinavica*, 75(1), 1–11. <https://doi.org/10.1080/00016357.2016.1236985>
- Mijiritsky, E., Assaf, H. D., Koleran, R., Mangani, L., Ivanova, V., & Zlatev, S. (2022). Autologous Platelet Concentrates (APCs) for Hard Tissue Regeneration in Oral Implantology, Sinus Floor Elevation, Peri-Implantitis, Socket Preservation, and Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw (MRONJ): A Literature Review. *Biology*, 11(9), 1254. <https://doi.org/10.3390/biology11091254>
- Stähli, A., Strauss, F. J., & Gruber, R. (2018). The use of platelet-rich plasma to enhance the outcomes of implant therapy: A systematic review. *Clinical Oral Implants Research*, 29, 20-36. <https://doi.org/10.1111/clr.13296>
- Strauss, F. J., Nasirzade, J., Kargarpour, Z., Stähli, A., & Gruber, R. (2019). Effect of platelet-rich fibrin on cell proliferation, migration, differentiation, inflammation, and osteoclastogenesis: a systematic review of in vitro studies. *Clinical Oral Investigations*, 24(2), 569-584. <https://doi.org/10.1007/s00784-019-03156-9>
- Tan, W. L., Wong, T. L. T., Wong, M. C. M., & Lang, N. P. (2011). A systematic review of post-extraction alveolar hard and soft tissue dimensional changes in humans. *Clinical Oral Implants Research*, 23, 1-21. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2011.02375>

**76953: Protocolo clínico para la colocación de un implante PRAMA en el sector estético anterior.  
Clinical protocol for the placement of a PRAMA implant in the anterior aesthetic sector****Área de conocimiento:** ODONTOLOGÍA**Autor(es):** Marina González Alvarez**Tutor(es):** Óscar Iglesias Velázquez**Universidad:** Universidad Complutense de Madrid**Facultad:** Facultad de Odontología**Titulación:** Grado en Odontología**Formato:** Comunicación Oral - Investigación clínica**Palabras Clave:** BOPT, Dental Implants, Rehabilitation, Provisional, Peri-implant Tissues; BOPT, Implantes Dentales, Reehabilitación, Provisional, Tejidos Periimplantarios

Las rehabilitaciones protésicas tradicionalmente han supuesto un reto para cualquier clínico en cuanto a la estética. Numerosas técnicas han sido descritas a lo largo de la historia con el fin de conseguir resultados clínicos, histológicos y estéticos óptimos tanto en rehabilitaciones dentarias como implantosoportadas. El desarrollo de la técnica BOPT para rehabilitaciones dentosoportadas y su éxito clínico ha impulsado a numerosos investigadores a aplicar esta técnica en rehabilitaciones implantosoportadas. El tratamiento propuesto para una paciente de 74 años que acude a la clínica para la rehabilitación de un diente fracturado con pronóstico restaurador imposible es la colocación de un implante PRAMA con provisional inmediato aplicando la filosofía BOPT con la que podemos modelar los tejidos periimplantarios obteniendo un perfil de emergencia adecuado para el sector anterior.

Prosthetic rehabilitations have traditionally been a challenge for any clinician in terms of aesthetics. Numerous techniques have been described throughout history in order to achieve optimal clinical, histological and aesthetic results in both dental and implant-supported restorations. The development of the BOPT technique for tooth-supported restorations and its clinical success have promoted numerous researchers to apply this technique in implant-supported restorations. The proposed treatment for a 74-year-old patient who comes to the clinic for the rehabilitation of a fractured tooth with an impossible restorative prognosis is the placement of a PRAMA implant with an immediate provisional applying the BOPT philosophy with which we can model the peri-implant tissues obtaining an emergency profile suitable for the anterior sector.

- Título: **“Protocolo clínico para la colocación de un implante PRAMA en el sector estético anterior” “Clinical protocol for the placement of a PRAMA implant in the anterior aesthetic sector”**.
- 1458453, Marina González, [marina52@ucm.es](mailto:marina52@ucm.es)
- Tutor: Óscar Iglesias Velázquez, [osiglesi@ucm.es](mailto:osiglesi@ucm.es)
- Afiliaciones: Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid
- Resumen (Abstract): Las rehabilitaciones protésicas tradicionalmente han supuesto un reto para cualquier clínico en cuanto a la estética. Numerosas técnicas han sido descritas a lo largo de la historia con el fin de conseguir resultados clínicos, histológicos y estéticos óptimos tanto en rehabilitaciones dentarias como implantosoportadas. El desarrollo de la técnica BOPT para rehabilitaciones dentosoportadas y su éxito clínico ha impulsado a numerosos investigadores a aplicar esta técnica en rehabilitaciones implantosoportadas. El tratamiento propuesto para una paciente de 74 años que acude a la clínica para la rehabilitación de un diente fracturado con pronóstico restaurador imposible es la colocación de un implante PRAMA con provisional inmediato aplicando la filosofía BOPT con la que podemos modelar los tejidos periimplantarios obteniendo un perfil de emergencia adecuado para el sector anterior.

Prosthetic rehabilitations have traditionally been a challenge for any clinician in terms of aesthetics. Numerous techniques have been described throughout history in order to achieve optimal clinical, histological and aesthetic results in both dental and implant-supported restorations. The development of the BOPT technique for tooth-supported restorations and its clinical success have promoted numerous researchers to apply this technique in implant-supported restorations. The proposed treatment for a 74-year-old patient who comes to the clinic for the rehabilitation of a fractured tooth with an impossible restorative prognosis is the placement of a PRAMA implant with an immediate provisional applying the BOPT philosophy with which we can model the peri-implant tissues obtaining an emergency profile suitable for the anterior sector.

- Key words: BOPT, Dental Implants, Rehabilitation, Provisional, Peri-implant Tissues; BOPT, Implantes Dentales, Reehabilitación, Provisional, Tejidos Periimplantarios.

## 1. INTRODUCCIÓN

Una de las complicaciones a la hora de rehabilitar dientes, ya sea mediante coronas dentosoportadas o con prótesis sobre implantes, es la migración del margen gingival hacia la parte apical del diente y, como consecuencia, un resultado poco estético e insatisfactorio para el paciente.

Las preparaciones dentarias tradicionales seguían la filosofía de realizar un tallado horizontal, es decir, preparar el diente con una línea de terminación (Loi & Di Felice, 2013).

Sin embargo, una de las desventajas principales de este tipo de tallado es la imposibilidad de modificar la posición del margen gingival .

La técnica de BOPT (Biological Oriented Preparation Technique) trata de realizar un acondicionamiento del diente sin línea de terminación, siendo una técnica más conservadora. Uno de los puntos clave de este tipo de tallado es que se trabaja sobre la superficie dentaria y periodontal al mismo tiempo, dotando al diente de una forma convergente. El empleo de provisionales y su colocación inmediatamente después del tallado permiten modelar los perfiles de emergencia y engrosar el tejido gingival. El coágulo generado durante la preparación dentaria y la arquitectura del provisional, guiarán la cicatrización, re inserción y engrosamiento de los tejidos periodontales, permitiendo posicionar el margen gingival en la posición deseada (Abad-Coronel et al., 2022; Agustín-Panadero et al., 2021).

Con el nacimiento de la implantología moderna, la sustitución de dientes perdidos mediante implantes dentales adquiere cada vez más protagonismo en la práctica clínica diaria. Actualmente, la técnica del *Platform Switching* (aditamento protésico de menor diámetro que la plataforma del implante) ha demostrado ser efectiva para obtener un éxito clínico en cuanto a la pérdida ósea alrededor del implante, ya que consigue alejar tanto bacterias como infiltrado inflamatorio de la unión hueso-implante (Singh et al., 2013).

Se ha comprobado que el éxito de los implantes está determinado por los tejidos blandos alrededor de la restauración, al igual que en las rehabilitaciones dentosoportadas, lo que ha impulsado la aplicación de la filosofía BOPT a las rehabilitaciones implantoportadas (Solá-Ruiz et al., 2017).

A la vista de lo expuesto anteriormente, el objetivo de este trabajo es realizar una revisión de la literatura acerca de la aplicación del BOPT en las rehabilitaciones sobre implantes dentales y describir la técnica mediante un caso clínico.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo, se ha realizado una revisión de la literatura sin restricción de tiempo, empleando las bases de datos PubMed/MedLine, Scopus, Web of Science y Cochrane Library y una combinación de las siguientes palabras clave: “BOPT”, “Dental Implants” AND “Platform Switching”.

En el caso clínico se realizó la rehabilitación implantológica de un diente del sector estético anterior mediante la colocación de un implante inmediato con provisionalización inmediata.

### 3. RESULTADOS

Acude a la consulta una mujer de 74 años de edad demandando tratamiento para un diente con pronóstico imposible. Tras realizar la exploración extra e intraoral y las pruebas complementarias necesarias, se diagnosticó una fractura coronal en el diente 2.1, presentando un ferrule inferior a 2 mm, sin posibilidad de restaurarlo con métodos conservadores, por lo que está indicada la extracción del resto radicular y la rehabilitación mediante algún tipo de prótesis (Fontana et al., 2019).

La opción de tratamiento seleccionada fue la rehabilitación protésica sobre implantes inmediatos, siguiendo la técnica BOPT.

En primer lugar se realiza un CBCT del hueso maxilar de la paciente, donde se evidencia una disponibilidad ósea de: 19,1 mm de alto y 7,9 de ancho. El implante seleccionado para la rehabilitación del caso fue un implante PRAMA® Long Neck Root Form de 3,8x11,5mm de la casa comercial Sweden & Martina®. Este implante presenta una parte tratada de 11,5 mm y un cuello intramucoso de 3,8 mm.

El procedimiento se llevó a cabo empleando anestesia local (articaína 4% 1:100000). Tras la anestesia se realiza la exodoncia atraumática del resto radicular y el legrado minucioso del alveolo.

Se realiza la colocación del implante inmediato siguiendo la secuencia quirúrgica indicada por el fabricante. La longitud de fresado debe realizarse teniendo en cuenta que la parte más coronal del cuello intramucoso del implante debe quedar como mínimo a 1,5 mm del margen gingival más desfavorable (Grunder et al., 2005).

Una vez colocado el implante en su posición tridimensional correcta, se rellenó el “gap vestibular” (Tarnow et al., 2014) resultante empleando o Bio-Oss Collagen®, un biomaterial formado por un 90% de partículas de xenoinjerto bovino y un 10% de colágeno, cuya eficacia ha sido demostrada para la preservación de volumen y hueso tras la extracción dentaria (Keil et al., 2021).

Por último, se realizó la provisionalización inmediata del implante empleando la corona de la paciente, lo que permitió, no solo producir un sellado de la zona regenerada, sino también posicionar el margen gingival en su posición adecuada y generar un perfil de emergencia estético.

Para ello, se utilizó un pilar de titanio provisional atornillado al implante, sobre el que se rebasó la corona del paciente, previamente vaciada, con resina compuesta.

Una vez unido, se desatornilla el provisional y se atornilla a un análogo del implante para poder confeccionar los perfiles crítico y subcrítico del mismo mediante la adición de capas de composite fluido por encima de la porción intramucosa del implante.

Finalmente se atornilló de nuevo el pilar al implante, con la corona provisional, sellando el alveolo y creando una ligera isquemia.

### 4. DISCUSIÓN

La aplicación de la filosofía BOPT para la rehabilitación implantológica de un diente en la zona anterior del maxilar superior es efectiva para la consecución inmediata de un resultado estético.

Se ha demostrado que, tras la realización de una extracción dentaria sin realizar ningún tratamiento del alveolo, se produce una reabsorción del hueso alveolar debido a la disminución de la vascularización y la pérdida de función asociada a la presencia de este diente (Araújo & Lindhe, 2005).

Entre los métodos empleados para conservar el volumen y prevenir cambios en la cresta ósea, destacan la preservación alveolar y la colocación de implantes postextracción (Amato et al., 2018).

La colocación tridimensional correcta de los implantes postextracción ha sido ampliamente estudiada (Buser et al., 2004). Sin embargo, el empleo de implantes PRAMA requiere realizar ciertas modificaciones en la posición apicocoronal del implante y gracias a esto existe la posibilidad de reposicionar la línea de terminación protésica a diferentes niveles en el surco periimplantario. Abrahamson y cols. demostraron que las diferentes conexiones y desconexiones de aditamentos protésicos pueden producir una reabsorción del tejido óseo periimplantario de hasta 1,5 mm y producir una migración apical de la encía (Abrahamsson, 1997). Es por esta razón por la que los implantes PRAMA se deben colocar 1,5 mm por debajo del margen gingival más desfavorable, consiguiendo alejar las desconexiones de la parte tratada del implante, eliminando la contaminación bacteriana y preservando los tejidos duros y blandos periimplantarios. De mismo modo, diferentes estudios han demostrado que el espacio biológico de tejido conectivo alrededor de los implantes es de 3-4mm, por eso, los implantes PRAMA han sido específicamente diseñados con un cuello transmucoso pulido para garantizar la estabilidad de los tejidos blandos supracrestales (Zheng et al., 2021; Solá-Ruiz et al., 2017)

Sin embargo, para poder conseguir resultados óptimos se debe combinar la colocación de estos implantes con un pilar customizado o la realización de un provisional inmediato que guíe la cicatrización del tejido blando alrededor de la parte pulida del implante.

La colocación del provisional inmediato, junto con el implante y los tejidos duros y blandos remanentes delimitan un espacio o cámara de regeneración o cámara biológica. Este espacio o gap vestibular debe ser rellenado con un biomaterial que permita la formación de nuevos tejidos duros y blandos. El material de elección para el relleno de este espacio es el xenoinjerto bovino desproteínizado. En este caso se ha empleado Bio-Oss Collagen®, debido a su capacidad para producir la regeneración tisular mediante un tejido densificado y con mayor volumen, proporcionando mayor estabilidad al injerto y mejorando todas las propiedades del Bio-Oss® (Keil et al., 2021).

La aplicación clínica de la técnica del BOPT en rehabilitaciones implantosoportadas, no solo requiere la colocación de un provisional inmediato sino una morfología adecuada del mismo. A la hora de diseñar el provisional, se deben tener en cuenta varios conceptos:

- Contorno crítico: zona inmediatamente apical al margen gingival. La morfología del contorno crítico determinará la posición del margen gingival, según la forma



que le demos. Una forma convexa del contorno crítico provocará una migración apical del margen, mientras que una forma cóncava provocará un crecimiento de los tejidos hacia coronal.

- Contorno subcrítico: zona entre el contorno crítico y el cuello del implante. Una forma cóncava estimula el crecimiento de los tejidos y su migración coronal, generando mayor volumen, mientras que una forma convexa provocará tejidos periimplantarios más finos (Huan Su et al., 2010).

De este modo, aplicando estos conceptos a los implantes PRAMA se podrían distinguir:

- Área aceleradora o BO (booster): corresponde al contorno subcrítico y se localiza en el cuello transmucoso del implante, cuya morfología convergente potencia el grosor de los tejidos y genera una migración coronal del margen gingival.
- Área freno o PT (Prop Tissue Up): corresponde al contorno crítico y se localiza en la corona provisional. Su función es mantener el margen gingival erguido para evitar el colapso y detener la migración coronal excesiva del margen gingival (Rodríguez et al., 2019).

## 5. CONCLUSIONES

La colocación de implantes PRAMA junto al empleo de un provisional customizado inmediato que siga la filosofía BOPT permite guiar la cicatrización de los tejidos para obtener mayor estabilidad de los tejidos periimplantarios y mejorar los parámetros clínicos y estéticos respecto a las rehabilitaciones tradicionales.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Abad-Coronel, C., Villacís Manosalvas, J., Palacio Sarmiento, C., Esquivel, J., Loi, I., & Pradiés, G. (2022). Clinical outcomes of the biologically oriented preparation technique (BOPT) in fixed dental prostheses: A systematic review. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2022.07.010>
- Abrahamsson, I. (1997). The mucosal barrier following abutment dis/reconnection An experimental study in dogs. *Journal of Clinical Periodontology*, 24(8), 568–572. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1997.tb00230.x>
- Agustín-Panadero, R., Serra-Pastor, B., Loi, I., Suárez, M. J., Pelaez, J., & Solá-Ruiz, F. (2021). Clinical behavior of posterior fixed partial dentures with a biologically oriented preparation technique: A 5-year randomized controlled clinical trial. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 125(6), 870–876. <https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2020.03.031>
- Amato, F., Polara, G., & Spedicato, G. (2018). Tissue Dimensional Changes in Single-Tooth Immediate Extraction Implant Placement in the Esthetic Zone: A Retrospective Clinical Study. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 33(2), 439–447. <https://doi.org/10.11607/jomi.6146>

- Araújo, M. G., & Lindhe, J. (2005). Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *Journal of Clinical Periodontology*, 32(2), 212–218. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2005.00642.x>
- Buser, D., Martin, W., & Belser, U. C. (2004). Optimizing esthetics for implant restorations in the anterior maxilla: anatomic and surgical considerations. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 19 Suppl(January), 43–61. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15635945>
- Carnevale G, Freni Sterran-tino S, Di Febo G. (1983). Soft and hard tissue wound healing following tooth preparation to the alveolar crest. *The international Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, 6: 37-53
- Fontana, P. E., Bohrer, T. C., Wandscher, V. F., Valandro, L. F., Limberger, I. F., & Kaizer, O. B. (2019). Effect of ferrule thickness on fracture resistance of teeth restored with a glass fiber post or cast post. *Operative Dentistry*, 44(6), E299–E308. <https://doi.org/10.2341/18-241-L>
- Grunder, U., Gracis, S., & Capelli, M. (2005). Influence of the 3-D bone-to-implant relationship on esthetics. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, 25(2), 113–119. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15839587>
- Huan Su, D., Oscar González-Martín, D., Arnold Weisgold, D., & Ernesto Lee, D. (2010). Considerations of Implant Abutment and Crown Contour : Critical Contour and Subcritical Contour. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, 30(4), 335–343.
- Keil, C., Gollmer, B., Zeidler-Rentsch, I., Gredes, T., & Heinemann, F. (2021). Histological evaluation of extraction sites grafted with Bio-Oss Collagen: Randomized controlled trial. *Annals of Anatomy*, 237, 151722. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2021.151722>
- Loi, I., & Di Felice, A. (2013). Biologically oriented preparation technique (BOPT): a new approach for prosthetic restoration of periodontically healthy teeth. *The European Journal of Esthetic Dentistry : Official Journal of the European Academy of Esthetic Dentistry*, 8(1), 10–23.
- Rodríguez, X., Vela, X., Segalà, M., Pérez, J., Pons, L., & Loi, I. (2019). Examen histológico humano de la respuesta de los tejidos al tallado vertical y provisionalización inmediata (BOPT). Fundamento biológico. *Periodoncia Clínica*, 46–58.
- Singh, R., Singh, S. V., & Arora, V. (2013). Platform switching: A narrative review. *Implant Dentistry*, 22(5), 453–459. <https://doi.org/10.1097/ID.0b013e31829b1777>
- Solá-Ruiz, M. F., Highsmith, J. D. R., Labaig-Rueda, C., & Agustín-Panadero, R. (2017). Biologically oriented preparation technique (BOPT) for implant-supported fixed prostheses. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 9(4), e603–e607. <https://doi.org/10.4317/jced.53703>
- Tarnow, D., Chu, S., Salama, M., Stappert, C., Salama, H., Garber, D., Sarnachiaro, G., Sarnachiaro, E., Gotta, S., & Saito, H. (2014). Flapless Postextraction Socket Implant Placement in the Esthetic Zone: Part 1. The Effect of Bone Grafting and/or Provisional Restoration on Facial-Palatal Ridge Dimensional Change—A Retrospective Cohort Study. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, 34(3), 323–331. <https://doi.org/10.11607/prd.1821>
- Zheng Zheng, Xiaogang Ao, Peng Xie, Fan Jiang, Wenchuan Chen (2021).The biological width around the implant. *Journal of Prosthodontic Research*, 65(April 2020), 340–345.

**76967: Técnica del bolsillo perióstico. Reporte de un caso // Periosteal Pocket Flap technique. A case report****Área de conocimiento:** ODONTOLOGÍA**Autor(es):** Elena Gutierrez**Tutor(es):** Oscar Iglesias Velázquez, Jesús Torres García-Denche**Universidad:** Universidad Complutense de Madrid**Facultad:** Facultad de Odontología**Titulación:** Grado en Odontología**Formato:** Comunicación Oral - Revisiones bibliográficas**Palabras Clave:** “Técnica del bolsillo periostio” “regeneración ósea horizontal” “rehabilitación implantológica” “periostio” “plasma rico en factores de crecimiento” “Periosteal pocket flap” “lateral ridge augmentation” “implant rehabilitation” “periosteal” “Plasma Rich

La reabsorción ósea horizontal localizada en el sector posterior mandibular compromete en numerosas ocasiones la colocación de implantes dentales en su posición correcta, por lo que se han desarrollado diferentes técnicas regenerativas para compensar estos defectos, entre las que se encuentra la técnica del bolsillo perióstico. El objetivo del trabajo es realizar una revisión de la literatura sobre la técnica del bolsillo perióstico (PPF) y su descripción mediante un caso clínico. Para ello se realiza una búsqueda bibliográfica en diversas bases de datos digitales. Además, se describe un caso clínico para explicar la técnica. Se planifica la colocación de un implante combinado con la técnica del bolsillo perióstico que nos permitirá la regeneración de defectos horizontales moderados empleando xenoinjerto junto con hueso autólogo y plasma rico en factores de crecimiento (PRGF). La ventaja de esta técnica es que el periostio actúa como una membrana biológica y junto al empleo de hueso autólogo y el PRGF mejoran las propiedades regenerativas de la técnica. Este procedimiento supone una alternativa sencilla, barata y rápida para casos que requieren un aumento óseo horizontal moderado.

Horizontal bone resorption localized in the posterior mandibula compromises the placement of dental implants in their correct position, so different regenerative techniques have been developed to make up these defects, one of these is the periosteal pocket flap (PPF). The objective of this paper is to carry out a review of the literature on the periosteal pocket flap (PPF) and its description through a clinical case. For it, a bibliographic search is carried out in different digital databases. In addition, a clinical case is described to explain the technique. The placement of an implant combined with the periosteal pocket flap is planned, which will allow us to regenerate moderate horizontal defects using xenograft with autologous bone and plasma rich in growth factors (PRGF). The advantage of this technique is that the periosteum acts as a biological membrane and with the use of autologous bone and PRGF improve the regenerative properties of the technique. This procedure is a simple, cheap and fast alternative for cases that require moderate horizontal bone augmentation.

## Técnica del bolsillo perióstico. Reporte de un caso // Periosteal Pocket Flap technique. A case report

- 1522672 Elena Gutiérrez Muñoz, [elegut05@ucm.es](mailto:elegut05@ucm.es)
- Tutor: Óscar Iglesias Velázquez, [osiglesi@ucm.es](mailto:osiglesi@ucm.es)
- Tutor: Jesús Torres García-Denche, [jesus.torres@ucm.es](mailto:jesus.torres@ucm.es)
- Facultad Odontología, Universidad Complutense de Madrid
- Resumen: La reabsorción ósea horizontal localizada en el sector posterior mandibular compromete en numerosas ocasiones la colocación de implantes dentales en su posición correcta, por lo que se han desarrollado diferentes técnicas regenerativas para compensar estos defectos, entre las que se encuentra la técnica del bolsillo perióstico. El objetivo del trabajo es realizar una revisión de la literatura sobre la técnica del bolsillo perióstico (PPF) y su descripción mediante un caso clínico. Para ello se realiza una búsqueda bibliográfica en diversas bases de datos digitales. Además, se describe un caso clínico para explicar la técnica. Se planifica la colocación de un implante combinado con la técnica del bolsillo perióstico que nos permitirá la regeneración de defectos horizontales moderados empleando xenoinjerto junto con hueso autólogo y plasma rico en factores de crecimiento (PRGF). La ventaja de esta técnica es que el periostio actúa como una membrana biológica y junto al empleo de hueso autólogo y el PRGF mejoran las propiedades regenerativas de la técnica. Este procedimiento supone una alternativa sencilla, barata y rápida para casos que requieren un aumento óseo horizontal moderado.
- Abstract: Horizontal bone resorption localized in the posterior mandibula compromises the placement of dental implants in their correct position, so different regenerative techniques have been developed to make up these defects, one of these is the periosteal pocket flap (PPF). The objective of this paper is to carry out a review of the literature on the periosteal pocket flap (PPF) and its description through a clinical case. For it, a bibliographic search is carried out in different digital databases. In addition, a clinical case is described to explain the technique. The placement of an implant combined with the periosteal pocket flap is planned, which will allow us to regenerate moderate horizontal defects using xenograft with autologous bone and plasma rich in growth factors (PRGF). The advantage of this technique is that the periosteum acts as a biological membrane and with the use of autologous bone and PRGF improve the regenerative properties of the technique. This procedure is a simple, cheap and fast alternative for cases that require moderate horizontal bone augmentation.
- Palabras clave: “Técnica del bolsillo periostio” “regeneración ósea horizontal” “rehabilitación implantológica” “periostio” “plasma rico en factores de crecimiento”  
“Periosteal pocket flap” “lateral ridge augmentation” “implant rehabilitation” “periosteal” “Plasma Rich in Growth Factors”

## Introducción

La pérdida dentaria provoca una serie de cambios dimensionales sobre la cresta alveolar, generando una reabsorción ósea debido a la disminución de la vascularización y la pérdida de función asociada a la presencia de los dientes (Araujo 2005). La sustitución de estos dientes mediante implantes dentales puede verse comprometida debido a la ausencia de hueso en sentido horizontal o vertical (Esposito 2009)

Debido a esto en muchas situaciones clínicas es necesario recurrir a diferentes procedimientos regenerativos, ya sea de forma previa o simultánea a la colocación de implantes dentales (McAllister 2007). Actualmente, la regeneración ósea guiada (ROG) realizada mediante la combinación de sustitutos óseos con membranas reabsorbibles o no reabsorbibles es la técnica más empleada entre estos procedimientos (Jung 2013). Entre todos los materiales de injerto empleados, el hueso autólogo constituye el “gold standard” (Stevenson 1999). A pesar de todo esto, las técnicas de ROG no están exentas de inconvenientes y complicaciones, entre las que se encuentran la rápida reabsorción del injerto autólogo, dehiscencias de los tejidos blandos, etc (Sanz-Sánchez 2022). Debido a esto, se han desarrollado técnicas alternativas que mejoran y evitan las desventajas mencionadas previamente.

Una de las técnicas descritas en la literatura para compensar defectos horizontales en la región mandibular, es la descrita por Steigmann et al. en 2012 para la regeneración de defectos horizontales moderados: la técnica del bolsillo perióstico (periosteal pocket flap, PPF). Esta técnica consiste en la realización de una incisión paracrestal vestibular y la realización de un colgajo mucoso. Posteriormente se despega el periostio y se realiza la regeneración ósea introduciendo un xenoinjerto entre la cortical vestibular y el periostio que actuará como una membrana manteniendo estable el injerto (Steigmann 2012).

Sin embargo, esta técnica también presenta algunos inconvenientes. A pesar de la capacidad osteoconductiva del xenoinjerto, carece de propiedades osteoinductivas y osteogénicas (Oryan 2014). Debido a esto, numerosos autores han descrito el empleo de otros biomateriales que mejoren estas propiedades. En este sentido, en 2022 Iglesias-Velázquez et al. describen una modificación de esta técnica consistente en el desplazamiento de la incisión vestibular hacia crestal y el empleo de Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF) junto con partículas de xenoinjerto y autoinjerto, realizando la regeneración ósea horizontal de manera simultánea a la colocación de los implantes (Iglesias-Velázquez 2022).

El objetivo de este trabajo es realizar una revisión de la literatura acerca de la técnica del bolsillo perióstico y su descripción mediante un caso clínico.

## Material y métodos

Para la realización de este trabajo se ha realizado una revisión de la literatura en las siguientes bases de datos: PubMed/MedLine, Scopus, web of Science y Cochrane Library, empleando como palabras clave “Lateral ridge augmentation” y “Periosteal Pocket Flap”. Se incluyeron estudios publicados en revistas de impacto, sin restricción de fecha y escritos en inglés y español.

El caso clínico describe la rehabilitación implantológica de un sector posterior mandibular mediante la colocación de implantes dentales simultáneos a la realización de la técnica del bolsillo perióstico para la regeneración de un defecto horizontal moderado.

### Resultados

Paciente mujer que acude a la consulta refiriendo como motivo de consulta: “me quitaron un diente hace tiempo y quisiera ponerme un implante”. Se realiza la historia clínica y las pruebas complementarias necesarias (exploración, modelos de estudio, fotografías, radiografías, CBCT) para la planificación.

Durante este proceso se observa que el paciente sufre un defecto horizontal en el tramo edéntulo a rehabilitar que compromete la colocación del implante en su posición ideal, quedando ligeramente expuesto en su cara vestibular. Debido a esta situación, se decide realizar la colocación del implante y una regeneración ósea simultánea para cubrir las espiras expuestas, empleando como técnica regenerativa el bolsillo perióstico.

En primer lugar se realiza la anestesia del paciente, empleando para ello empleando 4 carpules de articaína al 4% con adrenalina 1:100.000 y realizando un bloqueo anestésico de los nervios dentario inferior y bucal.

De forma paralela a la anestesia, se realiza la extracción de sangre al paciente para la obtención del PRGF siguiendo el protocolo descrito por el Dr. Anitua. Para ello se centrifuga la sangre extraída del paciente a una velocidad de 580 G durante 8 minutos, obteniendo la sangre queda dividida en tres fases. Una fase superior formada por plasma pobre en factores de crecimiento, una fase media formada por plasma rico en factores de crecimiento y una fase inferior compuesta por glóbulos rojos. Se aspiran las dos partes superiores (teniendo en cuenta que en la parte más cercana a los glóbulos rojos que tendrá un número elevado de leucocitos) y se mezcla con cloruro cálcico ( 50 µL) para su activación (paso de fibrinógeno a fibrina) que tarda unos 5 o 10 minutos y mientras se comienza la preparación del lecho para el fresado biológico: (80-100 rpm) y sin irrigación para la obtención de hueso autólogo.

Tras la anestesia local, se realiza una incisión crestal a espesor parcial, junto con extensiones intrasurculares en los dientes adyacentes a la brecha. Posteriormente se eleva un colgajo mucoso vestibular, despegando la mucosa del periostio sobrepasando la línea mucogingival. Una vez obtenido el colgajo a espesor parcial se realiza una incisión a espesor total en la misma línea que la primera para despegar el periostio vestibular y formar el bolsillo y elevar un colgajo mucoperiostico en la porción lingual de la brecha. De este modo, en la porción vestibular del campo quirúrgico se distinguen 3 capas: mucosa, periostio y cortical vestibular.

Una vez preparado el campo se procede al fresado del lecho implantario, empleando para ello el protocolo de fresado biológico descrito por el Dr. Anitua. Este protocolo consiste en la preparación del lecho alveolar a bajas revoluciones (80-100 rpm) y sin irrigación, lo que nos permitirá evitar la isquemia, manteniendo el hueso en unas condiciones óptimas para recibir el implante (Anitua 2007) y, además, de obtener hueso autólogo vivo sin necesidad de realizar técnicas adicionales. El implante seleccionado para este caso fue un implante de la casa Zimmer TSV 4,7 x 10 mm.

Tras la colocación de los implantes, se procede al relleno del bolsillo creado con el material de injerto. En este caso se empleó una mezcla de partículas de hueso autólogo mezcladas con partículas de xenoinjeto, todo ello mezclado con el PRFG.

Una vez completado el relleno, se procede a la sutura. Se realiza en dos fases. En primer lugar se realiza un punto en T que va desde el periostio vestibular hasta el periostio lingual, empleando para ello sutura reabsorbible de 4/0. Una vez suturado el periostio, se sutura la mucosa vestibular al colgajo lingual mediante puntos de colchonero y puntos simples con sutura no reabsorbible de 4/0. Pasados 10 días se retira la sutura y se revisa la herida.

### Discusión

La regeneración ósea se basa en el principio de la regeneración tisular guiada descrita por Melcher en 1976, que fundamenta la exclusión celular como fin para la obtención de una regeneración exitosa (Wang 2006). Estos principios biológicos de los que se regirá la regeneración se denominan "PASS Principles" y fueron descritos por Wang en 2006:

*Primary closure / cierre primario*: cicatrización por primera intención, es decir, aproximación de los bordes quirúrgicos de manera precisa en la posición que ocupaban previamente, para favorecer la presencia del injerto en un ambiente inalterado de factores mecánicos o bacterianos favoreciendo la regeneración. Además, el cierre pasivo (sin tensión) permitirá una cicatrización con menos epitelialización, formación de colágeno y remodelado. *Angiogenesis / angiogénesis*: formación del coágulo sanguíneo en el espacio creado entre la superficie del implante y el material de regeneración. El coágulo irá transformándose en tejido de granulación gracias a la acción de los neutrófilos y macrófagos. La gran vascularización de este tejido será clave para la formación osteoide y la posterior formación ósea. *Space creation-maintenance / mantenimiento-creación de espacio*: creación de espacio para la proliferación de las células osteogénicas y exclusión de las células del tejido epitelial y conectivo. *Stability/estabilidad*: el uso de membranas o métodos de barrera serán necesarios para estabilizar el coágulo que a su vez, será fundamental para la cicatrización de la herida y la formación del tejido de granulación. (Wang 2006). La técnica del bolsillo perióstico cumple estos principios, por lo que permitirá una adecuada regeneración ósea horizontal (Steigmann 2012, Iglesias-Velázquez 2022).

La característica principal de la técnica del bolsillo perióstico es el uso del periostio como membrana biológica, evitando el uso de otro tipo de membrana y, por lo tanto, disminuyendo el costo de la intervención y mejorando la capacidad regenerativa del injerto (Iglesias-Velázquez 2022). El periostio es una fina lámina de tejido conectivo especializado abundantemente innervado y vascularizado que cubre la mayoría de los huesos del cuerpo. Está formado por dos capas: una interna o *cambium* compuesta por vasos sanguíneos, osteoblastos, células preosteoblasticas y células madre mesenquimales, esta capa del periostio aportará la capacidad regenerativa; y la capa externa o *fibrous* formada por colágeno, dispuesto según el eje longitudinal óseo, y elastina que aportarán las propiedades mecánicas, es decir, tendrá unas propiedades de barrera (Evans 2013). Esta capa servirá como sustitutivo a las membranas de colágeno nativo porcino, que aún con sus excelentes cualidades, tienen una rápida velocidad de degradación (de 8 a 24 semanas) y rigidez complicando su manejo durante la intervención quirúrgica (Rothamel 2005). En cambio, el periostio presenta una gran elasticidad debido a su

capa externa (Bertram 1998), permitiendo lograr un cierre primario y sin tensión de la herida quirúrgica, además de ser biológico y constante en el tiempo, sin ninguna degradación, permitiendo una mayor contención del injerto usado (Iglesias-Velázquez 2022). La inflamación que se produce como consecuencia de la sección y separación del periostio produce la activación de las células presentes en las diferentes capas, estimulando los procesos de osteogénesis y angiogénesis (Evans 2013). Por lo tanto, esta técnica permitirá prescindir de las membranas y elementos de retención (pines, chinchetas,...) presentándose como una técnica quirúrgica más económica, sencilla y rápida (Iglesias-Velázquez 2022).

La combinación de PRGF con xenoinjerto y hueso autólogo obtenido mediante el fresado biológico y PRGF, aportará grandes ventajas a la técnica (Iglesias-Velázquez 2022). El xenoinjerto aporta la propiedad de osteoconducción (es decir, actúa como un andamio para que la regeneración se produzca sobre él) y el autoinjerto las de osteoinducción (se produce una formación ósea inducida, se reclutan células inmaduras y se estimula su diferenciación) y osteogénesis (capacidad de producir hueso nuevo); de las cuales carece el xenoinjerto suponiendo por lo tanto una gran mejora de la técnica (Albrektsson 2001). A su vez, el conglomerado de PRGF unido a estos biomateriales permitirá una formación de matriz tridimensional de fibrina que retendrá los factores de crecimiento y los liberará lentamente mejorando la cicatrización de la herida quirúrgica y disminuyendo el dolor y la inflamación (Anitua 2012). Pero la propiedades más importante que nos aportará el conglomerado será la prevención de los movimientos del injerto (junto con el periostio que actúa como una barrera biológica), aportando estabilidad y facilidad de manejo del material permitiendo un mejor proceso regenerativo (Lin 2013), además de describir una técnica más sencilla, rápida y económica (Iglesias-Velázquez 2022).

### Conclusiones

la técnica del bolsillo perióstico unida al empleo de xenoinjerto, autoinjerto y PRGF, supone una alternativa para la regeneración ósea horizontal en casos de defectos óseos moderados mandibulares, siendo una técnica q más sencilla, económica y rápida tanto para el profesional como para el paciente.

### Bibliografía

1. Albrektsson T., Johansson C. (2001). Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *European Spine Journal*, 10(0), S96-S101. <https://doi.org/10.1007/s005860100282>
2. Anitua, E., Alkhraisat, M. H., & Orive, G. (2012). Perspectives and challenges in regenerative medicine using plasma rich in growth factors. *Journal of Controlled Release*, 157(1), 29-38. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.07.004>
3. Anitua, E., Carda, C., & Andia, I. (2007). A novel drilling procedure and subsequent bone autograft preparation: a technical note. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 22(1), 138-145.
4. Araujo, M. G., & Lindhe, J. (2005). Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *Journal of Clinical Periodontology*, 32(2), 212-218. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.2005.00642.x>



5. Bertram, J., Polevoy, Y., & Cullinane, D. (1998). Mechanics of Avian Fibrous Periosteum: Tensile and Adhesion Properties During Growth. *Bone*, 22(6), 669-675. [https://doi.org/10.1016/s8756-3282\(98\)00035-0](https://doi.org/10.1016/s8756-3282(98)00035-0)
6. Esposito, M., Grusovin, M. G., Felice, P., Karatzopoulos, G., Worthington, H. V., & Coulthard, P. (2009). Interventions for replacing missing teeth: horizontal and vertical bone augmentation techniques for dental implant treatment. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. <https://doi.org/10.1002/14651858.cd003607.pub4>
7. Evans, S. F., Chang, H., & Knothe Tate, M. L. (2013). Elucidating Multiscale Periosteal Mechanobiology: A Key to Unlocking the Smart Properties and Regenerative Capacity of the Periosteum? *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 19(2), 147-159. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2012.0216>
8. Jung, R. E., Fenner, N., Hämmerle, C. H. F., & Zitzmann, N. U. (2013). Long-term outcome of implants placed with guided bone regeneration (GBR) using resorbable and non-resorbable membranes after 12-14 years. *Clinical Oral Implants Research*, 24(10), 1065-1073. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2012.02522.x>
9. Iglesias-Velázquez, S., Zamora, R. S., López-Pintor, R. M., Tresguerres, F. G., Berrocal, I. L., García, C. M., Tresguerres, I. F., & García-Denche, J. T. (2022). Periosteal Pocket Flap technique for lateral ridge augmentation. A comparative pilot study versus guide bone regeneration. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 243, 151950. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2022.151950>
10. Lin, Z., Fateh, A., Salem, D., & Intini, G. (2013). Periosteum. *Journal of Dental Research*, 93(2), 109-116. <https://doi.org/10.1177/0022034513506445>
11. McAllister, B. S., & Haight, K. (2007). Bone Augmentation Techniques. *Journal of Periodontology*, 78(3), 377-396. <https://doi.org/10.1902/jop.2007.060048>
12. Melcher, A. H. (1976). On the Repair Potential of Periodontal Tissues. *Journal of Periodontology*, 47(5), 256-260. <https://doi.org/10.1902/jop.1976.47.5.256>
13. Oryan, A., Alidadi, S., Moshiri, A., & Maffulli, N. (2014). Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/1749-799x-9-18>
14. Rothamel, D., Schwarz, F., Sager, M., Hertel, M., Sculean, A., & Becker, J. C. (2005). Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes: an experimental study in the rat. *Clinical Oral Implants Research*, 16(3), 369-378. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2005.01108.x>
15. Sanz-Sánchez, I., Sanz-Martín, I., Ortiz-Vigón, A., Molina, A. I. P., & Sanz, M. (2022). Complications in bone-grafting procedures: Classification and management. *Periodontology 2000*, 88(1), 86-102. <https://doi.org/10.1111/prd.12413>
16. Steigmann, M., Salama, M., Wang, H.-L., 2012. Periosteal pocket flap for horizontal bone regeneration: a case series. *Int. J. Periodontics Restor. Dent.* 32, 311–320. <https://doi.org/10.11607/prd.00.1072>
17. Stevenson, S. A. (1999). BIOLOGY OF BONE GRAFTS. *Orthopedic Clinics of North America*, 30(4), 543-552. [https://doi.org/10.1016/s0030-5898\(05\)70107-3](https://doi.org/10.1016/s0030-5898(05)70107-3)
18. Wang, H., & Boyapati, L. (2006). "PASS" Principles for Predictable Bone Regeneration. *Implant Dentistry*, 15(1), 8-17. <https://doi.org/10.1097/01.id.0000204762.39826.0f>

## 77039: Efectividad de los simuladores hápticos en el entrenamiento de la destreza manual en Odontología Conservadora. Haptic simulator effectiveness on manual dexterity training in Conservative Dentistry

**Área de conocimiento:** ODONTOLOGÍA

**Autor(es):** Alexandra Flesariu, Pablo Bayón Bayo, Sandra Baena Padrón, Blanca Calvo Rodriguez

**Tutor(es):** Sofía Folguera Ferrairó

**Universidad:** Universidad de Valencia

**Facultad:** Facultad de Medicina y Odontología

**Titulación:** Grado en Odontología

**Formato:** Comunicación Oral - Investigación clínica

**Palabras Clave:** Palabras clave: simulador háptico, cavidad dental, habilidad manual. Keywords: haptic simulator, dental cavity, manual dexterity.

### Resumen

Los simuladores hápticos se están introduciendo en las Facultades de Odontología como una herramienta de aprendizaje complementaria a las técnicas convencionales, aunque en la actualidad hay escasa investigación que demuestre su efectividad. Nuestro objetivo es comparar el efecto del uso del simulador háptico en la elaboración de cavidades terapéuticas con los métodos tradicionales.

30 estudiantes del tercer curso del Grado de Odontología fueron divididos en tres grupos: simulador háptico (S), dientes de resina (R) y mixto (M). Cada participante realizó un total de 6 cavidades oclusales en molares mandibulares, durante dos sesiones, empleando la herramienta de aprendizaje asignada e imitando un modelo ideal. En el caso del grupo M, en la primera sesión se empleó el simulador, y en la segunda dientes de resina. Por último, todos realizaron una cavidad oclusal en un premolar maxilar natural. Las cavidades iniciales y finales de cada participante, así como la del diente natural, fueron evaluadas en los parámetros de profundidad, extensión, regularidad del contorno, piso y paredes, y se realizó el análisis de ANOVA de un factor.

En los grupos S y R se observó una mejoría en la mayoría de los parámetros de la cavidad final respecto a la inicial, siendo mayor la diferencia en el grupo R. Sin embargo, el grupo M obtuvo peor puntuación en sus cavidades finales. Al comparar las cavidades realizadas en el diente natural, el grupo S obtuvo mejor puntuación en todos los parámetros excepto en la regularidad del piso, aunque no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos ( $p=0.130$ ).

El uso del simulador háptico para el entrenamiento de la destreza manual en Odontología Conservadora ha demostrado ser igualmente efectivo que la práctica en dientes de resina, incluso con una tendencia positiva al trasladar las habilidades adquiridas a la realización de cavidades en dientes naturales.

### Abstract

Haptic simulators are being introduced in dental schools as complementary learning tools to conventional techniques, nonetheless, there is scant research to demonstrate their effectiveness. We aim to compare the effect of the use of the haptic simulator in the preparation of therapeutic cavities with traditional methods.

30 third-year dental students were divided into three groups: haptic simulator (S), resin teeth (R), and mixed (M). Each participant performed a total of 6 occlusal cavities in mandibular molars, during two sessions, using the assigned learning tool and imitating an ideal model. In the case of M group, the simulator was used in the first session, and resin teeth in the second session. Finally, they all made an occlusal cavity in a natural maxillary premolar. The initial and final cavities of each participant, as well as the cavity in the natural tooth, were evaluated in the parameters of depth, extension, regularity of the contour, floor, and walls, and a one-factor ANOVA analysis was performed.

In the S and R groups, an improvement was observed in most of the parameters of the final cavity compared to the initial one, the difference being greater in the R group. However, the M group scored worse in their final cavities. When comparing the cavities made in the natural tooth, the S group scored better in all parameters except for the regularity of the floor, although no statistically significant differences were found between groups ( $p=0.130$ ).

The use of the haptic simulator for manual dexterity training in conservative dentistry has proven to be equally effective as practice on resin teeth, with even a positive trend when transferring the acquired skills to cavities in natural teeth.

## **Efectividad de los simuladores hápticos en el entrenamiento de la destreza manual en Odontología Conservadora**

### **Haptic simulator effectiveness on manual dexterity training in Conservative Dentistry**

Nº identificador del primer autor: Alexandra Flesariu, alexandra2402@yahoo.es

Nº identificador del segundo autor: Pablo Bayón Bayo, paubay14@gmail.com

Nº identificador del tercer autor: Sandra Baena Padrón, sandraeugeniabaena@gmail.com

Nº identificador del cuarto autor: Blanca Calvo Rodriguez, blnk02cr@gmail.com

Tutor: Sofía Folguera Ferrairó, folfeso@uv.es

Afiliaciones: Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Valencia.

#### **Resumen:**

Los simuladores hápticos se están introduciendo en las Facultades de Odontología como una herramienta de aprendizaje complementaria a las técnicas convencionales, aunque en la actualidad hay escasa investigación que demuestre su efectividad. Nuestro objetivo es comparar el efecto del uso del simulador háptico en la elaboración de cavidades terapéuticas con los métodos tradicionales.

30 estudiantes del tercer curso del Grado de Odontología fueron divididos en tres grupos: simulador háptico (S), dientes de resina (R) y mixto (M). Cada participante realizó un total de 6 cavidades oclusales en molares mandibulares, durante dos sesiones, empleando la herramienta de aprendizaje asignada e imitando un modelo ideal. En el caso del grupo M, en la primera sesión se empleó el simulador, y en la segunda dientes de resina. Por último, todos realizaron una cavidad oclusal en un premolar maxilar natural. Las cavidades iniciales y finales de cada participante, así como la del diente natural, fueron evaluadas en los parámetros de profundidad, extensión, regularidad del contorno, piso y paredes, y se realizó el análisis de ANOVA de un factor.

En los grupos S y R se observó una mejoría en la mayoría de los parámetros de la cavidad final respecto a la inicial, siendo mayor la diferencia en el grupo R. Sin embargo, el grupo M obtuvo peor puntuación en sus cavidades finales. Al comparar las cavidades realizadas en el diente natural, el grupo S obtuvo mejor puntuación en todos los parámetros excepto en la regularidad del piso, aunque no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos ( $p=0.130$ ).

El uso del simulador háptico para el entrenamiento de la destreza manual en Odontología Conservadora ha demostrado ser igualmente efectivo que la práctica en dientes de resina, incluso con una tendencia positiva al trasladar las habilidades adquiridas a la realización de cavidades en dientes naturales.

#### **Abstract:**

Haptic simulators are being introduced in dental schools as complementary learning tools to conventional techniques, nonetheless, there is scant research to demonstrate their effectiveness. We aim to compare the effect of the use of the haptic simulator in the preparation of therapeutic cavities with traditional methods.

30 third-year dental students were divided into three groups: haptic simulator (S), resin teeth (R), and mixed (M). Each participant performed a total of 6 occlusal cavities in mandibular molars, during two sessions, using the assigned learning tool and imitating an ideal model. In the case of M group, the simulator was used in the first session, and resin teeth in

the second session. Finally, they all made an occlusal cavity in a natural maxillary premolar. The initial and final cavities of each participant, as well as the cavity in the natural tooth, were evaluated in the parameters of depth, extension, regularity of the contour, floor, and walls, and a one-factor ANOVA analysis was performed.

In the S and R groups, an improvement was observed in most of the parameters of the final cavity compared to the initial one, the difference being greater in the R group. However, the M group scored worse in their final cavities. When comparing the cavities made in the natural tooth, the S group scored better in all parameters except for the regularity of the floor, although no statistically significant differences were found between groups ( $p=0.130$ ).

The use of the haptic simulator for manual dexterity training in conservative dentistry has proven to be equally effective as practice on resin teeth, with even a positive trend when transferring the acquired skills to cavities in natural teeth.

**Palabras clave:** simulador háptico, cavidad dental, habilidad manual.

**Keywords:** haptic simulator, dental cavity, manual dexterity.

## **Introducción**

El principal modelo de aprendizaje aplicado hasta la actualidad en Odontología es la realización de procedimientos clínicos sobre fantomas dentales, pero cuenta con múltiples limitaciones (v.gr. ausencia de tacto de tejidos dentales y carácter finito del tipodonto). Como respuesta a estos problemas, se está implementando el sistema de los simuladores hápticos, una herramienta mediante la cual un individuo puede hacer uso del tacto, tomando en cuenta la presión y textura, mediado por un ordenador y haciendo uso de la realidad virtual. (Baldarrago, A. V., 2021).

Hay una gran variedad de marcas que han comercializado simuladores hápticos para su uso en Odontología, dentro de las cuales podemos encontrar algunas como: *DentSim*, *Virtual*, *SimtoCare*, *Voxel-Man* y *VirTeaSy*, *Simodont Dental Trainer*, *iDental* y *Periosim* los cuales presentan distintos modelos de presentación, y se especializan en distintos campos (Li, Y., Ye, H., Ye, F., Liu, Y., Lv, L., Zhang, P., Zhang, X., & Zhou, Y., 2021). Sin embargo, hasta el momento, hay una gran escasez de estudios realizados, que comprueben la efectividad de nuevos métodos de aprendizaje en el campo odontológico.

Por ello, nuestro objetivo es conocer la efectividad del uso del simulador háptico en la elaboración de cavidades terapéuticas en comparación con la técnica de aprendizaje convencional, que es el uso de dientes de resina. La hipótesis nula es que no hay diferencias en la calidad de las preparaciones cavitarias entre los estudiantes que entrenan mediante el uso de simuladores y los que entrenan con dientes de resina.

## **Material y métodos**

Para la selección de los participantes del estudio, se determinó que para poder participar era necesario estar cursando la asignatura de "Patología dental, odontología conservadora y endodoncia I" en la Universitat de València sin haber realizado con anterioridad cavidades dentales. De los 68 estudiantes matriculados en dicha asignatura, 30 de los que cumplían con los criterios mostraron interés en la participación en el estudio. Se planteó un estudio experimental controlado no aleatorizado. Los 30 participantes fueron divididos en tres grupos, según el método de aprendizaje a utilizar para la realización de cavidades: el grupo experimental (S) practicó utilizando exclusivamente el simulador háptico; el grupo control 1 (R) con dientes de resina; y el grupo control 2 (M) combinó el uso del simulador háptico con la realización de cavidades en dientes de resina. A cada grupo se asignaron 10 personas.

El estudio se llevó a cabo durante los meses de noviembre y diciembre de 2022 en las instalaciones de la Facultat de Medicina i Odontologia de la Universitat de València. Todos los participantes firmaron un documento de consentimiento informado y compromiso de confidencialidad, además de un consentimiento para la toma de imágenes y autorización para su uso.

Cada participante entrenó durante dos sesiones (separadas por 7 días) mediante la realización de 6 cavidades oclusales en molares mandibulares, empleando el método asignado según su grupo. En las explicaciones previas a cada sesión, se mostró ejemplos de modelos ideales (fig. 1). Los grupos S y M hicieron uso del simulador háptico *SIMtoCARE Dente*, concretamente se seleccionó el caso "Oper 05", un molar mandibular con una lesión de caries oclusal en la que se podía percibir una sensación táctil diferente para esmalte, dentina y la lesión cariosa. Por lo que respecta a la realización de cavidades en dientes de resina, el

instrumental que utilizaron los estudiantes de los grupos M y R fue: turbina MK-dent GmbH (Bargteheide, Alemania), fresa 822.314 008 de la marca Komet y dientes de resina de la marca Jingoal, a los que se les confeccionó una base mediante yeso.



Fig. 1. A la izquierda, imagen de la cavidad ideal que se mostró a los participantes como referencia antes de realizar las sesiones con el simulador háptico. A la derecha, imagen de una cavidad ideal en un diente de resina.

Tras la finalización de la segunda sesión, los estudiantes de todos los grupos realizaron una cavidad oclusal en un premolar maxilar natural en igualdad de condiciones: misma distancia de trabajo, un tiempo máximo de 15 minutos para la realización de la cavidad y mismo instrumental (mencionado anteriormente).

Por cada grupo se evaluó la cavidad inicial y la cavidad final, es decir, la primera y la sexta. La evaluación la realizaron 3 investigadores, dos estudiantes y una profesora, de manera independiente y a ciegas. Para la evaluación, para cada criterio se asignó 1 punto si se cumplía dicho criterio y un 0 de no cumplirse. (tabla 2).

Criterios	0	1
Extensión	La cavidad invade la cresta marginal mesial y/o distal; la cavidad invade las cúspides; la cavidad tiene una extensión insuficiente y no ha eliminado el tejido infectado.	La cavidad tiene una extensión suficiente y no ha invadido las crestas marginales mesial y distal; tampoco ha invadido las cúspides.
Profundidad	Profundidad insuficiente, no se ha eliminado todo el tejido infectado. Se ha profundizado demasiado perforando el suelo de la cavidad, observándose la pulpa.	Se ha profundizado lo suficiente como para eliminar todo el tejido infectado sin alcanzar la pulpa.
Contorno	Contorno irregular, con picos y salientes de esmalte no soportado por dentina.	Contorno regular.
Regularidad piso	Suelo de la cavidad irregular.	Suelo de la cavidad regular, al pasar la fresa se comprueba que es liso.
Regularidad paredes	Las paredes son irregulares.	Las paredes son regulares

Tabla 1. Criterios para la evaluación de las cavidades realizadas con el simulador.

Los criterios para la evaluación de los dientes de resina y los dientes naturales fueron los mismos que en el caso de los dientes del simulador, sin embargo, el criterio de profundidad, al no haber lesión de caries simulada, se consideró correcto cuando la cavidad tenía el tamaño de la parte activa de la fresa utilizada. En todos los casos, la puntuación máxima que podría alcanzar una cavidad era de 5, y la mínima de 0. Tras el registro de las puntuaciones de cada uno de los 3 examinadores, se obtuvo el promedio de las mismas por cada cavidad y criterio. Empleando estos resultados, para cada grupo se obtuvo la media, la mediana, el mínimo, el

máximo y la desviación estándar de las puntuaciones de las cavidades iniciales, finales y las del diente natural. Se realizó el análisis de ANOVA de un factor para conocer si había diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, y se estableció que el nivel de significancia fuera de 0.05.

### Resultados

El estudio inicialmente contaba con 30 participantes, pero finalmente acudieron a todas las sesiones 26, siendo 8 del grupo S, 9 del grupo M y 9 del grupo R.

En la tabla 3 se observan los resultados de los participantes del grupo S. Podemos apreciar que la nota media de la cavidad en diente natural mejora 1 punto respecto a la nota de la cavidad inicial. Sin embargo, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre las cavidades ( $p=0,1228$ ). En la tabla 3 se expone la puntuación media obtenida por el grupo S en cada criterio de evaluación. En la cavidad inicial se obtuvo la peor puntuación en la regularidad del piso (0,38), y la máxima puntuación en la profundidad (0,54). En la realización de la cavidad final, se consiguen mejores puntuaciones en todos los criterios excepto en el contorno (0,25), siendo nuevamente en la profundidad en la que se obtiene la mejor puntuación (0,67).

Simtocare	Cavidad inicial	Cavidad final	Diente natural		
Media	2,33	2,58	3,33		
Mediana	2,17	2,83	3,83		
Mínimo	0,67	0,33	0,00		
Máximo	4,00	4,33	5,00		
Dev. Estándar	1,23	1,67	1,55		
Tabla resumen resultados grupo simtocare por ítem evaluado					
	Extensión	Profundidad	Contorno	Reg. piso	Reg. paredes
Cavidad inicial	0,50	0,54	0,42	0,38	0,50
Cavidad final	0,54	0,67	0,25	0,54	0,58
Examen	0,50	0,63	0,88	0,50	0,83

Tabla 2. Resumen resultados grupo experimental (S).

En cuanto al grupo M, que realizó su primera cavidad en el simulador, obtuvo en esta una puntuación media de 2,70 sobre 5. En la cavidad final, realizada en diente artificial de resina, obtuvo una nota media de 2,07 sobre 5, y en la cavidad en diente humano un 3,04 sobre 5, pero no hay diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las tres cavidades ( $p=0,1980$ ). Valorando cada criterio de forma individual, vemos en la tabla 4 que, en la cavidad inicial, la menor puntuación se obtuvo en el contorno (0,22) y la más alta en la profundidad (0,74). En la cavidad final, solamente se obtuvo una ligera mejoría respecto a la cavidad inicial en los criterios de extensión (0,59) y contorno (0,26).

Mixto	Cavidad inicial	Cavidad final	Diente natural		
Media	2,70	2,07	3,04		
Mediana	3,00	1,67	3,33		
Mínimo	0,33	0,67	1,00		
Máximo	4,67	4,67	4,00		
Dev. Estándar	1,39	1,41	0,93		
Tabla resumen resultados grupo mixto por ítem evaluado					
	Extensión	Profundidad	Contorno	Reg. piso	Reg. paredes
Cavidad inicial	0,56	0,74	0,22	0,67	0,52
Cavidad final	0,59	0,52	0,26	0,52	0,19
Examen	0,44	0,48	0,67	0,78	0,67

Tabla 3. Resumen resultados grupo control 2 (M).

El grupo R, que realizó ambas cavidades en dientes artificiales de resina, obtuvo de media en la cavidad inicial un 2,59 sobre 5. En la cavidad final, la nota media obtenida fue de 3,70 sobre 5, sin embargo no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre cavidades ( $p=0,1720$ ). Valorando los ítems de forma individual, en la cavidad inicial, el criterio con menor puntuación es la regularidad del piso (0,30), y la máxima es la regularidad de las paredes (0,74). En la cavidad final, se consiguió una mejoría en todos los criterios, siendo también la regularidad de las paredes el parámetro mejor puntuado (0,85), como se puede observar en la tabla 5.

Resina	Cavidad inicial	Cavidad final	Diente natural		
Media	2,59	3,70	3,11		
Mediana	2,33	3,67	3,33		
Mínimo	1,67	2,33	0,67		
Máximo	4,67	5,00	5,00		
Desv. Estándar	0,92	0,81	1,21		
Tabla resumen resultados grupo resina por ítem evaluado					
	Extensión	Profundidad	Contorno	Reg. piso	Reg. paredes
Cavidad inicial	0,59	0,48	0,48	0,30	0,74
Cavidad final	0,78	0,78	0,59	0,70	0,85
Examen	0,41	0,48	0,70	0,74	0,78

Tabla 4. Resumen resultados grupo control 1 (R).

Se observa que la puntuación más alta en el diente humano la obtuvo el grupo S (3,33), y la más baja el grupo M con un (3,04). Como resultado del análisis de ANOVA de un factor, la estadística F de 2.197 indicó que hay diferencias entre los grupos, pero el valor p de 0.1309 sugirió que estas diferencias no son estadísticamente significativas, al ser el valor p mayor a 0.05. En el gráfico de la figura 6 se puede observar que el grupo S obtuvo mejor puntuación que los otros grupos en todos los criterios, exceptuando la regularidad del piso, único criterio en el que el grupo M superó al resto.

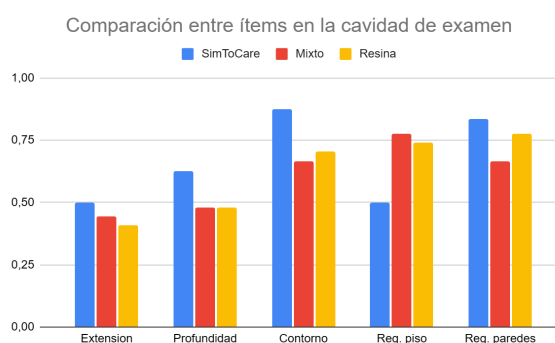


Figura 5. Gráfica resumen de los ítems evaluados en diente natural por grupos.

## Discusión

Los estudiantes que practicaron únicamente con simulador háptico son los que han obtenido mejor puntuación en la realización de cavidades en dientes naturales, a pesar de que el grupo que practicó con dientes de resina fue el que obtuvo la mayor mejoría en sus cavidades finales. Estos resultados pueden deberse a que la sensación táctil de los tejidos dentales del simulador es más parecida a la del diente natural. A pesar de esta tendencia positiva, no se han hallado diferencias estadísticamente entre los distintos grupos, y nuestros



resultados coinciden con los de otros estudios: concluyen con el requerimiento de ampliar la investigación al respecto.

La presente investigación ha sido limitada por el número de participantes, la organización de las sesiones y reparto de los participantes por grupos. Otro reto incluye: la estandarización de la dificultad de las cavidades realizadas en el simulador y en los dientes de resina (los dientes de resina no presentan lesión de caries), en opinión de los investigadores, la cavidad de los simuladores presentaba mayor dificultad; no obstante, en los dientes naturales, todos contaban con la misma dificultad.

La evaluación se llevó a cabo teniendo en cuenta los criterios de extensión, profundidad, contorno y regularidad de piso y paredes de la cavidad, y la valoración de estos criterios quedó en manos de investigadores del propio estudio. Estos investigadores no son vastos conocedores de la materia y continúan formándose en la actualidad, por lo que la elección de profesionales con más experiencia podría haber supuesto unos resultados distintos.

En cuanto a la mejoría de la calidad de las cavidades después de su repetición, se esperaba que hubiera un cambio notable en la confección de la cavidad final respecto a la inicial, pero en algunos sujetos el resultado ha sido el contrario. Esto podría explicar el cansancio sufrido por el alumnado a lo largo de la sesión.

### **Conclusión**

La hipótesis nula es aceptada, es decir, no existen diferencias estadísticamente significativas en la calidad de las preparaciones cavitarias entre los estudiantes que entrenan mediante el uso de simuladores y los que entrenan con dientes de resina, por lo que se demuestra que el uso de simuladores hápticos como herramienta de aprendizaje en Odontología Conservadora es útil, e incluso se observa una tendencia positiva al trasladar las habilidades adquiridas durante el entrenamiento con simuladores a la realización de cavidades en dientes naturales.

La aplicación de nuevas tecnologías en la docencia puede proporcionar un futuro muy prometedor, sobre todo para carreras sanitarias como lo es la Odontología, debido a la constante evolución de la práctica clínica. Por ello, incitamos a la ampliación de investigación en este campo.

### **Bibliografía**

1. Baldárrago, A. V. (2021). Simuladores hápticos: Una herramienta para la educación odontológica en tiempos de COVID-19. Revista Odontológica Basadrina. <https://revistas.unjbg.edu.pe/index.php/rob/article/view/1195/1380>
2. Li, Y., Ye, H., Ye, F., Liu, Y., Lv, L., Zhang, P., Zhang, X., & Zhou, Y. (2021). The current situation and future prospects of simulators in dental education. Journal of Medical Internet Research, 23(4), e23635. <https://doi.org/10.2196/23635>

**75789: Emulsiones lipídicas y reversión de cardiotoxicidad de bupivacaína versus ropivacaína en un modelo porcino****Área de conocimiento:** BIOLOGÍA**Autor(es):** Raquel Mirones Sánchez**Tutor(es):** Matilde Zaballos García, Elena Vázquez**Universidad:** Universidad Complutense de Madrid**Facultad:** Facultad de Ciencias Biológicas**Titulación:** Grado en Biología**Formato:** Comunicación Oral - Investigación clínica**Palabras Clave:** bupivacaína, ropivacaína, repolarización-ventricular, emulsiones-lipídicas, intralipid

Introducción: Los anestésicos locales (AL) como la bupivacaína y ropivacaína son ampliamente utilizados en la práctica clínica por sus innumerables ventajas. Su administración intravascular accidental puede ocasionar alteraciones electrofisiológicas debido a alteración de la repolarización ventricular (RV) desencadenando arritmias ventriculares e incluso parada cardíaca. La administración de emulsiones lipídicas intravenosas (ELI) como el intralipid (IL) se ha propuesto como antídoto en la intoxicación por AL. No existen datos acerca de la eficacia del IL en la recuperación de las alteraciones de la RV inducidas por ambos AL.

Introduction: Local anaesthetics (LA) such as bupivacaine and ropivacaine are widely used in clinical practice because of their countless advantages. Their accidental intravascular administration may cause electrophysiological alterations due to alteration of ventricular repolarisation (VR) triggering ventricular arrhythmias and even cardiac arrest. The administration of intravenous lipid emulsions (ILE) such as intralipid (IL) has been proposed as an antidote for LA poisoning. There are no data on the efficacy of IL in the recovery of both LA induced VR disturbances.

## **TÍTULO: Emulsiones lipídicas y reversión de cardiotoxicidad de bupivacaína versus ropivacaína en un modelo porcino**

### **TITTLE: Lipid emulsions and cardiotoxicity reversal of bupivacaine versus ropivacaine in a porcine model**

**Autor:** Raquel Mirones Sánchez ([raqmir01@ucm.es](mailto:raqmir01@ucm.es)); **Tutor 1:** Matilde Zaballos García ([matilde.zaballos@salud.madrid.org](mailto:matilde.zaballos@salud.madrid.org)) **Tutor 2:** Elena Vázquez ([elena23\\_va@hotmail.com](mailto:elena23_va@hotmail.com))

**Introducción:** Los anestésicos locales (AL) como la bupivacaína y ropivacaína son ampliamente utilizados en la práctica clínica por sus innumerables ventajas. Su administración intravascular accidental puede ocasionar alteraciones electrofisiológicas debido a alteración de la repolarización ventricular (RV) desencadenando arritmias ventriculares e incluso parada cardíaca. La administración de emulsiones lipídicas intravenosas (ELI) como el intralipid (IL) se ha propuesto como antídoto en la intoxicación por AL. No existen datos acerca de la eficacia del IL en la recuperación de las alteraciones de la RV inducidas por ambos AL.

**Material-métodos:** Se llevó a cabo la premedicación, anestesia, intubación e instrumentalización de 16 cerdos que fueron aleatorizados en dos grupos a los que se administró una dosis tóxica no letal de bupivacaína o ropivacaína. A los 3 minutos de la administración del AL, se infundió IL: 1,5 mg/kg en bolo + 0,25 mL/kg/min (durante 15 minutos). Se registraron parámetros de RV (QT, QTc, QT-Dispersión, TpTe; TpTec y TpTe-D) de forma basal, tras AL y en diferentes intervalos tras la ELI. Estadística: área bajo la curva (ABC), prueba de Mann-Whitney y de Wilcoxon.

**Resultados:** Se observaron cambios en la RV tras la administración de ambos AL. La bupivacaína alteró de forma significativa el intervalo TpTe, TpTec y la dispersión del TpTe; la ropivacaína alteró de forma significativa todos los parámetros de RV evaluados. La administración de ELI facilitó la recuperación de los parámetros de la RV en el grupo bupivacaína en comparación con la ropivacaína.

**Conclusiones:** En nuestro modelo experimental, la administración de ELI ha facilitado la recuperación de la toxicidad de parámetros de RV en el grupo bupivacaína frente a la ropivacaína. La liposolubilidad mayor de la bupivacaína puede facilitar los efectos reversores del IL.

**Palabras clave:** bupivacaína, ropivacaína, repolarización-ventricular, emulsiones-lipídicas, intralipid.

**Introduction:** Local anaesthetics (LA) such as bupivacaine and ropivacaine are widely used in clinical practice because of their countless advantages. Their accidental intravascular administration may cause electrophysiological alterations due to alteration of ventricular repolarisation (VR) triggering ventricular arrhythmias and even cardiac arrest. The administration of intravenous lipid emulsions (ILE) such as intralipid (IL) has been proposed as an antidote for LA poisoning. There are no data on the efficacy of IL in the recovery of both LA-induced VR disturbances.

**Material-methods:** Premedication, anaesthesia, intubation and instrumentation of 16 pigs were performed and randomised into two groups which were administered a non-lethal toxic dose of bupivacaine or ropivacaine. Within 3 minutes of LA administration, IL was infused: 1.5 mg/kg bolus + 0.25 mL/kg/min (over 15 minutes). VR parameters (QT, QTc, QT-Dispersion, TpTe; TpTec and TpTe-D) were recorded at baseline, after LA and at different intervals after ILE. Statistics: area under the curve (AUC), Mann-Whitney and Wilcoxon test.

**Results:** Changes in VR were observed after administration of both LAs. Bupivacaine significantly altered TpTe interval, TpTec and TpTe dispersion; ropivacaine significantly altered all VR

parameters assessed. ILE administration facilitated the recovery of VR parameters in the bupivacaine group compared to ropivacaine.

**Conclusions:** In our experimental model, ILE administration facilitated recovery of VR parameter toxicity in the bupivacaine group versus ropivacaine. The higher liposolubility of bupivacaine may facilitate the reversal effects of IL.

**Keywords:** bupivacaine, ropivacaine, ventricular repolarisation, lipid emulsions, intralipid.

## Introducción

Las técnicas de anestesia regional (AR) con la utilización de anestésicos locales (AL) aplicadas a la cirugía se han incrementado exponencialmente en los últimos años. Esto se debe a las indudables ventajas que presentan para los pacientes y los equipos quirúrgicos. Las ventajas reconocidas de la AR son múltiples: reducen el dolor postoperatorio, facilitan la movilización precoz, disminuyen los eventos tromboembólicos, acortan la estancia hospitalaria total, aumentan la satisfacción del usuario y reducen las complicaciones perioperatorias en su conjunto, así como los costes derivados (James; Heavner, 2017). Sin embargo, a pesar de su eficacia, el riesgo de toxicidad sistémica por AL es un problema recurrente desde su introducción en la práctica clínica. La posibilidad de una inyección accidental de AL puede ocurrir tanto en adultos como en niños y produce un espectro de complicaciones neurológicas y cardíacas con efectos potencialmente devastadores. La cardiotoxicidad de los AL se debe a sus efectos sobre la conducción cardíaca y facilitación de arritmias ventriculares malignas secundario al bloqueo de canales iónicos de sodio fundamentalmente, pero también afectan a otros iones como los de potasio y calcio. Como se ha estudiado anteriormente, la cardiotoxicidad asociada a la intoxicación accidental por AL es de muy difícil resucitación. (Mulroy, 2002). La bupivacaína y ropivacaína son AL de tipo amida ampliamente utilizados en la práctica clínica, que presentan como ventaja su larga duración de acción (James; Heavner, 2017). Tradicionalmente se ha considerado a la bupivacaina con un mayor riesgo de toxicidad que a la ropivacaína, aunque se han descrito eventos cardiovasculares graves con ambos agentes (Capogna, 1999; Lefrant, 2001). Si bien el principal mecanismo de toxicidad se debe a sus efectos en los canales de sodio, el bloqueo de los canales de potasio puede asociar alteraciones de la RV y prolongación del intervalo QT corregido (QTc), mecanismo que puede promover el desarrollo de taquiarritmias ventriculares como las "torsades de pointes" (TdP). Recientemente, la terapia con intralipid (IL) se ha utilizado como tratamiento para revertir la toxicidad grave por AL (Felice; Schuman, 2008). Sin embargo, no existen estudios que hayan comparado la eficacia del IL en la reversión de las alteraciones de la RV inducidos ambos anestésicos locales.

## Material y métodos

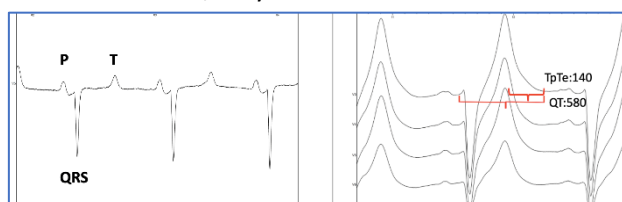
Tras su aprobación por el comité de ética animal realizó un estudio prospectivo y aleatorizado en la Unidad de Medicina y Cirugía Experimental (UMCE) del Hospital Universitario Gregorio Marañón de Madrid. Todos los animales recibieron el trato adecuado cumpliéndose con la normativa vigente. Se estudiaron 16 cerdos mini-pig que se mantuvieron en ayuno de sólidos durante las 10 horas previas al estudio permitiéndose el acceso libre al agua. Se administró ketamina intramuscular en dosis de 20 mg/kg como premedicación y cuando el animal presentaba un estado adecuado de sedación se trasladaba al área quirúrgica. En quirófano se canalizaba una vena del pabellón auricular para realizar la inducción anestésica con Tiopental Sódico en dosis de 5 mg/kg. El mantenimiento anestésico tras la intubación traqueal del animal se realizó con el anestésico inhalatorio Sevoflurano en una concentración del 2.6%. Los animales fueron sometidos a ventilación mecánica con oxígeno al 100% y el volumen minuto se

ajustaba para mantener una presión parcial arterial de CO<sub>2</sub> alrededor de 35-40 mmHg. Se monitorizó la SpO<sub>2</sub>, el CO<sub>2</sub> espirado y el ECG de 12 derivaciones mediante polígrafo [LABSYSTEM, polígrafo LABSYSTEM-PRO-40 canales. (BARD®-LS8900-Workstation)]. A continuación, se procedía a la instrumentación del animal mediante la canalización eco-guiada de las venas y arterias femorales, para la monitorización invasiva y las determinaciones analíticas durante el procedimiento. Al finalizar la instrumentalización y tras un periodo de estabilización se realizaba un registro ECG basal, y a continuación se procedía a la administración de una dosis en bolo de bupivacaína de 4 mg.kg<sup>-1</sup> o de ropivacaína de 5 mg.kg<sup>-1</sup> en 30 segundos. Estas dosis fueron escogidas porque se ha mostrado en otros modelos de estudio de cardiotoxicidad que asocian concentraciones plasmáticas superiores a 2000 ng.mL<sup>-1</sup>, las cuales inducen alteraciones electrofisiológicas intensas sin producir asistolia, con el deterioro consiguiente del animal. La dosis de ropivacaína se incrementó a 5 mg/ kg porque es ligeramente menos potente que la bupivacaína y en la práctica clínica se emplean dosis superiores de ropivacaína. A los tres minutos de administrar los AL, se administró IL con una dosis de 1,5 mg/kg en bolo, seguido de una infusión continua de 0,25 mL/kg/min (durante 15 minutos).

Tiempos y medidas mostrados en la **Figura 1**.

**Intervalo QT (ms)**: desde el inicio del complejo QRS hasta el final de la onda T; **Intervalo QT corregido** para la frecuencia cardiaca (ms): ( $QT_c = QT/VRR$ ), Fórmula de Bazett; **Dispersión del intervalo QT**: diferencia entre el máximo y mínimo intervalo QT de las 12 derivaciones; **Intervalo T-peak to T-end (TpTe)**: distancia desde el vértice hasta el final de la onda T, siendo la diferencia de tiempo entre el pico y el final de la onda T; **Intervalo TpTe corregido** para la frecuencia cardiaca (ms): ( $TpT_{ec} = TpTe/VRR$ ), Fórmula de Bazett; **Dispersión del intervalo TpTe**: diferencia entre el máximo y mínimo intervalo TpTe de las 12 derivaciones

Las medidas se realizaron sobre el registro ECG de forma basal; tras la administración de los anestésicos locales y en los minutos 5, 10 y 25 tras la infusión de IL.



**Figura 1.** Parámetros electrocardiográficos y ejemplo de medición del intervalo QT y del intervalo TpTe

**Análisis estadístico:** El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS versión 24.0 (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA). Se realizó un análisis descriptivo de los datos del estudio y de las características de los animales. Se calculó el ABC de los parámetros de repolarización y niveles de AL. Para las comparaciones antes y después de la administración de los AL se realizó la prueba de Wilcoxon y el test de la U de Mann-Whitney para las comparaciones entre ambos grupos. Se consideró un valor de  $p < 0,05$  como estadísticamente significativo.

### Resultados

Se incluyeron un total de 16 animales. Un animal del grupo de bupivacaína falleció como consecuencia de colapso cardiovascular tras la administración de la bupivacaína. No hubo diferencias entre los dos grupos en las características de los animales, peso y talla, tiempo de duración de estudio. No hubo diferencias entre los niveles de bupivacaína y ropivacaína a lo largo del estudio ( $p=0,61$ ). La administración de ambos anestésicos produjo un aumento en todos los parámetros de RV. En el grupo de bupivacaína fueron estadísticamente significativos

los aumentos en el intervalo TpTe, TpTec y en la dispersión del TpTe. Sin embargo, en el grupo ropivacaína fueron significativo todos los cambios de los parámetros de repolarización evaluados (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Efectos de la bupivacaína y ropivacaína en los parámetros de repolarización ventricular.

	Basal	Post-anestésico local	P
<b>QT</b>			
BUPIVACAÍNA	378(348-392)	387(352-574)	0,17
ROPIVACAÍNA	416(383-458)	447(416-492)	0,05
<b>QTc</b>			
BUPIVACAÍNA	475(468-513)	463(444-564)	0,49
ROPIVACAÍNA	502(497-529)	528(511-555)	0,036
<b>QT-Dispersión</b>			
BUPIVACAÍNA	46(38-52)	78(34-134)	0,12
ROPIVACAÍNA	42(34-54)	106(91-120)	0,017
<b>TpTe</b>			
BUPIVACAÍNA	59(48-84)	106(86-211)	0,018
ROPIVACAÍNA	63(54-67)	155(143-167)	0,012
<b>TpTec</b>			
BUPIVACAÍNA	80(65-103)	138(103-207)	0,018
ROPIVACAÍNA	72(63-80)	190(162-197)	0,012
<b>TpTe-Dispersión</b>			
BUPIVACAÍNA	32(26-40)	78(40-140)	0,028
ROPIVACAÍNA	38(26-45)	82(57-104)	0,017

La evolución de los parámetros de RV con la administración de IL se muestra en la **Tabla 2**. Destacando que hubo diferencias significativas entre ambos grupos en la recuperación del QTc y del TpTec, siendo más evidente la recuperación en el grupo de bupivacaína vs ropivacaína.

**Tabla 2.** Evolución de los parámetros de repolarización ventricular en ambos grupos (bupivacaína y ropivacaína) en los diferentes tiempos del estudio: basal, pre, 5 min, 10 min y 25 min de la administración de intralipid.

	Basal	Pre-Intralipid	5 min-Intralipid	10 min-Intralipid	25 min-Intralipid	P ABC
<b>QT</b>						
BUPIVACAÍNA	378(348-392)	387(352-574)	386(367-573)	385(362-495)	373(350-4919)	0,18
ROPIVACAÍNA	416(383-458)	447(416-492)	452(427-507)	435(402-482)	473(430-486)	
<b>QTc</b>						
BUPIVACAÍNA	475(468-513)	463(444-564)	459(453-636)	464(425-502)	470(428-526)	0,021
ROPIVACAÍNA	502(497-529)	528(511-555)	573(538-593)	559(533-578)	565(550-592)	
<b>QT-Dispersión</b>						
BUPIVACAÍNA	46(38-52)	78(34-134)	68(56-160)	56(42-58)	44(40-64)	0,69
ROPIVACAÍNA	42(34-54)	106(91-120)	89(55-98)	65(40-74)	46(32-61)	
<b>TpTe</b>						
BUPIVACAÍNA	59(48-84)	106(86-211)	104(90-210)	85(82-92)	75(71-91)	
ROPIVACAÍNA	63(54-67)	155(143-167)	142(123-160)	104(88-118)	81(65-89)	0,23
<b>TpTec</b>						
BUPIVACAÍNA	80(65-103)	138(103-207)	132(110-233)	105(81-117)	94(80-104)	
ROPIVACAÍNA	72(63-80)	190(162-197)	176(147-198)	126(113-136)	98(87-103)	0,021
<b>TpTe-Dispersión</b>						
BUPIVACAÍNA	32(26-40)	78(40-140)	68(54-142)	48(32-54)	46(24-58)	0,86
ROPIVACAÍNA	38(26-45)	82(57-104)	76(40-108)	44(35-73)	41(23-61)	

QT: intervalo QT; QTc: intervalo QT corregido para la frecuencia cardíaca por la fórmula de Bazett; QTd: Dispersión intervalo QT: diferencia entre el valor máximo y mínimo del intervalo QT; TpTe: T peak to T end, es el intervalo desde el pico de la onda T hasta el fin de la onda T; TpTec: intervalo T peak to T end corregido para la frecuencia cardíaca por la fórmula de Bazett; TpTe dispersión: diferencia entre el valor máximo y mínimo del intervalo T peak to T end. Los datos se expresan en medianas y rangos intercuartiles. ABC: área bajo la curva. Test estadístico: Mann Whitney, \* p < 0,05

## Discusión

Las alteraciones de la RV favorecen la aparición de arritmias relacionadas con el denominado síndrome de QT largo (SQTL) (Antzelevitch; Oliva, 2006). Nosotros hemos observado que ambos AL alteran la RV, aunque estas han sido más intensas en todos los parámetros evaluados con la ropivacaína frente a la bupivacaína. Este hallazgo contrasta con las consideraciones de estudios previos, en los que las acciones cardiotoxicas son más pronunciadas con la bupivacaína frente a la ropivacaína. Esto es debido a que el mecanismo por el que los AL pueden producir arritmias, fundamentalmente se debe a la alteración en la conducción cardíaca como consecuencia del bloqueo de los canales de Na<sup>+</sup>, favoreciendo las arritmias por reentrada. Sin embargo, nosotros hemos constatado que ambos AL han alterado la RV, estando posiblemente implicado el

bloqueo de otros canales iónicos cardiacos, como los de potasio. La evaluación de la RV típicamente ha estudiado el intervalo QT, sin embargo, otros parámetros como son la dispersión del intervalo QT y el estudio del intervalo TpTe aportan mayor información desde un punto de vista cardiotóxico, siendo este último un marcador de la dispersión transmural de la repolarización. Este parámetro se asocia a un ambiente pro-arritmogénico en casos de intoxicación por AL. Otros estudios recientes apoyan esta teoría, demostrando que un aumento en el intervalo TpTe se asociaría a un mayor riesgo de aparición de arritmias (Antzelevitch; Oliva, 2006). El uso de emulsiones lipídicas, como el IL, como antídoto para la intoxicación por AL se ha incrementado en los últimos años. El mecanismo de acción de las ELI no está bien establecido, pero se sugiere que “secuestran” las moléculas lipofílicas de AL, consiguiendo liberarlo del tejido cardiaco y acelerando la recuperación de su función. Este efecto, denominado como *lipid sink*, es actualmente la teoría más aceptada sobre el mecanismo protector de las ELI. Sin embargo, actualmente existen discrepancias sobre su beneficio en la comunidad científica (Felice; Schuman, 2008). Mientras que la mayoría de los autores mantienen la indicación del IL como tratamiento de elección; otros ponen en duda que la evidencia científica actual apoye esta teoría. Por otro lado, la mayoría de los estudios han evaluado su eficacia en la intoxicación por bupivacaína. Nuestra experiencia coincide, ya que hemos visto que el uso del IL aceleró la recuperación de las alteraciones electrocardiográficas en la intoxicación por bupivacaína frente a la ropivacaína. Asimismo, otros autores no encontraron ventajas en la eficacia del IL en la intoxicación por ropivacaína, pero sí en la intoxicación por bupivacaína en un modelo de corazón aislado de rata (Zausig, 2009). Esto sugiere que hay una estrecha relación entre los efectos del IL y la liposolubilidad del AL utilizado, lo que explicaría su mayor efectividad en la intoxicación por bupivacaína por ser un AL más lipofílico que la ropivacaína.

**Conclusiones:** En nuestro modelo experimental, la administración de ELI ha facilitado la recuperación de la toxicidad de parámetros de RV en el grupo bupivacaína frente a la ropivacaína. La liposolubilidad mayor de la bupivacaína puede facilitar los efectos reversores del IL.

### **Bibliografía**

1. James E. Heavner. 2017. Local anaesthetics. *Current Opinion in Anaesthesiology*. 20:336-342.
2. Mulroy MF. 2002. Systemic toxicity and cardiotoxicity from local anesthetics: Incidence and preventive measures. *Reg Anesth Pain Med*. 27:556-61.
3. Capogna G et al. 1999. Relative potencies of bupivacaine and ropivacaine for analgesia in labour. *British Journal of Anaesthesia*. 82;3: 371-3.
4. Lefrant JY et al. 2001. The comparative electrophysiologic and hemodynamic effects of a large dose of ropivacaine and bupivacaine in anesthetized and ventilated piglets. *Anesth Analg* 93:1598 –1605.
5. Felice KJ, Schuman H. 2008. Intravenous Lipid Emulsion for Local Anesthetic Toxicity: A Review of the Literature. *Journal of Medical Toxicology*.4;3: 184-190.
6. Antzelevitch C, Oliva A, 2006. Amplification of spatial dispersion of repolarization underlies sudden cardiac death associated with catecholaminergic polymorphic VT, long QT, short QT and Brugada syndromes. *J Intern Med*. 259:48-58.
7. Zausig YA, et al 2009. Lipid Emulsion Improves Recovery from Bupivacaine-Induced Cardiac Arrest, but Not from Ropivacaine- or Mepivacaine-Induced Cardiac Arrest. *Anesth Analg*. 109(4):1323-26.

**76800: Entamoeba histolytica, ¿uno de los nuestros?; Entamoeba histolytica, one of us?****Área de conocimiento:** BIOLOGÍA**Autor(es):** Alfredo Jiménez Cubas, Iván García López, Alberto Diz Sagrado**Tutor(es):** Benito Muñoz Araujo**Universidad:** Universidad Complutense de Madrid**Facultad:** Facultad de Ciencias Biológicas**Titulación:** Grado en Biología**Formato:** Póster - Revisiones bibliográficas**Palabras Clave:** Español: CD59, Entamoeba histolytica, sistema del complemento, evasión, Gal/GalNAc lectin  
Inglés: CD59, Entamoeba histolytica, complement system, evasion, Gal/GalNAc lectin.**RESUMEN**

La ameba cosmopolita, Entamoeba histolytica, es la causante de amebiasis en humanos y otros mamíferos. Se transmite de manera fecal-oral, ingiriendo quistes que dan lugar a los trofozoítos.

Esta ameba, como otros parásitos, presenta habilidades para sortear y evadir el sistema inmune. El mecanismo usado por E. histolytica es una especie de camuflaje, basado en la utilización de una molécula CD59-like o la propia molécula CD59 adquirida por trogocitosis, para hacerse pasar por una célula de nuestro cuerpo y así, no ser lisada por el sistema del complemento.

CD59 está presente en nuestras células, de manera que, puedan ser reconocidas como propias por el sistema del complemento.

El objetivo de este trabajo es determinar la presencia de la molécula CD59-like en trofozoítos de E. histolytica en muestras de tejido de íleon y colon en pacientes con colitis amebiana fulminante. Mediante técnicas de detección inmunoquímica, observación por microscopía electrónica y Western blotting, se demuestra la expresión in vivo de una molécula del tipo CD59, demostrando así la capacidad de este parásito de evadir la respuesta inmune mediante la utilización de una molécula parecida a CD59. Además, se determinará la presencia de moléculas CD59, propias de las células de nuestro cuerpo, en el interior de la ameba mediante IFI. Ambos mecanismos se utilizan con el fin de evadir el sistema del complemento al reconocer a la ameba como una célula humana propia, bloqueando el ensamblaje del complejo de ataque a la membrana que lisaría al patógeno.

**ABSTRACT**

The cosmopolitan amoeba, Entamoeba histolytica, is the cause of amebiasis in human and other mammals. It is transmitted fecal-orally, by ingesting cysts that give rise to trophozoites.

This amoeba, like other parasites, has abilities to circumvent and evade the immune system. The mechanism used by E. histolytica is a kind of camouflage, based on the use of a CD59-like molecule or the CD59 molecule itself acquired by trogocytosis, to pass itself off as a cell in our body and thus not be lysed by the system of the complement.

CD59 is present on our cells so that they can be recognized as self by the complement system.

The objective of this work is to determine the presence of the CD59-like molecule in E. histolytica trophozoites in tissue samples from the ileum and colon in patients with fulminant amoebic colitis. Using immunochemical detection techniques, observation by electron microscopy and Western blotting, the in vivo expression of a CD59-like molecule is demonstrated, thus demonstrating the ability of this parasite to evade the immune response by using a CD59-like molecule. In addition, the presence of CD59 molecules, typical of the cells

of our body, will be determined inside the amoeba by means of IFI. Both mechanisms are used so to evade the complement system as the amoeba is recognized as a human cell, blocking the assembly of the membrane attack complex that would lyse the pathogen.



## “*Entamoeba histolytica*, ¿uno de los nuestros?”

### “*Entamoeba histolytica*, one of us?”

- 1493803, Alfredo Jiménez Cubas, [alfredji@ucm.es](mailto:alfredji@ucm.es)
- 1493822, Alberto Diz Sagrado, [adiz@ucm.es](mailto:adiz@ucm.es)
- 1493813, Iván García López, [ivagar10@ucm.es](mailto:ivagar10@ucm.es)
- Tutor nº1: Benito Muñoz Araujo, [titomu@ucm.es](mailto:titomu@ucm.es)
- Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid.
- **Resumen**

La ameba cosmopolita, *Entamoeba histolytica*, es la causante de amebiasis en humanos y otros mamíferos. Se transmite de manera fecal-oral, ingiriendo quistes que dan lugar a los trofozoítos. Esta ameba, como otros parásitos, presenta habilidades para sortear y evadir el sistema inmune. El mecanismo usado por *E. histolytica* es una especie de camuflaje, basado en la utilización de una molécula **CD59-like** o la propia molécula **CD59** adquirida por trogocitosis, para hacerse pasar por una célula de nuestro cuerpo y así, no ser lisada por el sistema del complemento. **CD59** está presente en nuestras células, de manera que, puedan ser reconocidas como propias por el sistema del complemento.

El objetivo de este trabajo es determinar la presencia de la molécula **CD59-like** en trofozoítos de *E. histolytica* en muestras de tejido de íleon y colon en pacientes con colitis amebiana fulminante. Mediante técnicas de detección inmunoquímica, observación por microscopía electrónica y Western blotting, se demuestra la expresión in vivo de una molécula del tipo **CD59**, demostrando así la capacidad de este parásito de evadir la respuesta inmune mediante la utilización de una molécula parecida a **CD59**. Además, se determinará la presencia de moléculas **CD59**, propias de las células de nuestro cuerpo, en el interior de la ameba mediante IFI. Ambos mecanismos se utilizan con el fin de evadir el sistema del complemento al reconocer a la ameba como una célula humana propia, bloqueando el ensamblaje del complejo de ataque a la membrana que lisaría al patógeno.

- **Palabras clave:** CD59, *Entamoeba histolytica*, sistema del complemento, evasión, Gal/GalNAc lectin.

- **Abstract**

The cosmopolitan amoeba, *Entamoeba histolytica*, is the cause of amebiasis in human and other mammals. It is transmitted fecal-orally, by ingesting cysts that give rise to trophozoites. This amoeba, like other parasites, has abilities to circumvent and evade the immune system. The mechanism used by *E. histolytica* is a kind of camouflage, based on the use of a **CD59-like** molecule or the **CD59** molecule itself acquired by trogocytosis, to pass itself off as a cell in our body and thus not be lysed by the system of the complement. **CD59** is present on our cells so that they can be recognized as self by the complement system. The objective of this work is to determine the presence of the **CD59-like** molecule in *E. histolytica* trophozoites in tissue samples from the ileum and colon in patients with fulminant amoebic colitis. Using immunochemical detection techniques, observation by electron microscopy and Western blotting, the in vivo expression of a **CD59-like** molecule is demonstrated, thus demonstrating the ability of this parasite to evade the immune response by using a **CD59-like** molecule. In addition, the presence of **CD59** molecules, typical of the cells of our body, will be determined inside the amoeba by means of IFI. Both mechanisms are used so to evade the complement system as the amoeba is recognized as a human cell, blocking the assembly of the membrane attack complex that would lyse the pathogen.

- **Keywords:** CD59, *Entamoeba histolytica*, complement system, evasion, Gal/GalNAc lectin.

## Introducción

*Entamoeba histolytica* es un parásito protozoo causante de la amebiasis, invadiendo la mucosa del colon produciendo disentería y en ocasiones abscesos hepáticos. El trofozoíto es la forma invasiva de la ameba, siendo capaz de invadir el intestino y de diseminar hacia otros órganos a través de los vasos sanguíneos. Este trofozoíto tiene un tamaño de 20-40 micrómetros teniendo la capacidad de emitir pseudópodos con función de transporte y nutrición (1).

Se estima que aproximadamente un 1% de los humanos están infectados con *E. histolytica* causando unas 100.000 muertes anuales (2).

La amebiasis es adquirida por la ingestión de quistes maduros a partir del agua, alimentos o manos contaminadas con heces.

La infección por la ameba consta de múltiples pasos esenciales: degradación e invasión de la mucosa, adherencia al epitelio intestinal, invasión del tejido y diseminación a otros órganos. Mientras que los mecanismos de invasión y destrucción de los tejidos del huésped durante la infección han sido esclarecidos a nivel molecular todavía es escaso el conocimiento acerca de como el parásito sobrevive en el huésped evadiendo y atacando el sistema inmune (3).

Recientemente se han descubierto ciertos mecanismos de evasión del sistema inmune entre los cuales destacan los expuestos en este trabajo: la utilización del mimetismo molecular imitando a la molécula CD59 mediante la molécula CD59-like (4), conocida actualmente como Gal/GalNAc lectin (2), y expresión de la propia CD59 en la superficie de la ameba adquirida gracias al proceso de trogocitosis (5).

## Hipótesis y objetivos

En consecuencia, a partir de los resultados obtenidos en los estudios referenciados, nos planteamos la siguiente hipótesis:

El estudio que relaciona la presencia de CD59-like y CD59 en la superficie de la ameba con una mayor protección frente al sistema del complemento.

Los objetivos de este trabajo serán:

- Demostrar la presencia de Gal/GalNAc lectin en la membrana de *E. Histolytica*
- Demostrar su similitud antigénica con CD59
- Esclarecer el mecanismo de adquisición de CD59
- Cuál es su capacidad evasiva frente al sistema inmune.

## Material y métodos

Revisión bibliográfica de diferentes artículos y trabajos relacionados con los sistemas de evasión de la respuesta inmune por parte de *Entamoeba histolytica*. Posterior análisis de los métodos utilizados con el fin de probar la presencia de la molécula **CD59-like** en *E. histolytica*, en

pacientes diagnosticados con colitis amebiana fulminante, y la propia **CD59** en amebas incubadas junto a células humanas, de las cuales habrían adquirido esta molécula. Extracción de los resultados más representativos en gráficas e imágenes presentadas a continuación.

### Resultados y discusión

En el estudio realizado por Ventura-Juárez y colaboradores en el año 2009 se analizaron 11 muestras de íleon y colon estudiadas se encontraron heridas causadas por *E. histolytica*, de color verdoso-amarillento con mucosa, en la parte interna y la cara peritoneal. Destacan los siguientes resultados:

- Los trofozoítos se identificaron mediante una reacción inmunohistoquímica sobre su anticuerpo primario. Además, se realizó un análisis inmunocitoquímico con el anticuerpo policlonal anti-**CD59** para confirmar la presencia de la proteína similar a **CD59** en los trofozoítos de *E. histolytica*.
- Análisis de microscopio electrónico utilizando anticuerpos marcados con oro coloidal, una partícula electrodensa que se une a las proteínas que normalmente se utilizan para la detección de antígenos. Este método ha sustituido en gran medida al marcaje enzimático. De esta forma demostraron que los trofozoítos de *E. histolytica* presentan inmunomarcaje a **CD59**.

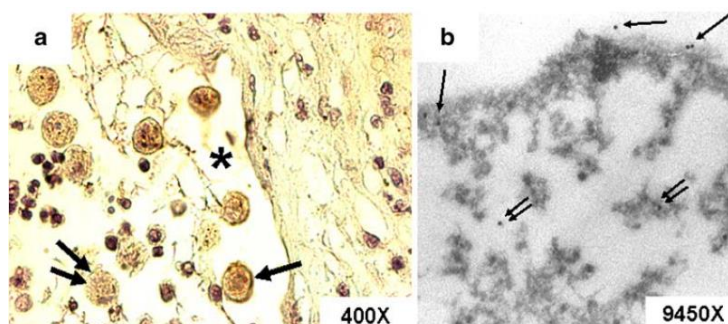


Figura 1: **CD59** en *E. histolytica* infectante en el intestino.

a) Trofozoítos con material inmunoreactivo al antígeno **CD59**.

b) Zona periférica del trofozoíto con material inmunoreactivo con oro a **CD59** (1 flecha: membrana; 2 flechas: citoplasma).

- El análisis mediante Western Blot es un método para detectar proteínas específicas mediante el uso de electroforesis en gel para separar las proteínas, que serán detectadas mediante la inmunodetección que la sigue. Con esta técnica se confirmó la presencia de una molécula con reactividad cruzada con **CD59** humana en la superficie de los trofozoítos de *E. histolytica*, diferente a la lectina específica de galactosa, ya que, esta lectina no es reconocida por los anticuerpos anti-**CD59** policlonales. La realización del Western Blot fue necesaria para diferenciar ambas proteínas ya que tanto la molécula **CD59-like** como la lectina específica de galactosa tienen reactividad cruzada con la molécula de **CD59** humana, por lo que, solo con el ensayo inmunohistoquímico no seríamos capaces de diferenciarlos. Esta electroforesis nos

permite diferenciar ambas proteínas por su peso molecular: CD59-like (21kDa) y la lectina dependiente de galactosa (260 kDa), por lo que ambos ensayos son complementarios.

En el estudio realizado por Hannah W. Miller y colaboradores en 2023, se utilizaron linfocitos T Jurkat, junto con trofozoítos aislados de *E. histolytica* (ATCC) y eritrocitos de donante humano. Destacan los siguientes resultados:

- Se incubaron trofozoítos de *E. histolytica* en ausencia de células humanas o en concentraciones crecientes de linfocitos T Jurkat o glóbulos rojos. Se llevó a cabo una inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando anticuerpos monoclonales para la detección de CD59. Se observó que la ameba en presencia de las células humanas es capaz de ingerir parte de las células incluyendo las moléculas CD59 mediante trogocitosis, proceso similar a la fagocitosis en el que la ameba “muere” parte de las células. Gracias a este proceso la ameba era capaz de incorporar CD59 a su membrana evitando así la lisis por parte del complemento.

Se demostró que aquellas amebas que habían ingerido mayor cantidad de material de las células humanas mediante trogocitosis eran las más protegidas frente al sistema del complemento.

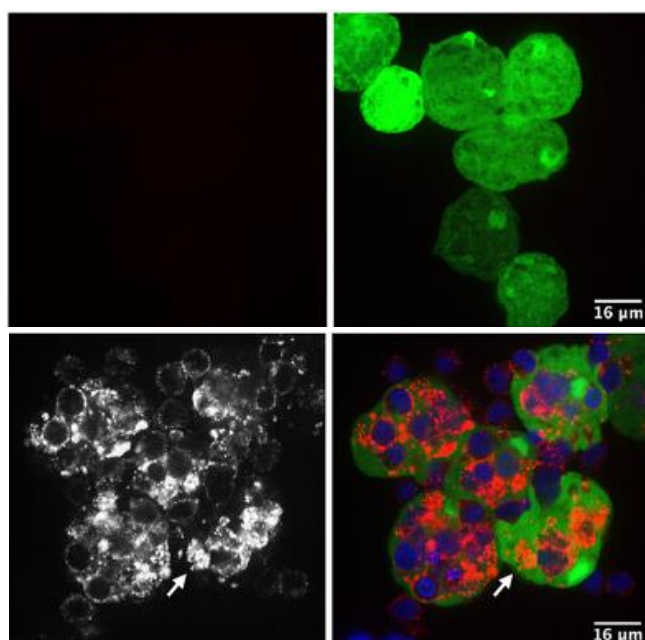


Figura 2: Representación de la ameba incubada de forma aislada (fila superior) y junto a linfocitos T Jurkat (fila inferior). Columna izquierda: representación exclusiva de CD59. Columna derecha: conjunto de células y moléculas estudiadas; rojo: CD59; verde: citoplasma de la ameba; azul: núcleos de las células humanas

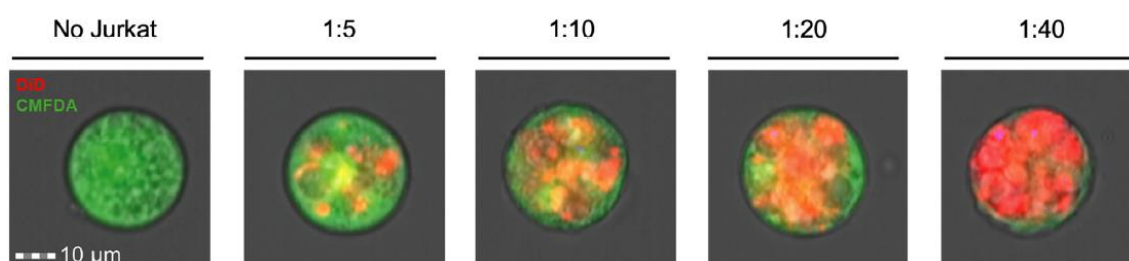


Figura 3. Imagen representativa de la ameba incubada con concentraciones crecientes de linfocitos T Jurkat. Se representa el citoplasma de la ameba de color verde y el material de los linfocitos ingerido de color rojo.

## Conclusiones

**CD59** es una glicoproteína ampliamente distribuida en la membrana celular. Las proteínas **CD59** inhiben la actividad citolítica de complemento uniéndose a C8 y C9 y bloqueando el ensamblaje del complejo de ataque a la membrana. Por esta razón se encuentra en las células propias.

Las proteínas **CD59-like** en la superficie de los trofozoítos que invaden el colon humano probablemente son un importante mecanismo de protección contra la acción de MAC y por tanto, un mecanismo de patogenicidad.

La trogocitosis es un proceso similar a la fagocitosis por el cual *E. histolytica* es capaz de captar porciones de los linfocitos T Jurkat los cuales tienen la molécula CD59 que posteriormente será expresada en la membrana de la ameba evitando la lisis mediada por el sistema del complemento.

Por lo tanto, **CD59** y **Gal/GalNAc lectin (CD59-like)** se utilizan como mecanismos para evitar la respuesta inmune del hospedador.

## Bibliografía

1. Begum S. UNIVERSITY OF CALGARY Defining How Entamoeba histolytica Modulates Macrophage Functions. 2019 [cited 2023 Mar 9]; Available from: <http://hdl.handle.net/1880/110938>
2. Nakada-Tsukui K, Nozaki T. immune Response of Amebiasis and immune evasion by Entamoeba histolytica. 2016 [cited 2023 Mar 9];7:1. Available from: [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)
3. Alberto M, Rodríguez R. Este trabajo se realizó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia.
4. Ventura-Juárez J, Campos-Rodríguez R, Jarillo-Luna RA, Muñoz-Fernández L, Escario-G-Trevijano JA, Pérez-Serrano J, et al. Trophozoites of Entamoeba histolytica express a CD59-like molecule in human colon. Parasitol Res [Internet]. 2009 Nov 19 [cited 2023 Mar 9];104(4):821–6. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00436-008-1262-3>
5. Miller HW, Tam TSY, Ralston KS. Entamoeba histolytica Develops Resistance to Complement Deposition and Lysis after Acquisition of Human Complement-Regulatory Proteins through Trogocytosis. 2022 [cited 2023 Mar 9]; Available from: <https://journals.asm.org/journal/mbio>

**76883: The role of the Type IV CRISPR-Cas accessory protein Csx27 in the regulation of CRISPR-Cas13 mediated anti-viral immunity/ El papel de la proteína accesoria CRISPR-Cas tipo IV Csx27 en la regulación de la inmunidad antiviral mediada por CRISPR-Cas13**

**Área de conocimiento:** BIOLOGÍA

**Autor(es):** Joan Sebastian Molina Vargas

**Tutor(es):** Tania Ayllón Santiago, Daniel Antonio Bravo Vázquez

**Universidad:** Universidad Complutense de Madrid

**Facultad:** Facultad de Ciencias Biológicas y Geológicas

**Titulación:** Grado en Biología

**Formato:** Póster - Investigación básica

**Palabras Clave:** bacteriophage, bacteria, CRISPR, Cas13, Csx27

**ABSTRACT**

Type VI CRISPR-Cas systems use RNA-guided ribonuclease Cas13 to defend bacteria against bacteriophages and other mobile genetic elements, and some of these systems encode putative ancillary proteins that have unclear roles in Cas13-mediated defense. In this study, utilizing structural predictions and phage infection assays, our findings suggest that Csx27, a component of Type VI-B1 systems, has the potential to assemble into a multimeric pore in the membrane of bacteria, and it is able to slow down cellular metabolism upon viral infection, thus increasing anti-viral defense. This suggests an important interplay between Cas13 interference and putative membrane proteins to stop viral propagation. Additionally, this research helped understand the CRISPR array architecture needed for correct expression in *Escherichia coli*. Taken together, these findings highlight new potential protein targets of pathogenic bacteria, as many of pathogenic or biofilm-forming strains possess CRISPR type VI. Therefore, a better understanding of Csx27's mechanism will not only help to shed light on the emerging role of transmembrane proteins in CRISPR-Cas antiphage defense but also offer new opportunities for the development of new molecular tools, drugs, or phage therapy.

**RESUMEN**

Los sistemas CRISPR-Cas tipo VI utilizan la ribonucleasa guiada por ARN Cas13 en el proceso de la defensa bacteriana contra bacteriófagos y otros elementos genéticos móviles. Algunos de estos sistemas codifican hipotéticas proteínas accesorias que no tienen aún un rol claro en la defensa mediada por Cas13. En este trabajo, gracias a predicciones estructurales y a una combinación de ensayos de infección con fagos, se demuestra que Csx27, perteneciente a los sistemas tipo VI-B1, podría formar un poro multimérico en la membrana bacteriana, y es a su vez capaz de ralentizar el metabolismo celular durante las infecciones virales, lo cual incrementaría la defensa antiviral. Esto sugiere una importante interacción entre la interferencia por Cas13 y supuestas proteínas de membrana, con el fin de evitar la propagación viral. Además, esta investigación ha contribuido a entender la arquitectura de CRISPR necesaria para la correcta expresión en *Escherichia coli*. En conjunto, los resultados obtenidos ponen de manifiesto nuevas dianas proteicas contra bacterias patógenas, debido a que muchas cepas patógenas o formadoras de biofilms poseen sistemas CRISPR tipo VI. En consecuencia, profundizar en el entendimiento de los mecanismos de Csx27, no solo contribuirá a dilucidar las funciones emergentes de las proteínas transmembrana en los sistemas de defensa CRISPR, sino que también ofrecerá nuevas perspectivas para el desarrollo de novedosas herramientas moleculares, medicamentos, o tratamientos basados en fagoterapia.

## The role of the Type IV CRISPR-Cas accessory protein Csx27 in the regulation of CRISPR-Cas13 mediated anti-viral immunity/ El papel de la proteína accesoria CRISPR-Cas tipo IV Csx27 en la regulación de la inmunidad antiviral mediada por CRISPR-Cas13

**Autor:** Joan Sebastian Molina Vargas [joansmol@ucm.es](mailto:joansmol@ucm.es)

**Tutor 1:** Tania Ayllón Santiago [tayllon@ucm.es](mailto:tayllon@ucm.es)

**Tutor 2:** Daniel Antonio Bravo Vázquez [dbravo03@ucm.es](mailto:dbravo03@ucm.es)

**Afiliaciones:** Facultad de Ciencias Biológicas y Geológicas, Universidad Complutense de Madrid

### Abstract

Type VI CRISPR-Cas systems use RNA-guided ribonuclease Cas13 to defend bacteria against bacteriophages and other mobile genetic elements, and some of these systems encode putative ancillary proteins that have unclear roles in Cas13-mediated defense. In this study, utilizing structural predictions and phage infection assays, our findings suggest that Csx27, a component of Type VI-B1 systems, has the potential to assemble into a multimeric pore in the membrane of bacteria, and it is able to slow down cellular metabolism upon viral infection, thus increasing anti-viral defense. This suggests an important interplay between Cas13 interference and putative membrane proteins to stop viral propagation. Additionally, this research helped understand the CRISPR array architecture needed for correct expression in *Escherichia coli*. Taken together, these findings highlight new potential protein targets of pathogenic bacteria, as many of pathogenic or biofilm-forming strains possess CRISPR type VI. Therefore, a better understanding of Csx27's mechanism will not only help to shed light on the emerging role of transmembrane proteins in CRISPR-Cas antiphage defense but also offer new opportunities for the development of new molecular tools, drugs, or phage therapy.

**Key-words:** bacteriophage, bacteria, CRISPR, Cas13, Csx27

### Resumen

Los sistemas CRISPR-Cas tipo VI utilizan la ribonucleasa guiada por ARN Cas13 en el proceso de la defensa bacteriana contra bacteriófagos y otros elementos genéticos móviles. Algunos de estos sistemas codifican hipotéticas proteínas accesorias que no tienen aún un rol claro en la defensa mediada por Cas13. En este trabajo, gracias a predicciones estructurales y a una combinación de ensayos de infección con fagos, se demuestra que Csx27, perteneciente a los sistemas tipo VI-B1, podría formar un poro multimérico en la membrana bacteriana, y es a su vez capaz de ralentizar el metabolismo celular durante las infecciones virales, lo cual incrementaría la defensa antiviral. Esto sugiere una importante interacción entre la interferencia por Cas13 y supuestas proteínas de membrana, con el fin de evitar la propagación viral. Además, esta investigación ha contribuido a entender la arquitectura de CRISPR necesaria para la correcta expresión en *Escherichia coli*. En conjunto, los resultados obtenidos ponen de manifiesto nuevas dianas proteicas contra bacterias patógenas, debido a que muchas cepas patógenas o formadoras de biofilms poseen sistemas CRISPR tipo VI. En consecuencia, profundizar en el entendimiento de los mecanismos de Csx27, no solo contribuirá a dilucidar las funciones emergentes de las proteínas transmembrana en los sistemas de defensa CRISPR, sino que también ofrecerá nuevas perspectivas para el desarrollo de novedosas herramientas moleculares, medicamentos, o tratamientos basados en fagoterapia.

**Palabras claves:** bacteriófago, bacteria, CRISPR, Cas13, Csx27

## Introduction

Prokaryotes are in constant evolutionary battle to defend themselves from mobile genetic elements (MGEs) such as bacteriophages [1]. The immune response of prokaryotes is extremely diverse and complex [2]. Amid this ongoing evolutionary competition, certain organisms have developed an adaptive immune response known as “Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats and Associated proteins” (CRISPR-Cas). Briefly, this system works by storing a molecular memory of previous encounters with these pathogens by integrating short fragments of foreign DNA in their genomic loci, and subsequently transcribe and process them into small RNAs (known as CRISPR-RNAs or crRNAs). The crRNAs can guide dedicated Cas nucleases to foreign nucleic acids by complementarity and, upon recognition, the DNA or RNA is degraded, thus interfering with the infection process and subsequent propagation [3, 4]. CRISPR systems are found in 40 % of bacteria and are almost ubiquitous in *Archaea* [5]. They are very diverse, divided into two classes and grouped into six major types [6]. Recently, CRISPR-Cas type VI was discovered, represented by the signature protein Cas13, whose target is exclusively single-stranded RNA (ssRNA) [7]. To date, at least 6 subtypes of CRISPR-Cas have been described (type VI-A to VI-D, VI-X and VI-Y) each displaying remarkable diversity [3, 8].

Type VI-B systems, in addition to Cas13, express one of two accessory genes *csx27* or *csx28* that have been shown to modulate Cas13b-mediated defense [9]. *Csx28* is classified as Type VI-B2 CRISPR system and is predicted to contain a divergent “Higher Eukaryotic and Prokaryotic Nucleotide-binding motif” (HEPN) motif, which has been theorized to act as an RNA-nuclease [10, 11]. Recent studies were able to determine the structure of *Csx28* as a new class pore-forming membrane protein. *Csx28* octameric complex enhances the anti-phage defense, promotes pore formation and slows cellular metabolism [11]. As with *Csx27*, previous works showed that *Csx28* contains four transmembrane domains, although its presence in the membrane was not clear. For *Bergeyella zoohelcum* *Csx27* has been implicated in the reduction of Cas13-mediated immunity [9]. However, the molecular mechanisms behind this phenomenon remain poorly understood. Recent work conducted in our laboratory revealed that these previous studies lacked some critical experimental considerations.

In this context, investigations involving a *Csx27* ortholog derived from *Bacteroides pyogenes* have demonstrated that additional direct repeat is necessary to achieve a correct processing of the CRISPR array. Furthermore, using traditional phage and metabolic assays, we demonstrated that *Csx27* works with Cas13 to increase anti-viral defense, likely by slowing down metabolism and delaying the lysogenic cycle, and provided more evidence as a multimeric pore-forming complex.

## Materials and methods

### Plasmids design and construction

In this study, *Csx27* and Cas13b plasmids were modified versions of the following Addgene plasmids #89900 and #89898, respectively. These plasmids were modified to include a lac operator sequence which is necessary for functional lac operon induction in the presence of IPTG (Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside) and suppression in the presence of glucose. These plasmids originally encoded proteins from *B. zoohelcum* which were changed for the corresponding orthologs from *Bacteroides pyogenes* via Gibson assembly. Additionally, the plasmid for BpyCas13b was modified by incorporating an additional direct repeat upstream the spacer site. Finally, crRNA spacer sequences were inserted between direct repeats by using Golden Gate assembly via the *BsaI* restriction site of Cas13b plasmids.



### Structural prediction

AlphaFold structure prediction was carried using a ColabFold v.1.4.0 batch implementation employing the fast homology search of MMseq2 with AlphaFold2, using the following options: colabfold\_batch --amber --num-recycle 3 --model-type AlphaFold2-multimer-v2. This analysis was conducted using the computational resources of the University of Rochester's Center for Integrated Research Computing (CIRC) Linux cluster.

### Efficiency of Plating (EOP)

$\lambda$  phage was titrated by ten-fold serial dilutions in the phage SM buffer. 2  $\mu$ L of each serial dilution were spotted onto solidified 0.75% top LBA containing 200  $\mu$ L *E. coli* culture (pre-grown in 5 ml LB overnight culture) in 3mL top LBA. Plates were incubated at 37 °C for 16 hours. Plaques were counted and titre was determined as plaque forming units (pfu)/mL. Csx27 and Cas13b and plasmid mutants were transformed into *E. coli* C3000 prior to plating.

### Bacterial Growth Curves

Overnight cultures of bacteria (*E. coli* with plasmids pEmpty, Cas13b, and/or Csx27) and negative controls (untransformed *E. coli* and *E. coli* with empty plasmids) were diluted to a final OD600 0.1 in LB + 10 mM MgCl<sub>2</sub> supplemented with ampicillin and chloramphenicol in presence of  $\lambda$  phage for a final MOI of 0, 0.2 and 2. 200  $\mu$ L of the mixed samples were transferred into wells of a 96-well plate in triplicate. Plates were incubated at 37 °C with agitation in a Tecan Spark plate reader. A600 measurements were taken every 10 minutes, setting the first time point at 0 min. Data was plotted using GraphPad Prism 9

### Resazurin assays for cellular viability and metabolic activity.

Cells were prepared for bacterial growth curves assays as previously described, with the exception that the assay was paused one hour after  $\lambda$  infection to allow for the addition of resazurin. Resazurin (final concentration 3  $\mu$ g/mL in PBS, pH 7.4, 0.2  $\mu$ m filtered sterilized) was added to each 200  $\mu$ L sample-containing well in addition to three wells of LB media control. Fluorescent measurements were taken every 10 minutes using a Tecan Spark plate reader with excitation at 560 nm and emission at 590 nm wavelengths.

## **Results**

Previous studies in our lab have demonstrated that type VI-B2 accessory protein Csx28 forms an octameric large-pore channel that is inner-membrane localized *in vivo* [11]. Pending structural studies on type VI-B1 protein Csx27, we performed structural modelling of several orthologs of Csx27 with AlphaFold and found that they are predicted to oligomerize and form a multimer complex that resembles a membrane protein complex (**Fig. 1**). Csx27 is predicted to contain four transmembrane domains [9], which strongly suggests that it might be a membrane protein capable to assemble into oligomeric forms.

In our efforts to functionally characterize the roles of Csx27 and how it modulates Cas13-mediated antiphage response, we focused on the Type VI-B1 system in *B. pyogenes*. To this end, Cas13 (BpyCas13) and Csx27 (BpyCsx27) were cloned into suitable vectors. Additionally, we created a crRNA-expression vector and tested CRISPR array architecture. We found that a given spacer must be situated between two direct repeats (**Fig. 2A**); otherwise, no defense is produced (data not shown). Three crRNAs were designed to target gene expression at three different stages of infection with dsDNA bacteriophage  $\lambda$  (i.e., crRNA1- early genes, crRNA2-early/late genes, crRNA3-late genes, **Fig. 2B**) and each spacer was cloned into the CRISPR array plasmid (**Fig. 2C**). Both CRISPR-Cas13 and Csx28 (or empty control) plasmids were co-transformed in *E. coli* C3000 strain. Using phage Efficiency of Plating (EOP) assays, it was found that Cas13 with

crRNA1 and Csx27 reduced phage EOP compared to Cas13 alone, suggesting increased protection against phage infection (**Fig. 2D**). With other spacers, defense was not clearly observed, even when Cas13 was present alone. EOP assays are often not sensitive for subtle phenotypes or sensitive enough for different defense mechanisms, so antiphage defense was further tested with more sophisticated assays. Growth curves were carried out to assess the bacterial population change over the infection cycle. The effect on bacterial growth gives an insight on how lambda phages interact during the different cycles of infection. We tested different multiplicities of infection (MOI, only MOI=2 shown here) in the presence of Cas13 and Csx27 (**Fig. 2E**). As expected, uninfected cells displayed exponential growth. For  $\lambda$ -infected cells, major cell lysis occurred early, thus giving low optical density. Later, phages induced lysogeny in the *E. coli* C3000, which then became resistant to further lytic infection. Then, the lysogenic strains take over the culture, growing exponentially until the stationary phase [12]. In the presence of targeting Cas13, lysogeny is delayed. Addition of Csx27 causes an additional reduction on the growth which in turn retards the onset of lysogenic phase. Taken together, our data suggests that Csx27 is acting with Cas13 to cause a slower cell growth and delay bacteriophage integration into the host chromosome. It was hypothesized that this protein might cause a metabolic defect upon phage infection and Cas13 activation. To test this hypothesis, we performed resazurin experiments to assess the metabolic rates in the presence of phages with four different expression systems (**Fig. 2F**). Resazurin is a blue, non-fluorescent dye that is irreversibly reduced by NADH/NADPH to resorufin (**Fig. 2H**). This can be used as a measure of cellular metabolic rates. All uninfected cultures were able to completely metabolize resazurin to resorufin within 100 minutes. On the other hand, infected cultures with  $\lambda$  (MOI 2) and containing Cas13b/Csx27 resulted in a slower resazurin turnover over 250 minutes (**Fig. 2F**). Interestingly, with the combined presence of Cas13 and Csx27 a slower metabolic rate was appreciated. In sum, these metabolic assays support the hypothesis that upon infection Csx27 slows down metabolic rates, which leads to a delayed culture growth.

### Discussion

Efforts to understand the role of type VI CRISPR accessory proteins are relatively recent, and novel insights into their molecular mechanisms are just beginning to emerge [11, 12]. Early studies Cas13b and Csx27 from *B. zoohelcum* showed that Csx27 might inhibit anti-phage activity compared to Cas13b without Csx27 [9]. New studies in our laboratory have found some additional considerations for the experimental design of functional studies with Csx27 and showed that, contrarily, Csx27 seems to increase defense in conjunction with Cas13b. In this research, those studies were expanded with a new ortholog from *B. pyogenes* and our results are consistent with those obtained in studies of *B. zoohelcum*, which showed that Csx27 enhances anti-phage activity against bacteriophage lambda. While our EOP assays were not as robust as other orthologs, probably due to different Cas13 activity in *E. coli*, future directions for this project include testing new orthologs, increasing our crRNA set with new targets against other regions of lambda phage (or other phages), addition of other controls, and more sensitive assays than EOPs. On the other hand, the functional studies (bacterial growth and metabolic assays) demonstrate that during viral infection and activation of Cas13, growth is halted, most likely by a reduction in cellular metabolism. This in turn could refrain *E. coli* from entering lysogenic phase, as suggested by our growth curves. Taken together, we speculate that Csx27 acts downstream of Cas13 RNA-mediated as an additional defense strategy to induce cell dormancy, by limiting viral utilization of host resources and decreasing phage burst (in turn

protecting the bacterial population) or allowing for additional defense mechanisms to activate in the native host. Further research must be conducted to answer these questions. Finally, efforts are needed to solve the structure of Csx27 with cryo-electron microscopy (cryo-EM), which in turn will contribute to validate the structural predictions, assess oligomeric formation, and perform functional studies. Understanding mechanisms underlying these immune systems is fundamental to improving human health due to the emergence of type VI CRISPR accessory proteins in pathogenic human microbes found in oral cavities and the digestive system. Taken together, the work presented here might eventually uncover new potential targets against these pathogenic species and allow for the development of novel treatment or bacteriophage therapies.

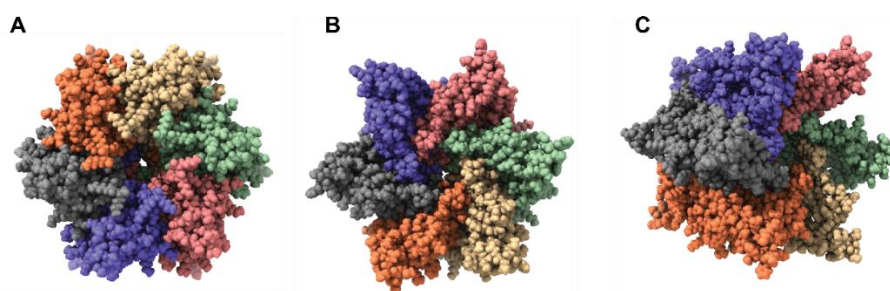
### Conclusion

As an anti-viral defense strategy, CRISPR-Csx27 seems to act downstream of Cas13 activation to slow down cellular metabolism upon viral infection. Based on our structure models, it is supported that Csx27 could be forming a pore in the membrane, through which it may exert its function.

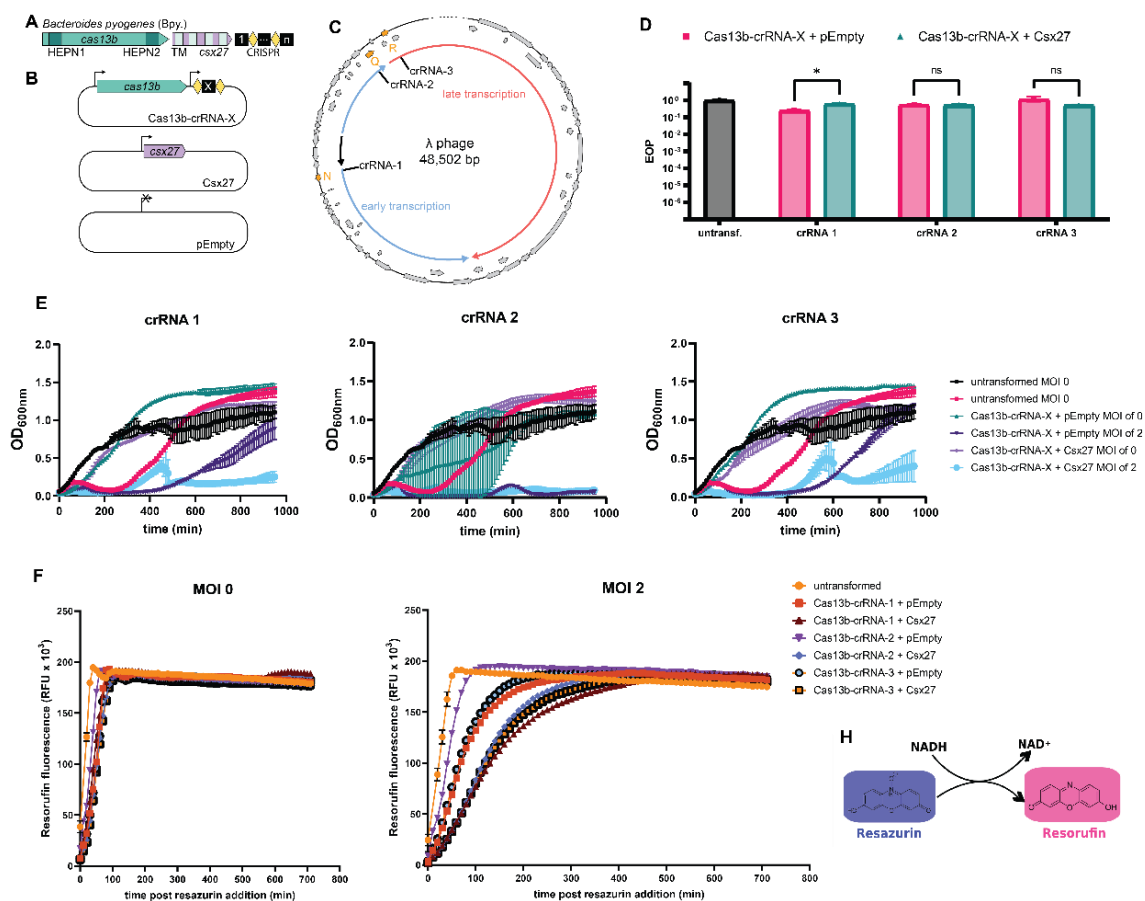
### Bibliography

1. Rocha, E.P.C. and D. Bikard, *Microbial defenses against mobile genetic elements and viruses: Who defends whom from what?* PLoS Biol, 2022. **20**(1): p. e3001514.
2. Bernheim, A. and R. Sorek, *The pan-immune system of bacteria: antiviral defence as a community resource.* Nat Rev Microbiol, 2020. **18**(2): p. 113-119.
3. O'Connell, M.R., *Molecular Mechanisms of RNA Targeting by Cas13-containing Type VI CRISPR-Cas Systems.* J Mol Biol, 2019. **431**(1): p. 66-87.
4. Makarova, K.S., et al., *Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems.* Nat Rev Microbiol, 2011. **9**(6): p. 467-77.
5. Makarova, K.S., et al., *An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems.* Nat Rev Microbiol, 2015. **13**(11): p. 722-36.
6. Makarova, K.S. and E.V. Koonin, *Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems.* Methods Mol Biol, 2015. **1311**: p. 47-75.
7. Abudayyeh, O.O., et al., *C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector.* Science, 2016. **353**(6299): p. aaf5573.
8. Xu, C., et al., *Programmable RNA editing with compact CRISPR-Cas13 systems from uncultivated microbes.* Nat Methods, 2021. **18**(5): p. 499-506.
9. Smargon, A.A., et al., *Cas13b Is a Type VI-B CRISPR-Associated RNA-Guided RNase Differentially Regulated by Accessory Proteins Csx27 and Csx28.* Mol Cell, 2017. **65**(4): p. 618-630 e7.
10. Shmakov, S., et al., *Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems.* Nat Rev Microbiol, 2017. **15**(3): p. 169-182.
11. VanderWal, A.R., et al., *CRISPR-Csx28 forms a Cas13b-activated membrane pore required for robust CRISPR-Cas adaptive immunity.* bioRxiv, 2021: p. 2021.11.02.466367.
12. Yan, W.X., et al., *Cas13d Is a Compact RNA-Targeting Type VI CRISPR Effector Positively Modulated by a WYL-Domain-Containing Accessory Protein.* Mol Cell, 2018. **70**(2): p. 327-339 e5.
13. Abedon, S.T., *Bacterial 'immunity' against bacteriophages.* Bacteriophage, 2012. **2**(1): p. 50-54.
14. Maynard, N.D., et al., *A forward-genetic screen and dynamic analysis of lambda phage host-dependencies reveals an extensive interaction network and a new anti-viral strategy.* PLoS Genet, 2010. **6**(7): p. e1001017.

### FIGURES



**Figure 1. Putative multimeric prediction of BpyCxs27.** AlphaFold2 structural prediction of BpyCxs27 with multimers allowed (hexamers shown here).



**Figure 2. Csx27 increase immunity against  $\lambda$ -phage by inducing slow-growing and metabolic rates.** (A) Schematic diagram of the Type VI-B1 CRISPR-Cas system from *Bacteroides pyogenes*. (B) Cas13b and Csx27 are expressed from IPTG-inducible promoters on two separate plasmids. pEmpty is used to control antibiotic selection pressure. (C) Circular genome of  $\lambda$ -phage, early and late transcription products are shown within the crRNA 1 to 3. (D) Efficiency of Plating (EOP) assay. (E) Growth curves of *E. coli* strains carrying Cas13b, Csx27 or pEmpty plasmids, measured using OD600 after the addition of  $\lambda$ -phage, for crRNA1, crRNA2, crRNA3 respectively (F) Resazurin metabolism assay measuring the conversion of resazurin to resorufin over time of untransformed *E. coli* or strains expressing Cas13b and Csx27 with the absence (MOI 0) or presence of phages (MOI 2). (H) Conversion of resazurin to resorufin changes colour with the oxidation of NADH to NAD<sup>+</sup>.

**76670: Uso de nanopartículas liposomales en la reeducación del sistema inmune en diabetes tipo 1 y otras enfermedades autoinmunes. / Liposomal nanoparticles usage for the immune system reeducation in diabetes type 1 and other autoimmune diseases.****Área de conocimiento:** BIOLOGÍA**Autor(es):** PEDRO MOLINERO RODRÍGUEZ**Tutor(es):** Lola María Fernandez Messina**Universidad:** Universidad Complutense de Madrid**Facultad:** Facultad de ciencias biológicas**Titulación:** Grado en Biología**Formato:** Comunicación Oral - Revisiones bibliográficas**Palabras Clave:** Enfermedad autoinmune; Autoantígeno; Eferocitosis; Diabetes tipo 1; Artritis reumatoide; Nanopartículas liposomales. / Autoimmune disease; Autoantigen; Efferocytosis; Type 1 diabetes; Rheumatoid arthritis; Liposomal nanoparticles.

Las enfermedades autoinmunes son provocadas por la pérdida de tolerancia hacia un autoantígeno por parte del sistema inmunitario del paciente, causando la destrucción de tejidos, lo que en muchos casos supone la aparición de patologías crónicas o incluso la muerte. Dada la necesidad de un tratamiento innovador no paliativo, en este artículo de revisión se ofrece la recopilación de información sobre una técnica que hace uso del proceso natural de eferocitosis celular usando nanopartículas liposomales ricas en fosfatidil serina como imitadores de cuerpos apoptóticos que contengan autoantígenos. Durante la eferocitosis, las células presentadoras de antígenos reconocen los lípidos de fosfatidil serina en la superficie de los apoptosomas como una señal de fagocitosis y de tolerogénesis hacia los antígenos que contengan, provocando una cadena de respuestas celulares en el sistema inmune que lo lleva a adoptar un fenotipo antiinflamatorio, regulador y tolerogénico hacia el tejido en concreto. En los diferentes trabajos presentados, se hipotetiza y comprueba que el uso de liposomas ricos en fosfatidil serina que contengan péptidos de insulina podrían frenar la destrucción de las células  $\beta$  pancreáticas, previniendo la diabetes tipo 1 y reduciendo la insulinitis en ratones diabéticos no obesos. Esta terapia se ha usado en otras enfermedades autoinmunes, como la artritis reumatoide, con resultados igualmente alentadores. Concluyendo una prometedora rama terapéutica con gran interés en futuras investigaciones.

Autoimmune diseases are caused by the loss of self-tolerance towards an autoantigen by the patient's immune system, causing tissue destruction, which in many cases results in chronic pathologies or even death. Given the need for an innovative non-palliative treatment, this review article offers a collection of information on a technique that makes use of the natural process of cellular efferocytosis using phosphatidyl serine-rich liposomal nanoparticles as mimics of autoantigen-containing apoptotic bodies. During efferocytosis, antigen-presenting cells recognize phosphatidyl serine lipids on the surface of apoptosomes as a signal for phagocytosis and tolerogenesis towards the antigens they contain, triggering a chain of cellular responses in the immune system that leads it to adopt an anti-inflammatory, regulatory and tolerogenic phenotype towards the specific tissue. In the different studies presented, it is hypothesized and verified that the use of liposomes rich in phosphatidyl serine containing insulin peptides could stop the destruction of pancreatic  $\beta$  cells, preventing type 1 diabetes and reducing insulinitis in non-obese diabetic mice. This therapy has been used in other autoimmune diseases, such as rheumatoid arthritis, with equally encouraging results. Concluding a promising therapeutic branch with great interest in future research.

# Uso de nanopartículas liposomales en la reeducación del sistema inmune en diabetes tipo 1 y otras enfermedades autoinmunes.

Liposomal nanoparticles usage for the immune system reeducation in diabetes type 1 and other autoimmune diseases.

Pedro Molinero Rodríguez (nº 1473989)

Pemoli02@ucm.es

Tutora: Lola María Fernández Messina

lolafern@ucm.es

Universidad Complutense de Madrid, Facultad de ciencias biológicas

## Resumen

Las enfermedades autoinmunes son provocadas por la pérdida de tolerancia hacia un autoantígeno por parte del sistema inmunitario del paciente, causando la destrucción de tejidos, lo que en muchos casos supone la aparición de patologías crónicas o incluso la muerte. Dada la necesidad de un tratamiento innovador no paliativo, en este artículo de revisión se ofrece la recopilación de información sobre una técnica que hace uso del proceso natural de eferocitosis celular usando nanopartículas liposomales ricas en fosfatidil serina como imitadores de cuerpos apoptóticos que contengan autoantígenos. Durante la eferocitosis, las células presentadoras de antígenos reconocen los lípidos de fosfatidil serina en la superficie de los apoptosomas como una señal de fagocitosis y de tolerogénesis hacia los antígenos que contengan, provocando una cadena de respuestas celulares en el sistema inmune que lo lleva a adoptar un fenotipo antiinflamatorio, regulador y tolerogénico hacia el tejido en concreto. En los diferentes trabajos presentados, se hipotetiza y comprueba que el uso de liposomas ricos en fosfatidil serina que contengan péptidos de insulina podrían frenar la destrucción de las células  $\beta$  pancreáticas, previniendo la diabetes tipo 1 y reduciendo la insulinitis en ratones diabéticos no obesos. Esta terapia se ha usado en otras enfermedades autoinmunes, como la artritis reumatoide, con resultados igualmente alentadores. Concluyendo una prometedora rama terapéutica con gran interés en futuras investigaciones.

*Palabras Clave:* Enfermedad autoinmune; Autoantígeno; Eferocitosis; Diabetes tipo 1; Artritis reumatoide; Nanopartículas liposomales.

## Abstract

Autoimmune diseases are caused by the loss of self-tolerance towards an autoantigen by the patient's immune system, causing tissue destruction, which in many cases results in chronic pathologies or even death. Given the need for an innovative non-palliative treatment, this review article offers a collection of information on a technique that makes use of the natural process of cellular efferocytosis using phosphatidyl serine-rich liposomal nanoparticles as mimics of autoantigen-containing apoptotic bodies. During efferocytosis, antigen-presenting cells recognize phosphatidyl serine lipids on the surface of apoptosomes as a signal for phagocytosis and tolerogenesis towards the antigens they contain, triggering a chain of cellular responses in the immune system that leads it to adopt an anti-inflammatory, regulatory and tolerogenic phenotype towards the specific tissue. In the different studies presented, it is hypothesized and verified that the use of liposomes rich in phosphatidyl serine containing insulin peptides could stop the destruction of pancreatic  $\beta$  cells, preventing type 1 diabetes and reducing insulinitis in non-obese diabetic mice. This therapy has been used in other autoimmune diseases, such as rheumatoid arthritis, with equally encouraging results. Concluding a promising therapeutic branch with great interest in future research.

*Keywords:* Autoimmune disease; Autoantigen; Efferocytosis; Type 1 diabetes; Rheumatoid arthritis; Liposomal nanoparticles.

---

## 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades autoinmunes se caracterizan por la destrucción de los tejidos sanos del paciente a manos su propio sistema inmunitario como consecuencia de la ausencia de tolerancia hacia antígenos propio. Usualmente estas enfermedades presentan un fenotipo crónico que puede llegar a ser letal, además de no conocerse con seguridad su causa en muchos casos.

Es sabido que en las últimas décadas el número de diagnósticos de este tipo de enfermedades ha aumentado de manera exponencial principalmente debido a los nuevos métodos de diagnóstico y tratamientos que permiten paliar los síntomas o frenar su avance. Estos, normalmente, incluyen inmunosupresores y otros medicamentos relacionados con

efectos a largo plazo, como ocurre en la enfermedad de la esclerosis múltiple (MS), o con drogas que suplementan las funciones del tejido destruido en el caso de la diabetes mellitus tipo 1 (T1D). Dada la necesidad de un nuevo tratamiento que mejore o salve la vida de los pacientes con desórdenes autoinmunes, y teniendo en cuenta la gran cantidad de información disponible, este artículo se ofrece a recabar y resumir información sobre prometedoras tecnologías e investigaciones actuales.

Los pacientes de T1D presentan una reducción de células  $\beta$  (encargadas de la producción de insulina, y por tanto de la regulación de la concentración de glucosa en sangre) como consecuencia de una respuesta autoinmune, además de cierto grado de insulinitis. El principal objetivo en la prevención de la T1D radica en generar artificialmente tolerancia hacia antígenos propios de células  $\beta$ , mediante el proceso natural de eferocitosis, que consiste en la captación por parte de células presentadoras de antígenos (APCs) de cuerpos apoptóticos que contengan autoantígenos de tal manera que las APC adopten un fenotipo semimaduro o tolerogénico hacia ellos.

Durante la apoptosis, los lípidos de fosfatidil serina (PS) normalmente presentes en la capa interna de la membrana celular, migran a la capa exterior. Esto constituye una señal celular que provoca la eferocitosis por parte de los macrófagos e induce tolerancia hacia los autoantígenos del interior del apoptosoma.

Esta característica se ha probado en ratones diabéticos no obesos (NOD) a fin de reducir el grado de insulinitis y restaurar la tolerancia hacia las células  $\beta$  pancreáticas. Dada la dificultad del aislamiento de cuerpos apoptóticos de células  $\beta$ , se optó por sintetizar artificialmente partículas liposomales ricas en PS que contuviesen autoantígenos para imitar el comportamiento de los apoptosomas. De esta manera la producción de liposomas de fosfatidil serina (PS-lipo) era mucho más barata, sencilla y con gran versatilidad a la hora de modificarlos. La tecnología basada en nanopartículas liposomales ha avanzado muchos en los últimos años, utilizándose en vacunas, tratamientos o como vectores para encapsular y proteger moléculas frágiles en terapias génicas.

El mecanismo de eferocitosis está muy conservado filogenéticamente, se trata de un proceso natural y propio del individuo similar al que ocurriría en caso de una infección vírica, en la que las APCs, principalmente células dendríticas (DC), capturan los antígenos en cuestión y tras un proceso de maduración y procesamiento antigénico, éstos son presentados en la superficie de membrana, expuestos por un complejo proteico llamado “complejo principal de histocompatibilidad de clase II” (MHC II), propio de las APCs. Estos complejos permiten la maduración de los linfocitos T naive a T efectores, los cuales reconocerán el antígeno y llevarán a cabo la respuesta celular.

En el caso de la eferocitosis, dónde se debe reconocer el antígeno fagocitado como propio, la PS presente en la superficie de los PS-lipo impide la completa maduración del complejo MHC II-Autoantígeno, lo que en lugar de inducir un fenotipo citotóxico en los linfocitos T, los hará diferenciarse en linfocitos T reguladores (Treg), que tendrán capacidad antiinflamatoria y pondrán fin a la respuesta autoinmune. Las células dendríticas con este complejo inmaduro se denominarán células dendríticas tolerogénicas (tolDC).

Se conoce que, en pacientes diabéticos, niveles no normo glucémicos en sangre pueden influir en la velocidad en la que las APCs fagocitan los cuerpos apoptóticos, sin embargo, esto no ha supuesto impedimentos en los experimentos o resultados descritos en este trabajo de revisión.

Recientemente se conoce la capacidad presentadora de antígenos de los linfocitos B y su papel importante en T1D, por lo que se especuló la posibilidad de una versión tolerogénica de esta población de APCs en presencia de liposomas-PS cargados con autoantígenos. Las observaciones indican que, de manera similar a lo que ocurre en el caso de los linfocitos T en presencia de tolDC, los linfocitos B expresan un fenotipo regulador antiinflamatorio que promueve una homeostasis y la síntesis de citoquinas reguladoras, como la IL-10.

Los principios de esta terapia se han expandido también al tratamiento de la artritis reumatoide (RA), una enfermedad autoinmune que afecta principalmente a las sinovias articulares y causa la degradación del hueso articular. Se hipotetiza que la causa de RA se encuentra en factores genéticos y ambientales que provocan citrulinaciones en las proteínas articulares disparando la respuesta autoinmune frente a ellas. Se especula que la inducción de tolerancia hacia estas

proteínas podría frenar la destrucción de los tejidos.

## 1.1 Materiales y metodologías experimentales

### 1.1.1 Formación del complejo liposoma-autoantígeno

Los PS-lipo fueron sintetizados para asemejarse en composición y diámetro a la membrana plasmática que compondría un apoptosoma: con un alto porcentaje de PS, fosfatidil colina, y colesterol. Los autoantígenos seleccionados con los que se rellenarían los PS-lipo, serían los péptidos insulínicos A y B (PSAB-lipo): dos cadenas peptídicas fruto de la producción natural de esta hormona, y que se conocen por ser dos epítomos importantes en la respuesta autoinmune en pacientes con T1D.

### 1.1.2 Fagocitosis de PS-lipo por DC *ex vivo* e *in vivo*

Se comprobó que el proceso de fagocitosis de los liposomas (trascendental para la eferocitosis) se daba correctamente cuando se cultivaban DC inmaduras (en cultivos basales) o DC maduras (cultivo con lipopolisacáridos) provenientes de células madre de la médula ósea. Para ello, se añadieron liposomas marcados con fluorescencia al cultivo. Después de unas horas, y de un intenso lavado de las células con PBS para quitar restos de liposomas acoplados a la membrana, se observaron las DC mediante citometría de flujo, tratando de comprobar la captación de los liposomas mediante fagocitosis.

Para poner a prueba este fenómeno *in vivo* se hicieron administraciones intraperitoneales a ratones NOD de PS-lipo fluorescentes para después proceder a la recolección de tejido adiposo, pancreático o linfático entre otros y observarlos mediante la técnica LICOR, que muestra un índice relativo de fluorescencia en cada órgano.

### 1.1.3 Proliferación de linfocitos T

Se cultivaron DC maduras e inmaduras cargadas con PS-lipo rellenos con insulina o vacíos, se dejaron expresar su fenotipo tolerogénico antes de añadir al cultivo linfocitos T obtenidos del bazo de ratones NOD y seleccionados mediante anticuerpos. Tras 5 días de cocultivación, se hizo un recuento de linfocitos T y de la concentración de citoquinas reguladoras secretadas.

### 1.1.4 Prevención de T1D y grado de insulinitis

Se aplicaron tratamientos con PS-lipo cargados con insulina a ratones NOD sin síntomas y normoglucémicos. Su peso corporal y nivel de glucosa en sangre fue monitoreado durante 22 semanas, considerándose diabéticos a los ratones con glucosuria por encima de 300mg/dl

Al finalizar el experimento, se observaron los páncreas de aquellos ratones que no habían desarrollado la enfermedad, buscando indicios de insulinitis en los islotes de Langerhans y clasificándose en distintos grados.

### 1.1.5 Presentación de autoantígenos y análisis de MHC II

Ratones NOD fueron tratados con inyecciones de PS-lipo cargados con péptido de insulina, mientras que un grupo control fue tratado con liposomas cargados de insulina sin PS presente en su superficie. Tras la incubación, se extrajo tejido linfático pancreático y tejido del bazo para valorar la presencia de la proteína MCH II.

### 1.1.6 Inducción y tratamiento de RA en ratones

Se conoce que la vimentina citrulina mutada (MCV) es un epítomo clave en la respuesta autoinmune en la RA. Para la



inducción de esta enfermedad en ratones sanos, se utilizará un método mediante antígeno modificado, que consistirá en la inyección de MCV a ratones hembra, imitando la respuesta natural del organismo de síntesis de anticuerpos anti-MCV.

Trés días después, se aplicaron inyecciones de PSMCV-lipo y PSVim(vimentina)-lipo en varias ocasiones a lo largo de 14 días.

## 2. METODOLOGÍA DE REVISIÓN LITERARIA

Los materiales utilizados en esta revisión bibliográfica fueron seleccionados tras una primera lectura sistemática de una baraja de artículos científicos experimentales y revistas científicas que trataban métodos y tecnologías aplicadas a la cura de la diabetes mellitus tipo 1.

Entre las fuentes de información se encuentran Pubmed, Sci hub, Google académico, o artículos recomendados expresamente por miembros de los diversos grupos de investigación sobre el tema. El método usado para la búsqueda de artículos fue principalmente mediante cadenas de artículos desde las referencias o contactando con referentes del sector.

Se decidió restringir y centrar esta revisión hacia un único tipo de terapia tratada por un grupo de investigación español sobre la inmunología de la diabetes daba la innovadora y prometedora tecnología que usa y que se trata en estas páginas. Tras contactar con la directora de dicho grupo, Dra. Marta Vives-Pi, doctora en medicina y cirugía; licenciada en biología; investigadora del Institut Germans Trias i Pujol (IGTP) y profesora de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB), quien muy amablemente concedió una entrevista en pro de esta revisión, facilitó diversos artículos científicos de los cuales se extrajeron los datos usados en esta recopilación.

Tras la selección de los artículos y le lectura exhaustiva de ellos, se extrajeron las ideas principales priorizando los fundamentos teóricos frente a los técnicos, adaptándose al público objetivo y resumiendo los métodos empleados en estos experimentos de tal manera que resulte en una lectura sencilla y explicativa pero completa para el lector.

## 3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

### 3.1 Los PSAB-lipo son capturados por DC

Ambos tipos de liposomas PS (los cargados con péptido A o B insulínicos y los vacíos o control) presentaban valores de diámetro, diferencia de potencial de membrana (potencial Zeta) y morfologías (vesicular. Ver Fig. 1A) muy similares entre sí y similares a los de cuerpos apoptóticos naturales de las células  $\beta$ .

Los análisis posteriores del cultivo (gráfica en Fig.1B) demuestran una efectividad de la fagocitosis del  $75,2 \pm 6,38\%$  tras 5 minutos de cultivo a  $37^{\circ}\text{C}$ . Los resultados del cultivo durante 30 minutos se muestran en la Fig. 1C.

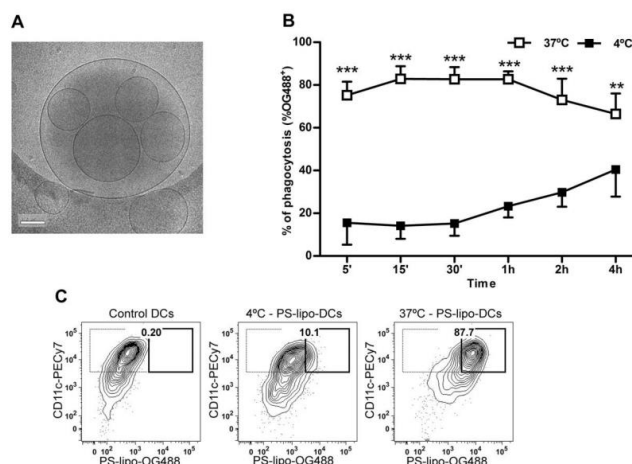


Fig 1. Características de los liposomas. A) Imágenes de microscopía electrónica de transmisión criogénica de liposomas PSAB. Barra = 0,2  $\mu$ m. B) Análisis del curso temporal de la captura de liposomas PS marcados con OG488 100  $\mu$ M (liposoma PS OG488) por DC a 37  $^{\circ}$ C (cuadrados blancos) ya 4  $^{\circ}$ C (cuadrados negros). Los resultados se expresan como media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes (\*\* $p$ <0,001, \*\* $p$ <0,01, ANOVA de dos vías). C) Gráficos de contorno de citometría de flujo de la captación de liposomas PS (OG488+) por DC (CD11c+). De izquierda a derecha, DC de control, DC cocultivadas con liposoma PS OG488 a 4  $^{\circ}$ C y a 37  $^{\circ}$ C. Se muestra un experimento representativo de tres. El porcentaje de captura de liposomas (línea gruesa) se refiere al subconjunto de células CD11c+ (línea delgada).

### 3.2 Los PS-lipo inducen un fenotipo semimaduro en DC

En la Fig.2A se muestra la viabilidad celular de las DC después de añadir liposomas en comparación con la viabilidad antes del cocultivo, presenta resultados muy similares.

Fig.2B expone una mayor presencia de las proteínas CD86 y CD40 (proteínas coestimuladoras de células efectoras) en la membrana de las DC inmaduras después de la fagocitosis de PS/PSAB-lipo, lo que significa un fenotipo semimaduro y por tanto tolerogénico. Las DC maduras de control (tratadas con lipopolisacáridos) presentaron altos niveles de moléculas coestimuladoras. Los niveles aumentaron después de su exposición a PS/PSAB-lipo, siendo superiores a los de las DC inmaduras. Mientras que la captura de PS/PSAB-lipo por parte de las DC inmaduras (iDC) no aumentó los niveles de MHC II en membrana, sí lo hizo con las DC maduras (mDC)

Se midieron los niveles de prostaglandina E2 (PGE2), hormona indicadora de una respuesta celular específica, secretadas por DC después del tratamiento con PS/PSAB-lipo, obteniéndose una mayor cantidad en el sobrenadante del cultivo mDC respecto a iDC. Fig.3

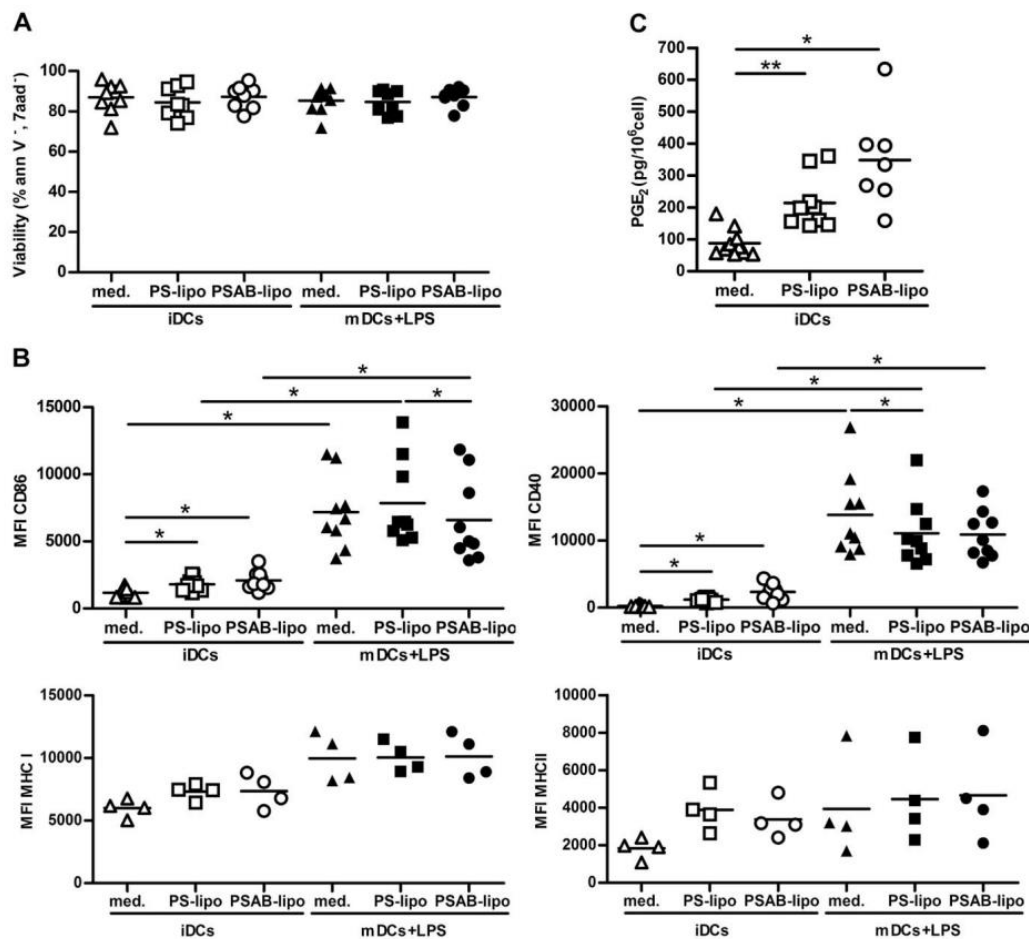


Fig. 2. Efectos de la captura de PS-liposomas en fenotipo de DCs. A) Viabilidad de las DC evaluada mediante tinción con anexina V y 7aad. Los símbolos blancos representan iDC, antes (triángulos) y después de la captura de liposomas PS (cuadrados) o liposomas PSAB (círculos), 24 horas después del cultivo. Los símbolos negros representan la viabilidad de las DC maduras (mDC) antes (triángulos) y después de la captura de liposomas PS (cuadrados) o liposomas PSAB (círculos) después del estímulo proinflamatorio (LPS). Las líneas muestran la media de al menos ocho experimentos independientes. B) Mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI) para la expresión de membrana de CD86, CD40, MHC Clase I y MHC Clase II en CD antes y después de la captura de liposomas (símbolos blancos) y después de la exposición a LPS (símbolos negros). Las líneas muestran la media de al menos cuatro experimentos independientes. Las comparaciones dentro de cada grupo y entre condiciones de maduración pareadas mostraron diferencias significativas.

### 3.3 Inhibición de la proliferación de linfocitos T autorreactivos por DC cargadas con PS-lipo

La captura de PSAB-lipo no supuso un aumento del reclutamiento de linfocitos T autólogos por parte de las iDC. La proliferación de linfocitos T por parte de las mDC fue mayor que iDC, sin embargo, tras la captura de liposomas, esta tasa de reclutamiento disminuyó, lo que sugiere una efectividad de los liposomas en las mDC.

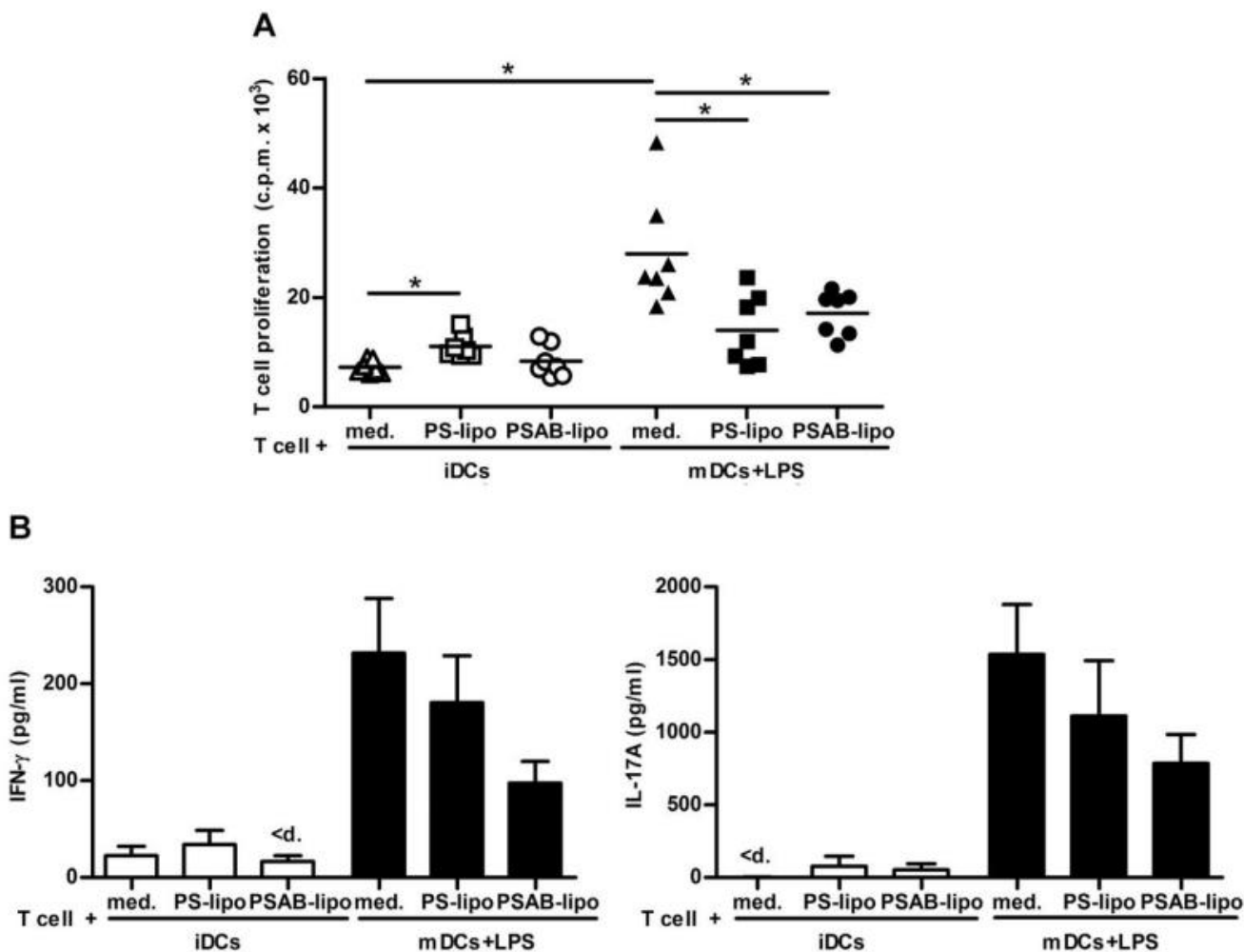


Fig. 3. Pérdida de la capacidad de las DC para inducir la proliferación de células T autólogas después de la captura de liposomas PS y la secreción de citoquinas. A) Proliferación autóloga de células T (cpm para PSAB-liposomas (círculos blancos), con insulina (20  $\mu$ g/ml) en una proporción de 1:10 durante 6 días. Los símbolos negros representan la proliferación inducida por CD maduras (mDC) antes (triángulos) y después de la captura de PS-liposomas (cuadrados) o PSAB-liposomas (círculos), previamente activados con estímulos proinflamatorios LPS (100 ng/ml). Las líneas muestran la media de siete experimentos independientes. Las comparaciones dentro de cada grupo y entre pares las condiciones de maduración mostraron diferencias significativas.

### 3.4 PSAB-lipo disminuye la incidencia de T1D e insulinitis en ratones NOD

Los ratones NOD fueron tratados con la terapia antes de manifestar la enfermedad con 8 semanas de vida. Se dividieron en tres grupos: Los ratones NOD control, tratados con suero salino desarrollaron la enfermedad a las 11 semanas de vida con una incidencia del 84,62%. Los ratones tratados con PS-lipo vacíos desarrollaron la enfermedad a las 15 semanas de vida con una incidencia del 83,33%. Como era de esperar, no se observaron diferencias significativas. Los ratones NOD tratados con PS-lipo llenos de péptidos de insulina (autoantígenos) desarrollaron la enfermedad a las 16 semanas de vida con una incidencia del 50%, presentando una disminución significativa.

Los niveles de insulinitis fueron medidos y organizados en distintos grados después del experimento. El grado de insulinitis en los ratones control, fue alto, como se esperaba. En los ratones tratados con PS-lipo vacíos, fue ligeramente menor, no siendo significativo, mientras que en ratones tratados con liposomas con autoantígenos presentó una reducción significativa en comparación con el grupo control, y una reducción no significativa con el grupo tratado con liposomas vacíos.

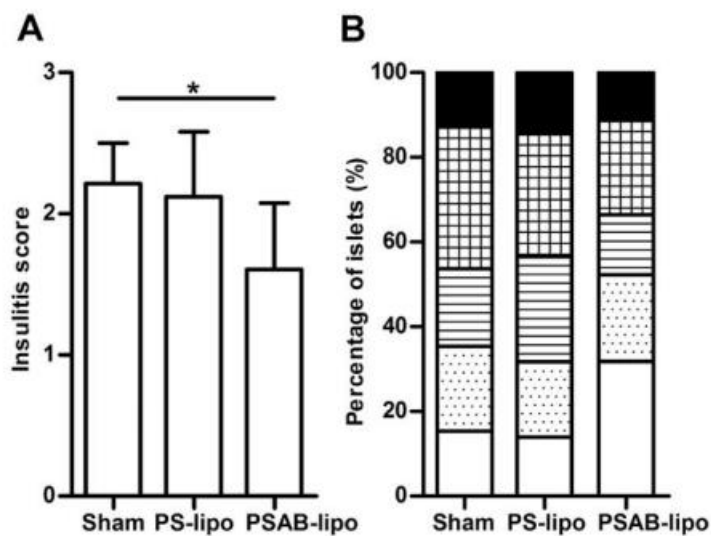


Fig. 4. Reducción de la insulinitis tras la administración de liposomas PSAB. A) Puntuación de insulinitis de ratones no diabéticos al final del seguimiento (30 semanas), control (n = 4), liposomas PS (PS-lipo, n = 3) y liposomas PSAB que contienen autoantígenos (PSAB-lipo, n = 6). Los resultados son la media  $\pm$  DE (\*p0,05, prueba de Mann Whitney). 11 / 19 Incidencia acumulada (porcentaje) de T1D en ratones NOD tratados con liposomas PSAB (PSAB-lipo, círculos, n = 12), liposomas PS (PS-lipo, cuadrados, n = 18) y grupo control (triángulos, n = 26). Se encontraron diferencias significativas cuando se comparó el grupo tratado con PSAB-liposomas versus el grupo control (\*p0.05, análisis de rango logarítmico de Kaplan-Meier). B) Porcentaje de isletos en cada una de las categorías de infiltración: Blanco = 0, sin insulinitis; Punteado = 1, periinsular; Rayado = 2, insulinitis leve (75 % de infiltración de isletos).

### 3.5 PS-lipo cargados con autoantígenos disminuye la gravedad de RA

Tras inducir la artificialmente RA en distintos grupos de ratones hembra, a aplicaron los tratamientos con PSMCV-lipo, PSVim-lipo, y PS-lipo vacíos.

Los ratones inyectados con MCV desarrollaron la enfermedad a los pocos días tal y como se esperaba, presentando notable degradación articular, resorción ósea e inflamación de la vaina sinovial en las rodillas. El grupo enfermos tratado con PSMCV-lipo redujo considerablemente la hinchazón articular en comparación con el grupo tratado con liposomas vacíos, mientras que en el grupo tratado con PSVim-lipo no se encontraron variaciones.

El análisis posterior de citometría de flujo mostró altos niveles de células progenitoras de osteoclastos

(responsables del deterioro óseo) RANK<sup>+</sup> y CSFR<sup>+</sup> en la médula ósea de los ratones a los que se les aplicó el tratamiento con liposomas vacíos en comparación con el grupo control al que se le aplicó suero salino en lugar de MCV durante la inducción de la enfermedad. Sin embargo, los niveles de células progenitoras de osteoclastos En los grupos PSMCV-lipo y PSVim-lipo se redujeron considerablemente en contraste con el grupo PS-lipo. Por último, mientras el grupo tratado con liposomas vacíos mostraba niveles altos de erosión ósea y sinovitis, el grupo tratado con autoantígenos destacó por su descenso en la severidad de estos síntomas.

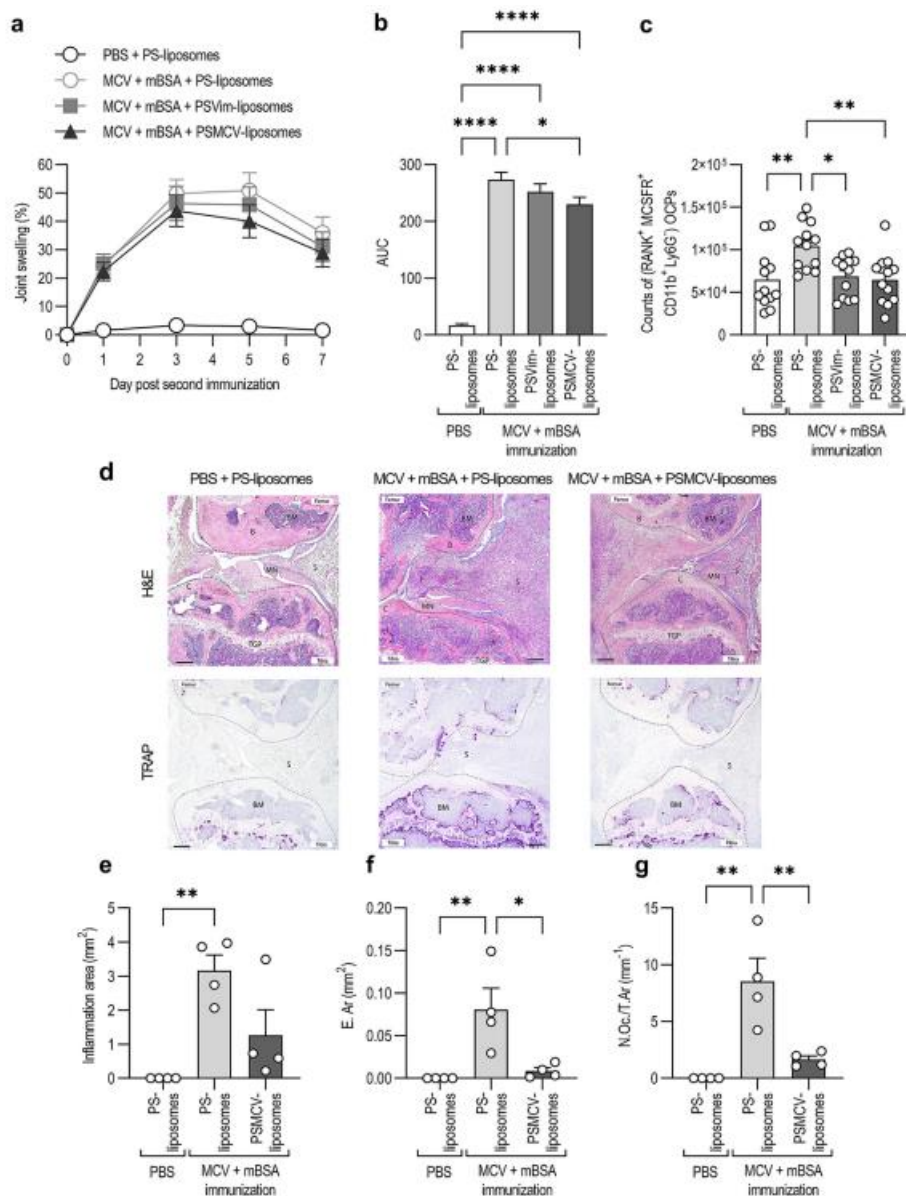


Fig. 6. Efecto de los PS-liposomas en la RA experimental. (a) Hinchazón de la rodilla y (b) AUC correspondiente medida en ratones inmunizados con una combinación de MCV y mBSA o un control de PBS, y tratados con liposomas de PS vacíos o liposomas de PSVim o liposomas de PSMCV (n = 12). c Recuentos de OCP (RANK<sup>+</sup> MCSFR<sup>+</sup>) de médula ósea 14 días después de la primera inmunización. (d) análisis histológico. Abreviaciones: cartílago (C), hueso (B), médula ósea (BM), menisco (MN), membrana sinovial (S), placa de crecimiento tibial (TGP). Las líneas punteadas bordean la tibia y el fémur; las líneas de puntos azules bordean la membrana sinovial, las líneas punteadas de color púrpura indican la superficie erosionada, las puntas de flecha moradas indican osteoclastos en el área erosionada. La barra de escala es de 200  $\mu$ m. (e) Cuantificación del área de inflamación, (f) área erosionada y (g) número de osteoclastos por área de tejido.

#### 4. CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

Los datos presentados en este trabajo de revisión demuestran que la síntesis de partículas liposomales que se asemejen a apoptosomas es viable, y que estas pueden ser utilizadas para inducir la eferocitosis y, de manera exitosa, promover un fenotipo tolerogénico en células presentadoras de antígenos. Esta terapia presenta resultados prometedores a la hora de prevenir la diabetes tipo 1 en ratones NOD, y al evitar o revertir síntomas de artritis reumatoide. Asimismo, se demuestra la capacidad de las células dendríticas tolerogénicas de evitar la proliferación de linfocitos T autorreactivos, frenando la respuesta autoinmune. Se demuestra la importancia de la expresión de PS en la superficie de los liposomas para su captación por las células fagocíticas, y la importancia de los autoantígenos para desatar la respuesta tolerogénica.

Se conoce y se aclara que esta terapia es inocua para el organismo pues todos los procesos y biomateriales usados son propios y están presentes en mamíferos.

Se especula que tras la desaparición de los linfocitos de memoria tolerogénicos meses después del tratamiento, sería necesario repetir la dosis de recuerdo de manera similar a como se haría con una vacuna.

Se destaca y especula que, para el tratamiento de pacientes con diabetes avanzada, sería necesario acompañar esta terapia con otra que promueva la regeneración de las células  $\beta$  dada su baja capacidad de regeneración natural.

#### 5. AGRADECIMIENTOS

En agradecimiento a la doctora Marta Vives-Pi por la información facilitada, por las molestias tomadas y por inspirar a un joven investigador.

En agradecimiento a la doctora Lola María Fernández por su labor como tutora y orientadora en este proyecto.

En agradecimiento mis padres, quienes, incansablemente, me alientan y apoyan a seguir mi sueño en el camino de la investigación científica.

En agradecimiento a mi hermano, Rubén, a quién admiro por el coraje y optimismo con el que enfrenta la diabetes desde tan temprana edad.

#### 6. BIBLIOGRAFÍA

- Rodríguez-Fernández, S., Almenara-Fuentes, L., Perna-Barrull, D., Barneda, B., & Vives-Pi, M. (2021). A century later, still fighting back: antigen-specific immunotherapies for type 1 diabetes. *Immunology & Cell Biology*, 99(5), 461-474. <https://doi.org/10.1111/imcb.12439>
- Vives-Pi, M., & Pujol-Autonell, I. (2015). What potential is there for liposomal-based nanotherapy for the treatment of Type 1 diabetes? *Nanomedicine*, 10(19), 2955-2958. <https://doi.org/10.2217/nnm.15.140>
- Vives-Pi M, Pujol-Autonell I. Estrategias innovadoras de base inmunológica en diabetes mellitus tipo 1. *Endocrinol Nutr*. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.endonu.2015.07.003>
- Pujol-Autonell, I., Serracant-Prat, A., Cano-Sarabia, M., Ampudia, R. M., Rodríguez-Fernández, S., Sánchez, A., Izquierdo, C., Stratmann, T., Puig-Domingo, M., MasPOCH, D., Verdaguier, J., & Vives-Pi, M. (2015). Use of Autoantigen-Loaded Phosphatidylserine-Liposomes to Arrest Autoimmunity in Type 1 Diabetes. *PLOS ONE*, 10(6), e0127057. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127057>
- Almenara-Fuentes, L., Rodríguez-Fernández, S., Rosell-Mases, E., Kachler, K., You, A., Salvado, M., Andreev, D., Steffen, U., Bang, H., Bozec, A., Schett, G., Le Panse, R., Verdaguier, J., Dalmases, M., Rodríguez-Vidal, S., Barneda-Zahonero, B., & Vives-Pi, M. (2023). A new platform for autoimmune diseases. Inducing tolerance with liposomes encapsulating autoantigens. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 48, 102635. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2022.102635>
- Vives-Pi, M., Rodríguez-Fernández, S., & Pujol-Autonell, I. (2015). How apoptotic  $\beta$ -cells direct immune response to tolerance or to autoimmune diabetes: a review. *Apoptosis*, 20(3), 263-272. <https://doi.org/10.1007/s10495-015-1090-8>

**76796: Transformación por electroporación de *Aspergillus niger* empleando CRISPR-Cas9 |  
Electroporation-based transformation of *Aspergillus niger* using CRISPR-Cas9.****Área de conocimiento:** BIOLOGÍA**Autor(es):** Nadia León Recio**Tutor(es):** Jéssica Gil Serna**Universidad:** Universidad Complutense de Madrid**Facultad:** Facultad de Ciencias Biológicas**Titulación:** Grado en Biología**Formato:** Comunicación Oral - Investigación básica**Palabras Clave:** *Aspergillus niger*, CRISPR Cas9, ocratoxina A, halogenasa y biocontrol. | *Aspergillus niger*, CRISPR Cas9, ochratoxin A, halogenase, and biocontrol.

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de hongos filamentosos que pueden estar presentes en alimentos como cereales, frutas y frutos secos. Se conocen 600 y entre ellos destaca la ocratoxina A por su alta toxicidad. Está sintetizada principalmente por los géneros, *Penicillium* y *Aspergillus*. Estudios genéticos han permitido determinar que, al igual que ocurre con otras micotoxinas, los genes implicados en su síntesis están agrupados en un clúster compuesto por 4 genes estructurales entre los que se encuentra el que codifica la halogenasa. Valiéndose de herramientas de edición genética como CRISPR-Cas9, es posible crear mutantes deficientes en la síntesis de la micotoxina. Empleando un sgRNA, la endonucleasa Cas9 puede reconocer y unirse a la secuencia diana para realizar un corte que sea reparado mediante unión de extremos no homólogos. El objetivo de este trabajo ha sido desarrollar un protocolo de transformación de *Aspergillus niger* mediante electroporación empleando un complejo ribonucleoproteico ensamblado in vitro. Con ello, se pretende obtener mutantes para el gen que codifica la halogenasa; al no emplear marcador de selección, deben ser analizados mediante secuenciación.

Mycotoxins are secondary metabolites of filamentous fungi that can be present in food products such as cereals, fruits, or nuts. Out of the 600 known mycotoxins, ochratoxin A stands out for its high toxicity and it is mainly synthesized by the genera *Penicillium* and *Aspergillus*. Genetic studies have determined that, as in the case of other mycotoxins, the genes involved in its synthesis are clustered together and the region is composed of 4 structural genes, including the halogenase-encoding one. Using genetic editing tools such as CRISPR-Cas9, it is possible to create mutants which are deficient in the synthesis of the mycotoxin. By employing a sgRNA, the endonuclease Cas9 can recognize and bind to the target sequence to make a cut that is repaired through non-homologous end joining. The aim of this work was to develop a transformation protocol for *Aspergillus niger* using electroporation with the ribonucleoprotein complex assembled in vitro. This is intended to obtain mutants for the halogenase encoding gene, which must be analyzed through sequencing since a selection marker was not used.

## Transformación por electroporación de *Aspergillus niger* empleando CRISPR-Cas9

### Electroporation-based transformation of *Aspergillus niger* using CRISPR-Cas9.

Resumen: Las micotoxinas son metabolitos secundarios de hongos filamentosos que pueden estar presentes en alimentos como cereales, frutas y frutos secos. Se conocen 600 y entre ellos destaca la ocratoxina A por su alta toxicidad. Está sintetizada principalmente por los géneros, *Penicillium* y *Aspergillus*. Estudios genéticos han permitido determinar que, al igual que ocurre con otras micotoxinas, los genes implicados en su síntesis están agrupados en un clúster compuesto por 4 genes estructurales entre los que se encuentra el que codifica la halogenasa. Valiéndose de herramientas de edición genética como CRISPR-Cas9, es posible crear mutantes deficientes en la síntesis de la micotoxina. Empleando un sgRNA, la endonucleasa Cas9 puede reconocer y unirse a la secuencia diana para realizar un corte que sea reparado mediante unión de extremos no homólogos. El objetivo de este trabajo ha sido desarrollar un protocolo de transformación de *Aspergillus niger* mediante electroporación empleando un complejo ribonucleoproteico ensamblado *in vitro*. Con ello, se pretende obtener mutantes para el gen que codifica la halogenasa; al no emplear marcador de selección, deben ser analizados mediante secuenciación.

Abstract: Mycotoxins are secondary metabolites of filamentous fungi that can be present in food products such as cereals, fruits, or nuts. Out of the 600 known mycotoxins, ochratoxin A stands out for its high toxicity and it is mainly synthesized by the genera *Penicillium* and *Aspergillus*. Genetic studies have determined that, as in the case of other mycotoxins, the genes involved in its synthesis are clustered together and the region is composed of 4 structural genes, including the halogenase-encoding one. Using genetic editing tools such as CRISPR-Cas9, it is possible to create mutants which are deficient in the synthesis of the mycotoxin. By employing a sgRNA, the endonuclease Cas9 can recognize and bind to the target sequence to make a cut that is repaired through non-homologous end joining. The aim of this work was to develop a transformation protocol for *Aspergillus niger* using electroporation with the ribonucleoprotein complex assembled *in vitro*. This is intended to obtain mutants for the halogenase encoding gene, which must be analyzed through sequencing since a selection marker was not used.

Palabras clave: *Aspergillus niger*, CRISPR Cas9, ocratoxina A, halogenasa y biocontrol.

Keywords: *Aspergillus niger*, CRISPR Cas9, ochratoxin A, halogenase, and biocontrol.

#### 1. Introducción

Las micotoxinas son productos tóxicos sintetizados por el metabolismo secundario de algunos hongos filamentosos, entre los que destacan los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. En la actualidad, se han descrito alrededor de 600 micotoxinas, siendo las más importantes las aflatoxinas (AF), ocratoxina A (OTA), la patulina (PAT), los tricotecenos de tipo A y B, las fumonisinas (FB), la zearalenona y la citrinina.

La ocratoxina A (OTA), producida principalmente por los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*, destaca por ser la micotoxina más común en el vino, aunque también se ha detectado en el café, cereales, leche y productos cárnicos (Tao, 2018). Como ocurre con otras micotoxinas, los genes implicados en la síntesis de la OTA están agrupados en clústers. Éste está compuesto por 4 genes estructurales que codifican para una poliquétido sintasa (PKS), una



sintetasa de péptidos no ribosomales (NRPS), una citocromo p450 monooxigenasa (P450) y una halogenasa (HAL) así como un gen regulador que codifica un factor transcripcional (BZIP) (Gil-Serna et al., 2018). Conocer la regulación de estos genes permite el desarrollo de herramientas genéticas que impidan su expresión o que ésta sea anómala.

El sistema CRISPR-Cas9 ha permitido la edición genética de hongos filamentosos (Ferrara et al., 2019; Liu et al., 2015; Shih et al., 2022; Wang et al., 2018). Este sistema consiste en una endonucleasa Cas9, que es reconocida y dirigida por un RNA guía (sgRNA) formado por una secuencia de 20 nucleótidos que hibrida con una región diana del genoma que contiene una secuencia PAM (motivo adyacente protoespaciador) (Zhang et al., 2016). La formación del complejo ribonucleoproteico (RNP), formado por la Cas9 y la sgRNA, puede generar roturas de doble cadena (DSB) en la región diana mediante el reconocimiento de esta y posterior formación de un bucle (Ferrara et al., 2019). La reparación de esta rotura mediante la unión de extremos no homólogos (NHEJ) frente a la reparación homóloga dirigida (HDR) tiene como ventaja que, al generarse mutaciones puntuales (indels) (Nakamura et al., 2019), los mutantes no se consideran transgénicos. Por todo ello, abriría muchas puertas para su aplicación con distintos fines.

El objetivo del presente trabajo fue emplear la tecnología CRISPR-Cas9 utilizando un complejo RNP exógeno para generar un mutante con pérdida de función del gen que codifica la halogenasa y, por tanto, incapaz de sintetizar ocratoxina A. Esta tecnología ha sido poco explorada en hongos filamentosos. La primera parte del estudio se ha centrado en establecer un método adecuado para la introducción del complejo RNP en protoplastos de *A. niger* mediante electroporación.

## **2. Material y métodos**

### 2.1 Material biológico y condiciones de cultivo

La cepa empleada de *A. niger* para la transformación fue CBS 513.88 por su amplio uso en procesos biotecnológicos. Además, se ha estudiado su genoma y presenta el clúster biosintético de OTA completo (Pel et al., 2007).

*Aspergillus niger* se cultivó en Agar Dextrosa y Patata (PDA, Pronadisa, España) y se incubó durante 6 días a 28°C. A partir de este cultivo, se realizó una suspensión  $5 \times 10^6$  esporas/mL de *A. niger* en suero salino al 0,9%, que se inoculó en 100 ml de Extracto de Levadura Peptona Dextrosa (YPD, Pronadisa, España) (Reilly et al., 2018) para la obtención de micelio. Posteriormente, se incubó durante 14 h a 30°C con una agitación de 260 rpm.

### 2.2 Selección y diseño del sgRNA

El primer paso fue diseñar un sgRNA utilizando como referencia la secuencia del gen de la halogenasa, para lo que se empleó la herramienta proporcionada por Integrated DNA Technologies (IDT, Estados Unidos). De las guías proporcionadas, se seleccionaron dos con el fin de realizar dos cortes en la secuencia diana: 5' AGGCTAAAGATGGCCGCACG 3' y 5' CCTCGACGGGGAAATCAAAC 3'. Con los sgRNA (Synthego, Estados Unidos), se preparó una solución de trabajo 1  $\mu$ M y se formó el complejo de ribonucleoproteína (RNP) a partir de la enzima Cas9 (IDT, Estados Unidos) diluida siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante.

### 2.3 Transformación de protoplastos

Se siguieron los protocolos de Reilly et al. (2018) y Tilburn et al. (1983) con algunas modificaciones. El micelio se filtró empleando Miracloth y un embudo estéril. Se pesaron 1,5 g, se resuspendieron en 25 mL de tampón de protoplastos y se adicionó VinoFlow®FCE (Novozymes, Suiza) (200 mg/g micelio). La mezcla se incubó en un agitador orbital a 80 rpm

durante 3 h a 28°C. La formación de protoplastos se comprobó empleando un microscopio de contraste de fases (Nikon Eclipse E200, Estados Unidos). El cultivo se separó en 2 (12,5 mL cada uno) y se añadió el mismo volumen de colchón de flotación. Los protoplastos se separaron del resto del micelio mediante centrifugación a 4°C durante 10 min a 4.400 g. Se recogieron los protoplastos sobre los que se adicionó el doble de tampón ST frío, y se mezclaron ambas soluciones.

Posteriormente, se volvió a centrifugar con las mismas condiciones previamente mencionadas. El pellet se resuspendió en 1 mL de ST frío y se realizaron tres lavados a 360 g durante 1 min con ST frío. En el último lavado, se resuspendió el pellet de protoplastos en 700 µL de Sorbitol 1M frío y se introdujeron 100 µL en una cubeta de electroporación a la que se añadió el complejo RNP. Se dejaron incubar 5 min en hielo y se electroporaron en dos condiciones: 200Ω, 25µF y 1,5kW/cm (experimento 1) y 200Ω, 25µF y 2 kW/cm (experimento 2). Además, se realizó un control en el que no se introdujo el complejo RNP y se sometió la muestra a las mismas condiciones que el experimento 1. Una vez dado el pulso, se añadió 1 ml de YPD con 0,5 M de Sorbitol a la cubeta y el volumen total se recogió en un eppendorf que se incubó a 25°C, 1 g durante 1 h. Transcurrido ese tiempo, se centrifugó a 90 g durante 5 min y se resuspendió el pellet en 500 µL de medio mínimo con 0,5M de sorbitol y vitaminas siguiendo el protocolo de Reilly et al. (2018) pero añadiendo vitaminas 10X. Se añadieron 100 µL de la suspensión a placas con medio mínimo y se incubaron a 28°C durante, al menos, una semana.

#### 2.4 Aislamiento y caracterización de posibles transformantes

Las colonias regeneradas se cuantificaron y sembraron en placas de PDA con el fin de obtener una estría monospórica. A partir de esta, se cultivaron en 1 mL de caldo Sabouraud (Pronadisa, España) durante 24 h a 28°C. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 520 g durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y los micelios se congelaron a -80°C. Posteriormente, se realizó la extracción de DNA siguiendo el protocolo de Liu et al. (2000) y se determinó la concentración de ADN a 260 nm con un espectrofotómetro Nano-Drop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Estados Unidos). Por último, se procedió a amplificar y secuenciar la región parcial del gen de la halogenasa donde se encuentran las guías seleccionadas. La PCR se realizó en un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf, Alemania), empleando 2 µL de DNA (50ng/ml), 12,5 µL NZYtaq II 2x Green Master Mix (NZYTech, Portugal), 8,5 µL agua para PCR (MO-BIO, Estados Unidos) y 1 µL de los cebadores (Metabion, Alemania) HAL\_NIG\_F (5' CGTGAACATATGGCTTCGTC 3') y HAL\_NIG\_R (5' TACGGGTCGATAAAGGCTCC 3') a 20 µM y el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, seguido de 32 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 1 min, alineamiento a 58°C durante 1 min, extensión a 72°C durante 1 min; finalizando con una elongación a 72°C durante 5 min. Los productos amplificados se detectaron mediante una electroforesis horizontal al 2% de agarosa (NZYTech, Portugal) con Green Safe (NZYTech, Portugal).

La electroforesis se llevó a cabo en tampón TAE 1X (Fisher Bioreagents, Estados Unidos) a un voltaje constante de 80V durante 30 min. Transcurrido ese tiempo, se visualizó el gel con luz UV. Los productos de PCR se purificaron empleando el kit NZYGelpure (NZYTech, Portugal) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, la secuenciación se realizó en la empresa MacroGen (España), con el equipo ABI 3730xl System (Applied Biosystems, Estados Unidos). Todos los fragmentos se secuenciaron en ambas direcciones y se confirmó la calidad de las secuencias con el programa Chromas (Technelysium, Australia). Asimismo, se comprobó su

grado de similitud con la secuencia de la cepa CBS 513.88 depositada en la base de datos del NCBI (Estados Unidos) mediante la herramienta BLAST.

### 3. Resultados

La tabla 1 recoge los resultados relativos al número de colonias regeneradas en las dos condiciones de electroporación estudiadas. La mayor frecuencia de regeneración se obtuvo en el experimento 1, mientras que en el experimento 2 el porcentaje de regeneración fue más bajo.

Por otro lado, es importante destacar que mientras que en el experimento 1 y control se observaron colonias a la semana. Por el contrario, en el experimento 2 se requirieron hasta 2 semanas para empezar a ver colonias.

Experimento	sgRNA + RNP	Número de regenerados
Control	No	185
1	Sí	95
2	Sí	43

Tabla 1. Resultados de la regeneración después de electroporación. El control no tenía sgRNA+RNP. El experimento 1 se realizó a 200 $\Omega$ , 25 $\mu$ F y 1,5 kW/cm y el experimento 2 a 200 $\Omega$ , 25 $\mu$ F y 2 kW/cm.

Al no emplear ningún marcador que permita seleccionar las colonias transformadas, el estudio es complejo, requiriéndose realizar el análisis por secuenciación previamente descrito. Hasta el momento se han analizado únicamente 16 colonias y se están estudiando 2 posibles mutantes. Se espera poder mostrar más resultados en el momento que la comunicación sea presentada.

### 4. Discusión

En este trabajo se ha desarrollado un protocolo para la transformación por electroporación de *A. niger* mediante el uso de la tecnología CRISPR-Cas9 sin el empleo de plásmidos. Hasta el momento, ningún protocolo permite transformar *A. niger* por electroporación mediante formación de RNP *in vitro*, puesto que es bastante complejo (Kwon et al., 2019). En el laboratorio se han probado técnicas habituales como la transformación con PEG-Ca, cuyos resultados no fueron óptimos porque los poros formados no permitían la entrada de un complejo tan grande. Por este motivo, se recurrió a la electroporación empleando otras soluciones (Reilly et al., 2018; Tilburn et al., 1983). La electroporación tiene como inconveniente que, si la potencia es demasiado alta, los protoplastos pueden no regenerar. Es importante que el choque eléctrico permita la formación de poros para que entre el complejo RNP, pero, al mismo tiempo, que este no sea demasiado fuerte e impida la regeneración de la membrana de los protoplastos. En vista de los resultados, se puede afirmar que en el experimento 2 hay menos regenerados, si bien la hipótesis con la que se trabaja es que habrá mayor número de transformantes. Hasta que no se analicen las secuencias, no se podrá confirmar o refutar dicha hipótesis.

### 5. Conclusiones

Este trabajo tiene como objetivo la edición genética de genes implicados en la síntesis de OTA en *A. niger*. La tecnología CRISPR-Cas9 utilizando una RNP exógena es compleja y requiere de métodos potentes para su incorporación a los protoplastos. A pesar de la dificultad que presenta la electroporación y transformación sin el empleo de plásmidos, se ha conseguido obtener colonias a partir de protoplastos electroporados.

## 6. Referencias bibliográficas

- Ferrara, M., Haidukowski, M., Logrieco, A.F., Leslie, J.F. y Mulè, G. (2019). A CRISPR-Cas9 System for Genome Editing of *Fusarium proliferatum*. *Scientific Reports*, 9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56270-9>
- Gil-Serna, J., García-Díaz, M., González-Jaén, M. T., Vázquez, C., y Patiño, B. (2018). Description of an orthologous cluster of ochratoxin A biosynthetic genes in *Aspergillus* and *Penicillium* species. A comparative analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 268, 35-43. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.028>
- Integrated DNA Technologies. (s.f.). *Alt-R CRISPR-Cas9 System: Cationic lipid delivery of CRISPR ribonucleoprotein complexes into mammalian cells*. Consultado el 6 de marzo de 2023 en <https://eu.idtdna.com/pages/support/guides-and-protocols>
- Integrated DNA Technologies (s.f.). *Custom Alt-R™ CRISPR-Cas9 guide RNA*. Consultado el 6 de marzo de 2023 en [https://eu.idtdna.com/site/order/designtool/index/CRISPR\\_CUSTOM](https://eu.idtdna.com/site/order/designtool/index/CRISPR_CUSTOM)
- Kwon, M. J., Schütze, T., Spohner, S., Haefner, S., & Meyer, V. (2019). Practical guidance for the implementation of the CRISPR genome editing tool in filamentous fungi. *Fungal Biology and Biotechnology*, 6. <https://doi.org/10.1186/s40694-019-0079-4>
- Liu, R., Chen, L., Jiang, Y., Zhou, Z., y Zou, G. (2015). Efficient genome editing in filamentous fungus *Trichoderma reesei* using the CRISPR/Cas9 system. *Cell Discovery*, 1. <https://doi.org/10.1038/celldisc.2015.7>
- Liu, D., Coloe, S., Baird, R., & Pederson, J. (2000). Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(1), 471. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.1.471-471.2000>
- Nakamura, M., Okamura, Y. y Iwai, H. (2019). Plasmid-based and -free methods using CRISPR/Cas9 system for replacement of targeted genes in *Colletotrichum sansevieriae*. *Scientific Report*, 9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55302-8>
- Pel, H. J., de Winde, J. H., Archer, D. B., Dyer, P. S., Hofmann, G., Schaap, P. J., Turner, G., de Vries, R. P., Albang, R., Albermann, K., Andersen, M. R., Bendtsen, J. D., Benen, J. A. E., van den Berg, M., Breestraat, S., Caddick, M. X., Contreras, R., Cornell, M., Coutinho, P. M., y Danchin, E. G. J. (2007). Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nature Biotechnology*, 25(2), 221–231. <https://doi.org/10.1038/nbt1282>
- Reilly, M.C., Amaike Campen, S., Simmons, B.A., Baker, S.E., Gladden, J.M. y Magnuson, J.K. (2018). Cloning and Expression of Heterologous Cellulases and Enzymes in *Aspergillus niger*. En Lübeck, M. (Eds), *Cellulases: Methods in Molecular Biology* (Vol. 1796, pp. 123-133). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7877-9\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7877-9_10)
- Shih, S. Y., Mortensen, U. H., Chang, F. R., y Tsai, H. (2022). Editing *Aspergillus terreus* using the CRISPR-Cas9 system. *Synthetic Biology*, 7(1). <https://doi.org/10.1093/synbio/ysac031>
- Tao, Y., Xie, S., Xu, F., Liu, A., Wang, Y., Chen, D., Pan, Y., Huang, L., Peng, D., Wang, X., y Yuan, Z. (2018). Ochratoxin A: Toxicity, oxidative stress and metabolism. *Food and chemical toxicology*, 112, 320-331. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.01.002>
- Tilburn, J., Scazzocchio, C., Taylor, G. G., Zabicky-Zissman, J. H., Lockington, R. A., y Davies, R. W. (1983). Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene*, 26(2-3), 205-221. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(83\)90191-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(83)90191-9)
- Wang, Q., Cobine, P. A., y Coleman, J. J. (2018). Efficient genome editing in *Fusarium oxysporum* based on CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Fungal Genetics and Biology*, 117, 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2018.05.003>

**76808: Efecto ansiogénico de la ghrelina en el teleosteo *Carassius auratus*. Anxiogenic effect of ghrelin on the teleost *Carassius auratus*.****Área de conocimiento:** BIOLOGÍA**Autor(es):** PingPing Chen, Ioannis Andrianopoulos, Nuria Saiz**Tutor(es):** Esther Isorna Alonso, Lisbeth Herrera Castillo**Universidad:** Universidad Complutense de Madrid**Facultad:** Facultad de Ciencias Biológicas**Titulación:** Grado en Biología**Formato:** Comunicación Oral - Investigación básica**Palabras Clave:** Actividad anticipatoria a la alimentación (FAA), ghrelina, carpín, ansiedad, comportamiento. Feeding anticipatory activity (FAA), ghrelin, goldfish, anxiety, behavior.

Resumen: La ghrelina es una hormona cuya función más conocida es ser el principal orexigénico periférico, induciendo la ingesta en todos los vertebrados estudiados. Además, aunque está mucho menos estudiado, se ha asociado a la ghrelina con el sistema hedónico y con la actividad locomotora, al menos en mamíferos, sin existir apenas información en peces. Concretamente se ha propuesto que la ghrelina pudiera influir en la aparición de la FAA (Food Anticipatory Activity), un aumento de la actividad locomotora previo a la hora de alimentación que se produce en animales alimentados con horario fijo, y que está controlada por el sistema circadiano. El objetivo del presente trabajo es averiguar si en peces el estado de FAA es un estado ansioso, y si la ghrelina pudiera mediar dicho estado. Para ello se empleó como modelo experimental *Carassius auratus* (carpín), especie en la cual se conoce bien el efecto orexigénico de la ghrelina y que desarrolla una robusta FAA. Para estudiar el estado de ansiedad de los animales, se emplearon dos tests comportamentales, el campo abierto, y la preferencia fondo negro-fondo blanco. Los resultados muestran claramente que los carpines tienen indicadores de ansiedad mayores en FAA que tras la ingesta, y que antagonistas de la ghrelina administrados en el momento de la FAA (D-Lys y JMV2959, ambos a 100 pg/g peso corporal, pc), actúan como ansiolíticos. Además, la ghrelina administrada tras la ingesta (10 pg/g pc), induce un estado de ansiedad similar al que se observa en animales en FAA, efecto que es revertido cuando la ghrelina se administra junto con su antagonista (D-Lys). Los resultados muestran claramente que la ghrelina, además de ser un orexigénico, tiene efecto ansiogénico en los carpines, y que dicho efecto podría estar relacionado con la búsqueda de la comida que ocurre durante la FAA.

Abstract: Ghrelin is a hormone whose most well-known function is as the main peripheral orexigenic, inducing ingestion in all studied vertebrates. Additionally, although much less studied, ghrelin has been associated with the hedonic system and locomotor activity, at least in mammals, with very little information available for fish. Specifically, it has been proposed that ghrelin could influence the onset of FAA (Food Anticipatory Activity), an increase in locomotor activity prior to feeding time that occurs in animals fed on a fixed schedule and is controlled by the circadian system. The objective of this study is to determine whether the FAA state in fish is an anxious state, and whether ghrelin could mediate that state. The experimental model used was *Carassius auratus* (goldfish), a species in which the orexigenic effect of ghrelin is well known and which develops a robust FAA. To study the animal's anxiety state, two behavioral tests were used, the open field, and the black-white background preference. The results show that the goldfish have higher anxiety indicators during FAA than after ingestion, and that ghrelin antagonists administered at the time of FAA (D-Lys and JMV2959, both at 100 pg/g body weight) act as anxiolytics. Furthermore, ghrelin administered after ingestion (10 pg/g bw) induces a state of anxiety similar to that observed in animals in FAA, an effect that is reversed when ghrelin is administered with its antagonist (D-Lys). The results clearly show that ghrelin, in addition to being an orexigenic, has an anxiogenic effect in goldfish, and that this effect could be related to the search for food that occurs during FAA.

## 1. INTRODUCCIÓN

La ghrelina es una hormona de naturaleza peptídica cuya acción orexigénica, en su forma activa, como ghrelina acilada, está muy aceptada, considerándose la principal hormona de origen periférico inductora de la ingesta en vertebrados (Delgado et al., 2017). Estudios previos apoyan que la ghrelina no solo está implicada en la regulación de ingesta, sino también en el comportamiento (Kang et al., 2011). En concreto se ha relacionado con la aparición de la actividad anticipatoria a la alimentación (FAA, del inglés Food Anticipatory Activity), un aumento de la actividad locomotora que tiene lugar en horas previas a la alimentación cuando esta se realiza a la misma hora cada día, y que está controlado por el sistema circadiano, en mamíferos (Merkestein et al., 2012) y peces (Nisembaum et al., 2014). Pese a que la relación de la FAA con los osciladores endógenos es clara (Isorna et al., 2017) se sabe aún poco de cuáles son los mediadores neurales y endocrinos que controlan la FAA, habiéndose propuesto que quizá este comportamiento comparte mecanismos de control similares a los descritos para una búsqueda de recompensa asociada a las adicciones, y que podría relacionarse por tanto más con el sistema hedónico de la ingesta que con el homeostático (Mendoza, 2019; Merkestein et al., 2012). En este sentido, estudios previos han mostrado que otros orexigénicos como la orexina, que también aumenta en la FAA, influye en el estado ansioso del teleosteo *Carassius auratus* (carpín; Nakamachi et al., 2014), y que una alimentación con horario no predecible es ansiogénica en esta especie (Saiz et al., 2022), relacionando el estado de ansiedad de estos peces con el sistema circadiano que controla los ritmos de alimentación.

El objetivo del presente trabajo es investigar si el comportamiento de FAA en peces se puede considerar un estado ansioso, y si la ghrelina puede mediar dicho estado ansioso, hipotetizando que actuaría como ansiogénico durante la FAA. Para ello se estudió utilizando el carpín como modelo experimental: (1) el comportamiento ansioso en los peces en el momento de la FAA y tras la ingesta; (2) el posible efecto ansiolítico de dos antagonistas de ghrelina (D-Lys y JMV2959); y (3) el posible efecto ansiogénico de la ghrelina.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. Modelo animal y mantenimiento

Se utilizaron carpines adquiridos en la empresa ICA S.A (Madrid). En el laboratorio los peces se mantuvieron en peceras de 60 litros con agua filtrada y aireada (n=10 peces/pecera), y con condiciones de temperatura ( $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) y fotoperiodo 12L:12D (07:00-19:00 luz, 19:00-07:00 oscuridad) controlados, alimentándose diariamente a las 10:00 con comida granulada (SeraPond), con 1,5% del peso corporal, pc, salvo que se indique otra cosa en los diseños experimentales. Todos los procedimientos experimentales realizados durante el presente trabajo cumplen con la normativa vigente, y se han aprobado en el Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid.

### 2.2. Fármacos empleados y administración

La ghrelina (19 aminoácidos, Bachem) se inyectó a una dosis de 10 pg/g pc, y los dos antagonistas, [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 y JMV2959 (Sigma Aldrich), a 100 pg/g pc. El vehículo empleado fue suero salino para peces en los tres casos (Nisembaum et al., 2014). Los 3 compuestos se diluyeron y se congelaron en alícuotas a la concentración necesaria para la administración (1  $\mu\text{M}$  ghrelina, y 10  $\mu\text{M}$  antagonistas), que se mantuvieron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Para la administración de los diferentes fármacos se realizó una inyección intraperitoneal a un volumen de 10  $\mu\text{l/g}$  de pc en animales previamente anestesiados con Tricaína-metanosulfonato (MS-222, 0,14 g/l) añadida al agua, tamponada con bicarbonato. En

los animales con doble tratamiento se dejó 10 min entre ambas inyecciones, inyectándose primero el antagonista.

### 2.3. Diseños experimentales

#### 2.3.1. Estudio de parámetros de ansiedad en la FAA y tras la comida.

Se emplearon 40 peces ( $4,2 \pm 1,2$  g) aclimatados a un fotoperiodo 12L:12D (encendido a las 08:00), y alimentados a las 13:00. El día del experimento al grupo ayuno se le realizaron las pruebas comportamentales antes de que comieran (entre 23 y 24,5 h de ayuno, en el momento de la FAA) y al grupo ingesta se le realizaron las pruebas entre 2,5 h-4h postprandial, como se describe más adelante (2.4).

#### 2.3.2. Efecto de dos antagonistas de ghrelina sobre el comportamiento ansioso.

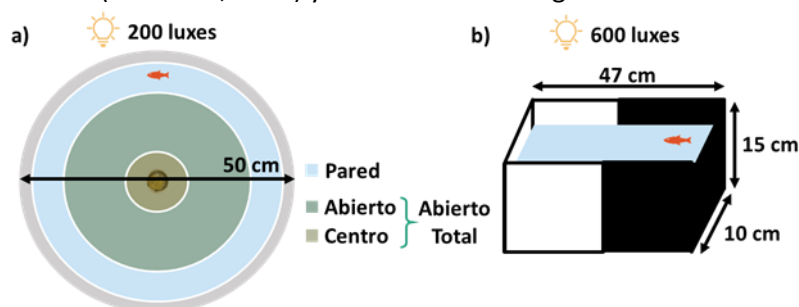
Se emplearon 30 peces ( $5,8 \pm 1,5$  g) aclimatados a un fotoperiodo 12L:12D (encendido a las 07:00), y alimentados a las 10:00. Para analizar este efecto se usaron tres grupos experimentales (n=10) a los que se les inyectó intraperitonealmente: vehículo, antagonista [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 (100 pg/g pc), y antagonista JMV2959 (100 pg/g pc). Los animales estaban en condiciones de ayuno (23-24,5 h ayuno, en la FAA), se les administró el fármaco entre las 9:00 y las 11:15 y una hora tras la inyección se realizaron las pruebas comportamentales como se describe posteriormente.

#### 2.3.3. Efecto de la ghrelina y su antagonista (D-Lys) sobre el comportamiento ansioso.

Los carpines ( $6,12 \pm 2,16$  g) se dividieron en 4 grupos experimentales y entre 2-3 h postprandial se trataron con: grupo VEH+VEH, inyectado dos veces con vehículo; grupo DLYS+VEH, inyectado primero con [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 (100 pg/g pc) y luego con vehículo; grupo VEH+GHRE, al que se administró vehículo y posteriormente ghrelina (10 pg/g pc); y grupo DLYS+GHRE, donde la ghrelina (10 pg/g pc) se inyectó tras el [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 (100 pg/g pc). 1 h después de la segunda inyección se hicieron las pruebas comportamentales descritas adelante.

### 2.4. Pruebas comportamentales

Para valorar ansiedad que emplearon los test comportamentales de campo abierto y blanco negro, que valoran tigmotaxia y escototaxia respectivamente, grabándose los movimientos del animal durante 10 min y analizando posteriormente el vídeo con el *software* Ethovision XT17. Las pruebas se realizaron individualmente en dos tanques tal como se ha descrito previamente (Saiz et al., 2022) y se muestra en la Figura 1.



**Figura 1: Esquema de los tanques empleados en las pruebas comportamentales: a) campo abierto y b) blanco-negro.** Se indican las diferentes zonas dentro de la arena para campo abierto: 25% del área más externa se considera cerca de la pared, 75 % restante se considera campo abierto, y 25% central se considera zona centro. Todas las pruebas se realizaron con una profundidad de 10 cm de agua y a 21 ° C.

### 2.5. Análisis estadístico

Para las comparaciones entre dos grupos se empleó el test *t-Student*. Para comparar varios grupos se empleó un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía seguido de un análisis

post-hoc (LSD Fisher), ya que las variables (o su transformación logarítmica) cumplían criterio de homocedasticidad y distribución normal. Todos los análisis se realizaron con el programa SigmaPlot 12.0.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Efecto de la FAA e ingesta sobre el comportamiento ansioso

Los animales en ayunas, en su momento de FAA, pasaron menos tiempo en campo abierto (Figura 2a), entraron menos veces a esta área (Figura 2b) y tardaron más tiempo en salir de la zona cercana a la pared (Figura 2c) que los animales que había comido. En blanco y negro el grupo ayuno presentó un menor tiempo en blanco al de ingesta (Figura 2d) y una tendencia al aumento en el tiempo de latencia (Figura 2e). Todo ello sugiere un efecto ansiolítico de la comida apoyando que la FAA es un estado ansioso.

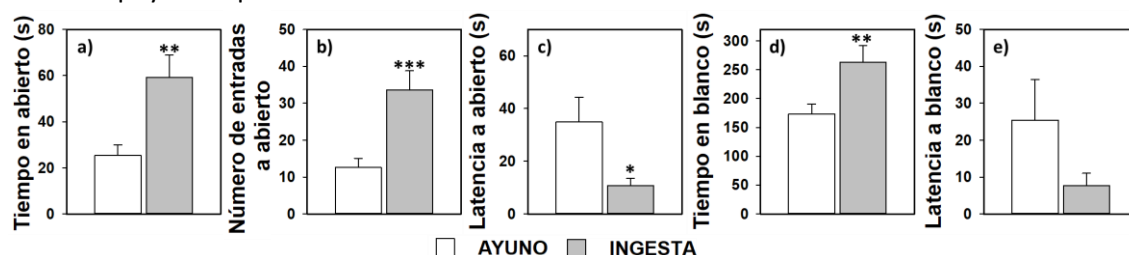


Figura 2: Resultados tras 24 h de ayuno o 3 h post-ingesta en campo abierto (a-c) y blanco-negro (d-e). Se representan los valores medios + error estándar (n=20). *t-Student* \*  $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$  respecto al grupo en ayunas.

#### 3.2. Efecto de diferentes antagonistas de ghrelina sobre indicadores de ansiedad.

En animales en estado de FAA, los dos antagonistas de ghrelina empleados aumentan el tiempo y el número de entradas a campo abierto, y disminuyeron la latencia a separarse de la pared (Figura 3a, b, c). En la prueba blanco negro los individuos tratados con los antagonistas de ghrelina pasaron más tiempo en la región blanca, habiendo diferencias significativas en el grupo Dlys (Figura 3d), también se halló una menor la latencia de entrada a esta zona en estos grupos, siendo estadísticamente diferente el grupo JMV2959 (Figura 3e). Todo ello indica que los antagonistas de ghrelina parecen disminuir el comportamiento de ansiedad en el carpín.

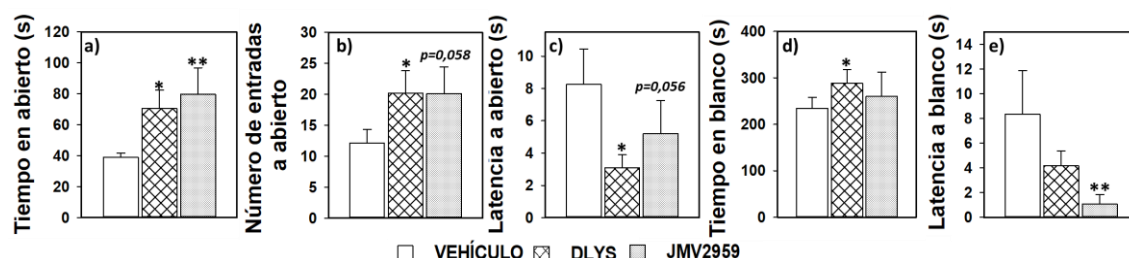


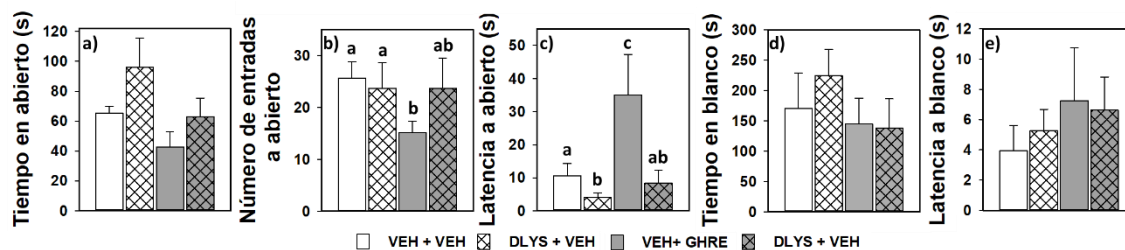
Figura 3: Resultados del tratamiento IP con antagonistas de ghrelina, Dlys y JMV2959, en la prueba campo abierto (1-c) y blanco-negro (d-e). Se representan los valores medios + error estándar (n=10). *t-Student* \*  $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  respecto al grupo vehículo.

#### 3.3. Efecto combinado de la ghrelina y su antagonista (D-Lys) sobre indicadores de ansiedad.

En la prueba de campo abierto disminuyó el número de entradas en abierto (Figura 4b), y aumentó la latencia al campo abierto (Figura 4c) en el grupo tratado con ghrelina. Dicho efecto fue revertido por el antagonista (D-Lys; Figura 4b y c). Se puede observar una tendencia similar en el tiempo en abierto, que disminuyó con la ghrelina y parece ser revertido por el antagonista, aunque en este parámetro las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 4a).

En la prueba de blanco negro no se hallaron diferencias significativas. Aunque sí fue notable, un aumento en el tiempo en blanco del grupo con el antagonista, así como un aumento en el tiempo de latencia en el grupo tratado con vehículo y ghrelina a la vez (Figura 4d, e).





**Figura 4: Resultados del tratamiento con ghrelina y su antagonista (Dlys), en la prueba campo abierto (a-c) y blanco-negro (d-e).** Se representan los valores medios + error estándar (n=10). Se realizó una ANOVA de una vía, diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en el test post-hoc Fisher LSD.

#### 4. DISCUSIÓN

Estudios previos en peces han relacionado una mayor preferencia por regiones oscuras (escototaxia) y preferencia por permanecer cerca de la pared frente a entrar en campo abierto (tigamotaxia) con mayor estado de ansiedad al igual que en mamíferos (Maximino et al., 2010), incluyendo trabajos previos en el carpín (Saiz et al., 2022), validando así los indicadores empleados para medir ansiedad en esta especie. En este trabajo hemos confirmado la hipótesis de la FAA puede medirse como un estado de ansiedad en peces, ya que los carpines en ayuno muestran indicadores de mayor ansiedad en ambos test con respecto al grupo ingesta. Sabemos que los animales presentan FAA en ese momento (diseño 2.3.1), porque se registró la actividad locomotora de los mismos durante varios días (datos no mostrados), y porque numerosos estudios en carpín han mostrado que esta especie presenta FAA en las condiciones del estudio (Isorna et al., 2017; Nisembaum et al., 2014). El hecho de que la ingesta disminuya el estado de ansiedad de los peces lleva a pensar que tal como se ha propuesto para mamíferos (Mendoza, 2019; Merkestein et al., 2012), la comida tiene un gran efecto sobre el sistema de la recompensa en los peces, que puede expresarse con aparición de la FAA cuando la comida se administra con horario fijo cada día y que disminuye la ansiedad cuando los peces han conseguido la recompensa, es decir después de comer.

Diversos estudios han probado los efectos de los antagonistas de ghrelina que hemos empleado, JMV2959 y Dlys, inhibiendo su papel orexigénico, tanto en mamíferos (Gomez & Ryabinin, 2014) como en teleósteos (Miura et al., 2009). Así, nuestros resultados corroboran que, tal como es de esperar, si la ghrelina aumenta en la FAA, los antagonistas de ghrelina administrados durante el momento de FAA, tienen efecto ansiolítico (experimento 2.3.2.). De acuerdo con esto, la ghrelina administrada tras la ingesta (en un momento de menor ansiedad), induce ansiogénesis en los carpines, efecto que es revertido por el antagonista (experimento 2.3.3), indicando la especificidad de este. Todo esto nos sugiere que efectivamente la ghrelina puede mediar el comportamiento ansioso observado en los peces en ayunas en la FAA, quizá junto con otros péptidos orexigénicos, como la orexina, que también tiene efectos ansiogénicos en el carpín (Nakamachi et al., 2014).

#### 5. CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio confirman que la FAA es un estado de ansiedad y que la ghrelina actúa como un ansiogénico en carpines, lo que podría estar relacionado con la búsqueda de comida asociada a la FAA.

#### 6. BIBLIOGRAFÍA

Ayadi, F. Y., Rosentrater, K. A., & Muthukumarappan, K. (2012). Alternative Protein Sources for Aquaculture Feeds. *Journal of Aquaculture Feed Science and Nutrition*, 4(1), 1–26.

- Delgado, M. J., Cerdá-Reverter, J. M., & Soengas, J. L. (2017). Hypothalamic integration of metabolic, endocrine, and circadian signals in fish: Involvement in the control of food intake. In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 11, Issue JUN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00354>
- Gomez, J. L., & Ryabinin, A. E. (2014). The effects of ghrelin antagonists [D-Lys3]-GHRP-6 or JMV2959 on ethanol, water, and food intake in C57BL/6J mice. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 38(9), 2436–2444. <https://doi.org/10.1111/acer.12499>
- Isorna, E., de Pedro, N., Valenciano, A. I., Alonso-Gómez, Á. L., & Delgado, M. J. (2017). Interplay between the endocrine and circadian systems in fishes. *Journal of Endocrinology*, 232(3), R141–R159. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0330>
- Kang, K. S., Yahashi, S., & Matsuda, K. (2011). The effects of ghrelin on energy balance and psychomotor activity in a goldfish model: An overview. In *International Journal of Peptides* (Vol. 2011). <https://doi.org/10.1155/2011/171034>
- Maximino, C., Marques De Brito, T., De Mattos Dias, C. A. G., Gouveia, A., & Morato, S. (2010). Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. *Nature Protocols*, 5(2), 221–228. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.225>
- Mendoza, J. (2019). Eating Rewards, the Gears of the Clock. In *Trends in Endocrinology and Metabolism* (Vol. 30, Issue 5, pp. 299–311). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2019.03.001>
- Merkestein, M., Brans, M. A. D., Luijendijk, M. C. M., De Jong, J. W., Egecioglu, E., Dickson, S. L., & Adan, R. A. H. (2012). Ghrelin mediates anticipation to a palatable meal in rats. *Obesity*, 20(5), 963–971. <https://doi.org/10.1038/oby.2011.389>
- Miura, T., Maruyama, K., Kaiya, H., Miyazato, M., Kangawa, K., Uchiyama, M., Shioda, S., & Matsuda, K. (2009). Purification and properties of ghrelin from the intestine of the goldfish, *Carassius auratus*. *Peptides*, 30(4), 758–765. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.12.016>
- Nakamachi, T., Shibata, H., Sakashita, A., Iinuma, N., Wada, K., Konno, N., & Matsuda, K. (2014). Orexin A enhances locomotor activity and induces anxiogenic-like action in the goldfish, *Carassius auratus*. *Hormones and Behavior*, 66(2), 317–323. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.06.004>
- Nisembaum, L. G., de Pedro, N., Delgado, M. J., & Isorna, E. (2014). Crosstalk between the “gut-brain” hormone ghrelin and the circadian system in the goldfish. Effects on clock gene expression and food anticipatory activity. *General and Comparative Endocrinology*, 205, 287–295. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.03.016>
- Saiz, N., Herrera-Castillo, L., Marugal, M., de Pedro, N., & Isorna, E. (2022). La cronodisrupción induce un estado de ansiedad en el carpín (*Carassius auratus*): Un estudio mediante test comportamentales no invasivos. XVIII Congreso Nacional de Acuicultura (Cádiz, España).

**77042: LA DISRUPCIÓN TEMPORAL DE CB1 ALTERA EL PROGRAMA TRANSCRIPTÓMICO DE LA CORTICOGÉNESIS DEL CÓRTEX PREFRONTAL | TEMPORAL DISRUPTION OF CB1 RECEPTOR ALTERS THE TRANSCRIPTOMIC PROGRAM OF PREFRONTAL CORTEX CORTICOGENESIS****Área de conocimiento:** BIOLOGÍA**Autor(es):** Alba Mérida Coronel**Tutor(es):** Ismael Galve Roperh, Samuel Simón Sánchez**Universidad:** Alba Mérida Coronel**Facultad:** Facultad de Ciencias Químicas**Titulación:** Grado en Bioquímica**Formato:** Póster - Investigación clínica**Palabras Clave:** Corticogénesis, diferenciación neuronal, sistema endocannabinoide, receptor CB1, electroporación in útero-corticogenesis, neuronal differentiation, endocannabinoid system, CB1 receptor, in utero electroporation.

Durante el desarrollo embrionario, tiene lugar la diferenciación y migración de poblaciones de precursores de neuronas excitatorias que darán lugar a la corteza cerebral. Este proceso de migración ocurrirá de manera ordenada spatiotemporalmente. Defectos en estos eventos originan numerosos trastornos del neurodesarrollo, tales como la epilepsia o el autismo. El sistema endocannabinoide, vía receptor CB1, coordina numerosos pasos cruciales en este proceso de neurogénesis, por lo que perturbaciones en este sistema conllevarán consecuencias en el proceso de migración, diferenciación y formación del córtex cerebral. El silenciamiento de CB1 a través de la técnica electroporación in utero (IUE) en etapas tempranas del desarrollo embrionario provoca numerosos cambios en la neurogénesis, así como en otros factores implicados en este proceso debido a que, la disrupción de este, conlleva cambios en diversos procesos de señalización fundamentales para el desarrollo (Díaz-Alonso et al., 2017). Entre estos procesos destacan la señalización ejercida por los factores *Satb2/Bcl11b*, fuertemente regulada por la señalización de CB1 y fundamental para el desarrollo de las diferentes capas corticales, además de otros mecanismos implicados en el correcto crecimiento axonal y sinaptogénesis, y múltiples proteínas implicadas en la transmisión de los impulsos nerviosos. Por tanto, el estudio de los efectos producidos por anomalías en la señalización provocada por el sistema endocannabinoide llevará al conocimiento de múltiples mecanismos implicados en el desarrollo cerebral durante la corticogénesis, que serán fundamentales para conocer las implicaciones de este sistema en enfermedades neuropsiquiátricas y del neurodesarrollo.

During embryonic development, the differentiation and migration of excitatory neuron precursor populations take place, and its populations will give rise to the cerebral cortex. This migration process will occur in a spatiotemporally ordered manner. Defects in these events cause numerous neurodevelopmental disorders, such as epilepsy or autism. The endocannabinoid system, via CB1 receptor, coordinates numerous crucial steps in neurogenesis, so disturbances in this system have consequences in migration, differentiation, and formation of the cerebral cortex. The silencing of CB1 through the in utero electroporation (IUE) technique in early stages of embryonic development will cause numerous changes in neurogenesis, as well as in other factors involved in this process, since its disruption will also lead to changes in various intracellular signaling processes essential for development (Díaz-Alonso et al., 2017). Among these processes, the signaling exerted by the factors *Satb2/Bcl11b* stands out, strongly regulated by CB1 signaling and fundamental for the development of the different cortical layers, as well as other mechanisms involved in axonal outgrowth and synaptogenesis, and multiple proteins involved in the transmission of nerve impulses. Therefore, the study of the effects produced by abnormalities in the signaling caused by the endocannabinoid system will lead to the knowledge of multiple mechanisms involved in brain development during corticogenesis, which will be essential to understand the implications of this system in neuropsychiatric and neurodevelopmental diseases.

**LA DISRUPCIÓN TEMPORAL DE CB<sub>1</sub> ALTERA EL PROGRAMA  
TRANSCRIPTÓMICO DE LA CORTICOGÉNESIS DEL CÓRTEX PREFRONTAL**

**TEMPORAL DISRUPTION OF CB<sub>1</sub> RECEPTOR ALTERS THE  
TRANSCRIPTOMIC PROGRAM OF PREFRONTAL CORTEX CORTICOGENESIS**

Autor: 1523642, Alba Mérida Coronel, [albmerid@ucm.es](mailto:albmerid@ucm.es)

Tutor 1: Ismael Galve Roperh, [igr@quim.ucm.es](mailto:igr@quim.ucm.es)

Tutor 2: Samuel Simón Sánchez, [samsimon@ucm.es](mailto:samsimon@ucm.es)

Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid

Durante el desarrollo embrionario, tiene lugar la diferenciación y migración de poblaciones de precursores de neuronas excitatorias que darán lugar a la corteza cerebral. Este proceso de migración ocurrirá de manera ordenada espaciotemporalmente. Defectos en estos eventos originan numerosos trastornos del neurodesarrollo, tales como la epilepsia o el autismo. El sistema endocannabinoide, vía receptor CB<sub>1</sub>, coordina numerosos pasos cruciales en este proceso de neurogénesis, por lo que perturbaciones en este sistema conllevarán consecuencias en el proceso de migración, diferenciación y formación del córtex cerebral. El silenciamiento de CB<sub>1</sub> a través de la técnica electroporación *in utero* (IUE) en etapas tempranas del desarrollo embrionario provoca numerosos cambios en la neurogénesis, así como en otros factores implicados en este proceso debido a que, la disrupción de este, conlleva cambios en diversos procesos de señalización fundamentales para el desarrollo (*Díaz-Alonso et al.*, 2017). Entre estos procesos destacan la señalización ejercida por los factores *Satb2/Bcl11b*, fuertemente regulada por la señalización de CB<sub>1</sub> y fundamental para el desarrollo de las diferentes capas corticales, además de otros mecanismos implicados en el correcto crecimiento axonal y sinaptogénesis, y múltiples proteínas implicadas en la transmisión de los impulsos nerviosos. Por tanto, el estudio de los efectos producidos por anomalías en la señalización provocada por el sistema endocannabinoide llevará al conocimiento de múltiples mecanismos implicados en el desarrollo cerebral durante la corticogénesis, que serán fundamentales para conocer las implicaciones de este sistema en enfermedades neuropsiquiátricas y del neurodesarrollo.

Palabras clave: corticogénesis, diferenciación neuronal, sistema endocannabinoide, receptor CB<sub>1</sub>, electroporación *in útero*.

During embryonic development, the differentiation and migration of excitatory neuron precursor populations take place, and its populations will give rise to the cerebral cortex. This migration process will occur in a spatiotemporally ordered manner. Defects in these events cause numerous neurodevelopmental disorders, such as epilepsy or autism. The endocannabinoid system, via CB<sub>1</sub> receptor, coordinates numerous crucial steps in neurogenesis, so disturbances in this system have consequences in migration, differentiation, and formation of the cerebral cortex. The silencing of CB<sub>1</sub> through the *in utero* electroporation (IUE) technique in early stages of embryonic development will cause numerous changes in neurogenesis, as well as in other factors involved in this process, since its disruption will also lead to changes in various intracellular signaling processes essential for development (Díaz-Alonso *et al.*, 2017). Among these processes, the signaling exerted by the factors Satb2/Bcl11b stands out, strongly regulated by CB<sub>1</sub> signaling and fundamental for the development of the different cortical layers, as well as other mechanisms involved in axonal outgrowth and synaptogenesis, and multiple proteins involved in the transmission of nerve impulses. Therefore, the study of the effects produced by abnormalities in the signaling caused by the endocannabinoid system will lead to the knowledge of multiple mechanisms involved in brain development during corticogenesis, which will be essential to understand the implications of this system in neuropsychiatric and neurodevelopmental diseases.

Key words: corticogenesis, neuronal differentiation, endocannabinoid system, CB<sub>1</sub> receptor, in utero electroporation.

## INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la corteza cerebral conlleva la formación y diferenciación secuencial de poblaciones de neuronas excitatorias, las cuales constituirán la estructura cortical, compuesta por seis capas bien diferenciadas [1]. Estas neuronas de proyección cortical son generadas en las zonas ventricular y subventricular (VZ y SVZ, respectivamente), y deberán sufrir una migración orquestada tanto espacial como temporalmente hacia el plato cortical (CP), para ocupar su posición final en las diferentes capas del córtex [2]. Dentro del plato cortical, las neuronas de las capas profundas (6 y 5) se formarán de manera más temprana, seguidas de las neuronas que pasarán a formar parte de las capas más superficiales (4, 3 y 2) [3]. Por tanto, como es de esperar, cualquier anomalía en este proceso puede conllevar numerosas alteraciones que pueden ser la etiología de un gran número de trastornos, tales como la epilepsia, la esquizofrenia o el autismo [4].

El sistema endocannabinoide, vía receptor CB<sub>1</sub>, juega un papel fundamental en la formación del sistema nervioso central. Durante el desarrollo, este receptor controla la proliferación y fenotipo de las células precursoras de la zona cortical, la diferenciación de las neuronas piramidales y el proceso de guía axonal y sinaptogénesis [2]. Para llevar a cabo estos numerosos procesos, el receptor CB<sub>1</sub> orquesta una compleja red de regulación transcripcional compuesta por múltiples factores, entre los que destacan Satb2 (Special At-Rich Sequence Binding Protein 2) y Bcl11b (Ctip2, COUP-TF-Interacting Protein 2) [4]. Bcl11b, de la mano de otros factores de transcripción como Fezf2, se encuentra principalmente expresado en capas profundas (5 y 6), y su correcto funcionamiento será fundamental para el desarrollo de las proyecciones axonales subcorticales [3]. Por su parte, el factor Satb2, cuya expresión es mucho más abundante en capas superficiales (2, 3 y 4), promueve la formación de las proyecciones del cuerpo caloso, mediante la represión del factor Bcl11b, ya que previene su expresión [5].

Además, la ausencia del receptor CB<sub>1</sub> no solo conllevará cambios en estos factores, sino en muchos otros genes fundamentales en el desarrollo cerebral, tales como Snx3 (Sorting-Nexin 3), cuya sobreexpresión favorece el crecimiento axonal [6], o Gria1 (Glutamate Ionotropic Receptor AMPA Type Subunit 1), cuyo knockdown genera circuitos hipocámpales defectivos y ciertos síntomas en relación a la esquizofrenia [7].

El objetivo de este trabajo será comprobar el efecto del silenciamiento de CB<sub>1</sub> en un momento concreto del desarrollo del ratón *Mus musculus* en el programa transcriptómico de las poblaciones de progenitores neuronales y de las neuronas que originaran estos a su vez. La alteración de su programa origina consecuencias en procesos de migración neuronal, procesos electrofisiológicos y transcriptómicos, fundamentales para la correcta formación de la corteza prefrontal. En el presente trabajo se validan algunas de las dianas génicas que en estudios previos del grupo (no publicados) se habían visto como posiblemente alteradas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Datos previos

Para llevar a cabo este proyecto, se utilizaron lecturas procedentes de microarrays realizados con el kit Clariom D pico (ThermoFisher Scientific).

### Animales

Todos los animales usados en este experimento son ratones pertenecientes a la cepa C57BL/6. A lo largo de este, se trabaja con tejido correspondiente a dos estadios, embrionario día 17 (E17) y postnatal día 30 (P30).

Para llevar a cabo el silenciamiento del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub>, se emplea un RNA pequeño de interferencia (siRNA) cuya diana es este receptor. Como control se utiliza un siRNA

control, el cual produce cambios metabólicos similares, pero no el silenciamiento de ninguna diana. En ambos constructos se añade un plásmido el cual contiene la secuencia de la proteína GFP para la observación de las neuronas electroporadas mediante microscopía de fluorescencia, y el componente Fast Green, para su coloración y correcta visualización al ser inyectado de manera intraventricular. Además, contamos con tejido de ratones wild type (WT) como segundo control.

### **Electroporación *in utero***

Este procedimiento se lleva a cabo en el día catorce de gestación (E14.5). Se realiza la extracción de los cuernos del útero del animal gestante, y se inyectan los siRNAs, bien el control (siCo) o el correspondiente al silenciamiento de CB<sub>1</sub> (siCB<sub>1</sub>) mediante capilares de vidrio borosilicatado. La inyección se realiza en los ventrículos de los embriones, de manera uni o bilateral. Posteriormente, se aplican corrientes eléctricas en el cerebro del embrión en dirección al córtex prefrontal mediante un electroporador ECM 830 Square Wave Electroporation System (BTX Harvard Apparatus).

### **Microscopía óptica de fluorescencia**

Para la comprobación de la correcta electroporación de los animales y los efectos de esta, se observa la fluorescencia emitida por la proteína GFP en secciones transversales mediante un microscopio óptico de fluorescencia (ZEISS Apotome 3).

Los cerebros de los ratones adultos (P30) se obtuvieron tras su perfusión con PFA y correspondiente extracción del cráneo del animal. Estos fueron cortados en secciones transversales de 30 µm de grosor mediante un microtomo. Las secciones fueron colocadas en un portaobjetos y fijadas con mowiol para su posterior observación.

### **Extracción de RNA y retrotranscripción**

El tejido utilizado para este procedimiento se corresponde a la zona del córtex prefrontal del animal. Para ambos estadíos, se ha de extraer el cerebro del cráneo del animal y la posterior disección se realiza bajo una lupa de fluorescencia Leica MZ10 F, seleccionando de esta manera únicamente el tejido fluorescente.

En el caso de los ratones wild type, se seleccionan rigurosamente zonas similares que en el caso de los animales electroporados, ya que en este caso no se cuenta con fluorescencia como guía.

Una vez realizada la disección del tejido, se extrae el RNA mediante el protocolo del nucleozol. El precipitado obtenido, tras su secado por evaporación del etanol, se resuspende en agua miliQ y es cuantificado mediante un equipo NanoDrop ND1000 (ThermoFisher Scientific).

Para llevar a cabo la PCR cuantitativa, 1 µg de RNA es retrotranscrito a DNA complementario (cDNA) mediante el cDNA kit de ROCHE.

### **PCR cuantitativa (qPCR)**

Para la validación de los genes en los cuales se detectaron cambios mediante el microarray, se lleva a cabo una PCR cuantitativa, amplificando los cDNAs anteriormente obtenidos mediante el uso de SYBR Green Master (Roche).

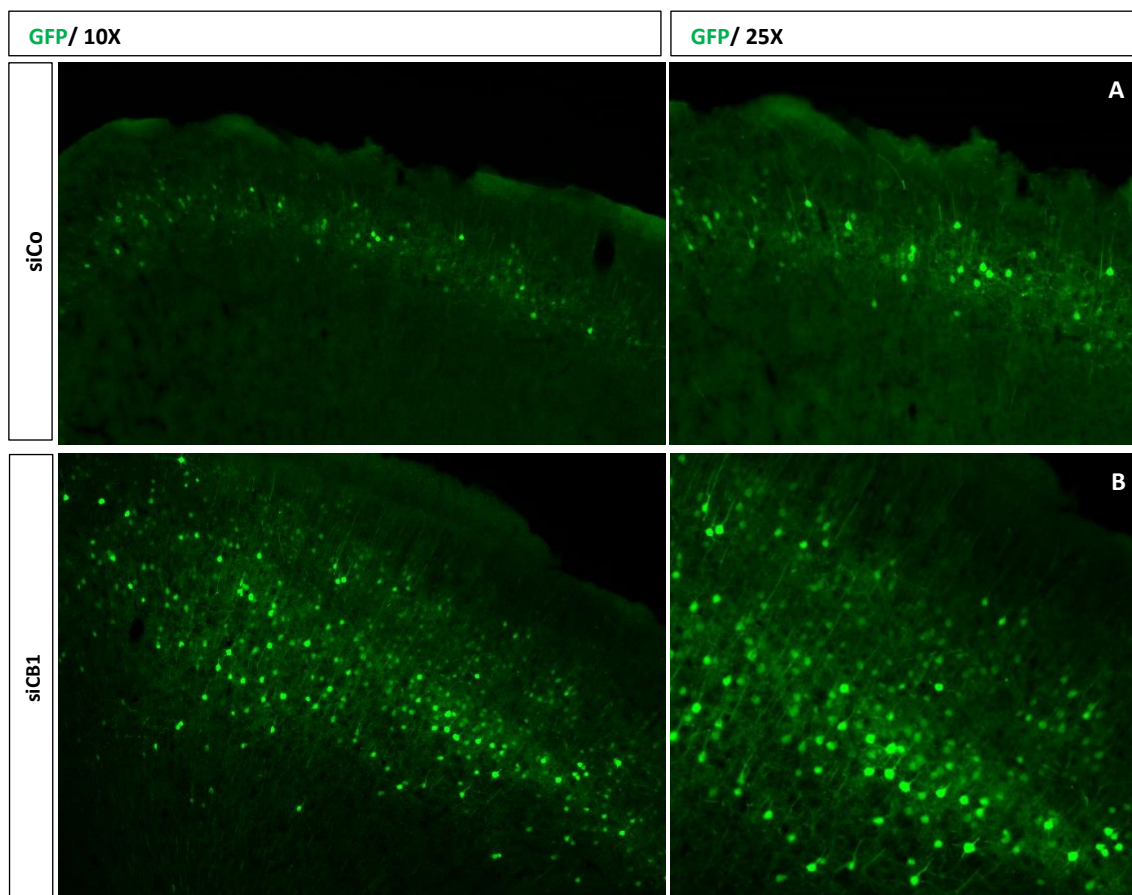
El análisis gráfico y estadístico de los datos obtenidos se realiza utilizando el programa GraphPad Prism versión 8.0.1. El análisis estadístico se lleva a cabo con el método One-Way Anova, comparando por pares los datos de los ratones siCB<sub>1</sub> respecto a los datos de ratones WT o siCo, considerando significativos valores de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### Efectos del silenciamiento de CB<sub>1</sub> en la migración neuronal

La validez de las muestras electroporadas es comprobada mediante su emisión de fluorescencia.

Los efectos provocados por el silenciamiento del receptor cannabinoide se observan en la Figura 1. Como era de esperar, la falta del receptor produce un arresto de la migración, claramente observado en la Figura 1B; frente a la correcta migración y colocación de las neuronas corticales en los animales tratados con el siRNA control (Figura 1A).



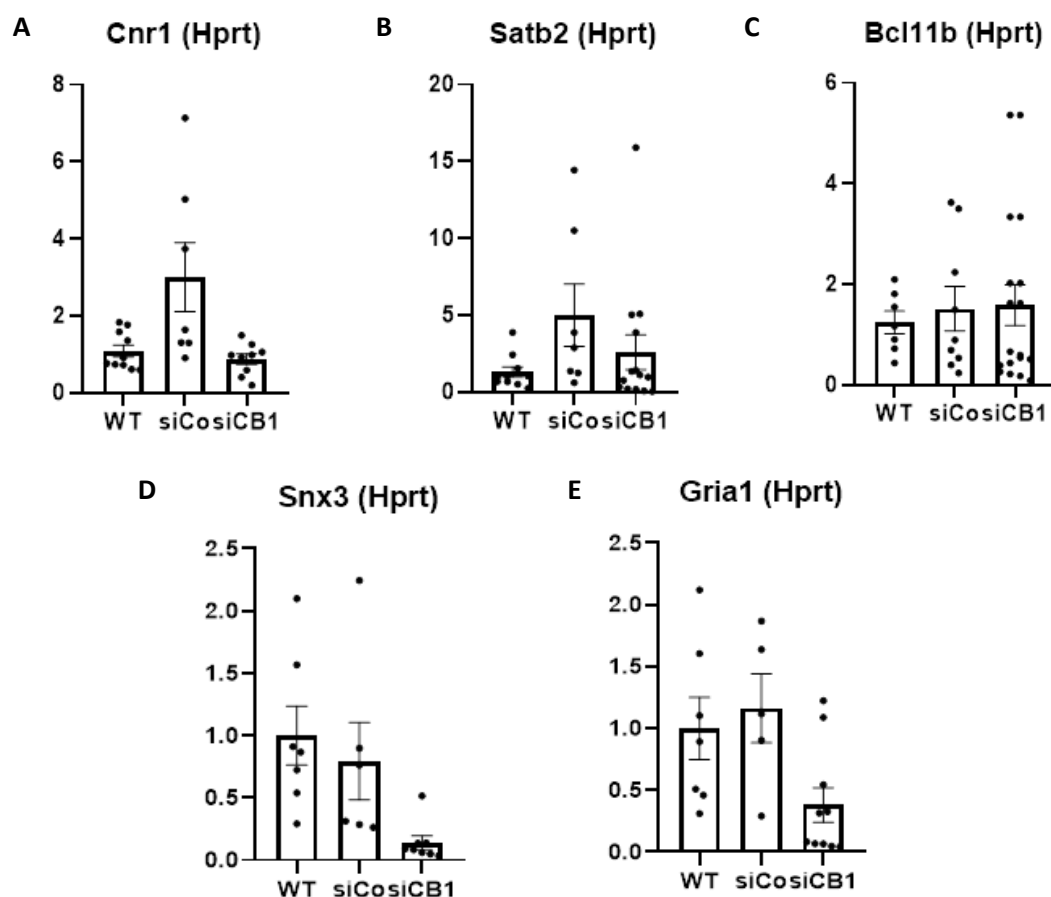
**Figura 1. Cambios en la migración neuronal influidos por el silenciamiento de CB<sub>1</sub>.** A. Tejido de animal P30 electroporado con siRNA control. B. Tejido de animal P30 electroporado con siCB<sub>1</sub>. En ambos casos, a la izquierda la imagen cuenta con un aumento 10X, mientras que la imagen de la derecha se trata de la misma con un mayor aumento (25X).

### Efectos del silenciamiento de CB<sub>1</sub> a nivel de mRNA

Para observar los efectos producidos por el silenciamiento del receptor CB<sub>1</sub> en la señalización de la zona prefrontal del córtex, se analizan los cambios en la expresión de varios genes mediante qPCR. Entre estos genes se encuentran Cnr1, Satb2, Bcl11b, Snx3 y Gria1.

Los resultados mostrados en la Figura 2 se corresponden a la expresión de mRNA de los genes señalados a tiempo E17. Todos los genes fueron normalizados frente a un gen considerado control, en este caso Hprt.





**Figura 2. Efecto del silenciamiento transitorio de CB<sub>1</sub> en la expresión de mRNA a tiempo E17.** Para los 5 genes analizados se representan datos de animales WT (columna izquierda), siCo (columna central) y siCB<sub>1</sub> (columna derecha).

Como se observa en la Figura 2A, el silenciamiento de CB<sub>1</sub> parece ser efectivo ya que, aun no siendo significativa su reducción, podemos observar una clara tendencia a la baja respecto al control. Además, obtenemos también cambios en la expresión de Snx3 y Gria1 (Figuras 2D y 2E respectivamente), reducciones significativas respecto al control. Por su parte, Bcl11b (Figura 2C), al contrario que el resto de genes, prácticamente no se ve afectado; mientras que el factor de transcripción Satb2, aun no siendo significativa su reducción, sí que muestra una cierta tendencia a verse reducido (Figura 2B).

Los resultados obtenidos para el estadio P30 no se muestran en este trabajo, ya que, a este tiempo, la recuperación en la expresión del receptor CB<sub>1</sub> es casi total y, por tanto, todos los genes que se veían afectados por el cambio de la señalización en la corteza prefrontal también recuperan sus valores basales, o cercanos a ellos, no considerándose ya significativo ninguno de los cambios observados.

## DISCUSIÓN

El receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> ha demostrado ser fundamental para la correcta migración y diferenciación de las neuronas progenitoras corticales, ya que se ha observado que su delección provoca cambios visibles por microscopía de fluorescencia en el posicionamiento de estas neuronas (Figura 1B), lo que concuerda coherentemente con la bibliografía [2]. Además, esta reducción en la expresión de CB<sub>1</sub> ha sido comprobada mediante los datos de qPCR (Figura 2A).

En cuanto a los cambios que esto provoca en múltiples factores implicados en diferenciación neuronal, se ha observado una tendencia de reducción en el factor *Satb2* (Figura 2B), que, como se señaló anteriormente, es un marcador de capas corticales superiores [5], con lo que su menor expresión concuerda con la menor migración de las neuronas progenitoras corticales. Por su parte, *Bcl11b* no muestra cambios aparentes (Figura 2C), por lo que es posible que para observar cambios en la expresión de este se debería aumentar la *n* de los experimentos realizados, ya que esta debería verse afectada por su estrecha relación con el factor *Satb2* [4].

Por su parte, para un tamaño muestral experimental similar, *Snx3* y *Gria1* sí que muestran valores de reducción significativos (Figuras 2D y 2E), lo que implicaría una deficiencia en el crecimiento axonal influida por *Snx3* [6] y anomalías en la señalización glutamatérgica por parte de *Gria1*, lo que podría derivar en numerosos problemas neuropsiquiátricos, tales como la esquizofrenia [7].

## CONCLUSIONES

La señalización endocannabinoide vía receptor CB<sub>1</sub> es un proceso fundamental durante la embriogénesis para el correcto desarrollo del sistema nervioso central, por lo que su disrupción conllevará numerosos cambios en la señalización intracelular que podrán derivar en múltiples problemas neuropsiquiátricos y trastornos del neurodesarrollo. En el presente trabajo se validan algunas dianas genéticas que parecen estar implicados de manera directa o indirecta, en la alteración de este modelo animal, vía desregulación a la baja y temporal del receptor CB<sub>1</sub>.

## BIBLIOGRAFÍA

[1] Fishell G, Hanashima C (2008). *Pyramidal neurons grow up and change their mind*. *Neuron* 57:333–338.

[2] Díaz-Alonso, J., de Salas-Quiroga, A., Paraíso-Luna, J., García-Rincón, D., Garcez, P. P., Parsons, M., Andradas, C., Sánchez, C., Guillemot, F., Guzmán, M., & Galve-Roperh, I. (2017). *Loss of Cannabinoid CB1 Receptors Induces Cortical Migration Malformations and Increases Seizure Susceptibility*. *Cerebral cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 27(11), 5303–5317.

[3] Leone, D. P., Srinivasan, K., Chen, B., Alcamo, E., & McConnell, S. K. (2008). *The determination of projection neuron identity in the developing cerebral cortex*. *Current opinion in neurobiology*, 18(1), 28–35.

[4] Díaz-Alonso, J., Aguado, T., Wu, C. S., Palazuelos, J., Hofmann, C., Garcez, P., Guillemot, F., Lu, H. C., Lutz, B., Guzmán, M., & Galve-Roperh, I. (2012). *The CB(1) cannabinoid receptor drives corticospinal motor neuron differentiation through the *Ctip2/Satb2* transcriptional regulation axis*. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(47), 16651–16665.

[5] Alcamo EA, Chirivella L, Dautzenberg M, Dobрева G, Farinas I, Grosschedl R, McConnell SK (2008). *Satb2 regulates callosal projection neuron identity in the developing cerebral cortex*. *Neuron* 57:364–377.

[6] Mizutani, R., Nakamura, K., Yokoyama, S., Sanbe, A., Kusakawa, S., Miyamoto, Y., Torii, T., Asahara, H., Okado, H., Yamauchi, J., & Tanoue, A. (2011). *Developmental expression of sorting nexin 3 in the mouse central nervous system*. *Gene expression patterns: GEP*, 11(1-2), 33–40.

[7] Barkus, C., Sanderson, D. J., Rawlins, J. N., Walton, M. E., Harrison, P. J., & Bannerman, D. M. (2014). *What causes aberrant salience in schizophrenia? A role for impaired short-term habituation and the GRIA1 (GluA1) AMPA receptor subunit*. *Molecular psychiatry*, 19(10), 1060–1070.

**77121: Terapia proteica innovadora para la fibrosis quística: el éxito de Kaftrio o Trikafta (ES) // Innovative protein therapy for cystic fibrosis: the success of Kaftrio or Trikafta (EN)****Área de conocimiento:** BIOLOGÍA**Autor(es):** Alexia Pérez Pestourie, Alessandra Ruiz Sánchez**Tutor(es):** Irene Gutiérrez Cañas**Universidad:** Universidad Complutense de Madrid**Facultad:** Facultad de Ciencias Biológicas**Titulación:** Grado en Biología**Formato:** Póster - Revisiones bibliográficas**Palabras Clave:** Palabras clave (ES): fibrosis quística, FQ triple terapia, modulador CFTR, Kaftrio, Trikafta. Keywords (EN): cystic fibrosis, CF triple therapy, CFTR modulator, Kaftrio, Trikafta.

Resumen (ES):

La fibrosis quística es una enfermedad genética rara que afecta a varios órganos, siendo las complicaciones pulmonares su principal causa de mortalidad. Se produce debido a mutaciones en el gen CFTR, que dan lugar a la acumulación de moco en las vías respiratorias, lo que favorece las infecciones bacterianas y la inflamación, todo lo cual conduce a un daño pulmonar y eventualmente a insuficiencia respiratoria y muerte prematura. Actualmente, los tratamientos convencionales se centran en paliar la sintomatología de la enfermedad. Sin embargo, en la última década se han desarrollado moduladores proteicos que corrigen la función de la proteína mutante. Este trabajo analiza la eficacia de la triple terapia comercializada como Kaftrio o Trikafta (elexacaftor, tezacaftor e ivacaftor) como tratamiento para la enfermedad a partir de la información obtenida de varios estudios clínicos. Su uso en pacientes con al menos una mutación F508del (portada por al menos el 90% de los pacientes de fibrosis quística) demuestra que se aumenta la actividad de la proteína CFTR, lo que disminuye la tasa de mortalidad y morbilidad, mostrando un aumento significativo en la función pulmonar y una reducción en el número de exacerbaciones respiratorias. Además, a nivel sistémico, también se reducen los niveles de cloruro en el sudor y se produce un aumento del índice de masa corporal. Dado su impacto tan positivo y la ausencia de efectos secundarios graves, esta terapia revolucionaria puede resultar un cambio clave en la mejora de esta enfermedad tan mortal.

Abstract (EN): Cystic fibrosis is a rare genetic disease that affects various organs, but pulmonary complications are the main cause of mortality. It is caused by mutations in the CFTR gene, resulting in the accumulation of mucus in the airways that promotes bacterial infections and inflammation, leading to lung damage and eventually respiratory failure and premature death. Current treatments mainly aim to alleviate the symptoms of the disease. However, in the last decade protein modulators that correct the function of the mutant protein have been developed. This work analyzes the efficacy of triple therapy marketed as Kaftrio or Trikafta (elexacaftor, tezacaftor, and ivacaftor) as a treatment for the disease based on information obtained from several clinical studies. Its use in patients with at least one F508del mutation (which is carried by at least 90% of patients) shows an increase in the CFTR protein activity and a decrease in mortality and morbidity rates, showing a significant improvement in lung function and a reduction in the number of respiratory exacerbations. Additionally, at the systemic level, chloride levels in sweat are also reduced, and there is an increase in the body mass index. Given its significant positive impact and the absence of serious side effects, this revolutionary therapy could be a key change in the improvement of this deadly disease.

## - INTRODUCCIÓN

La fibrosis quística es una enfermedad autosómica recesiva causada por una mutación en el gen CFTR, acrónimo en inglés de “regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística” (Shteinberg et al., 2021). Es la enfermedad rara más frecuente en personas blancas de ascendencia noreuropea (National Organization for Rare Disorders, 2020) y actualmente existen aproximadamente 53.000 casos en toda Europa (European Cystic Fibrosis Society, 2020). Además, se trata de una enfermedad con una incidencia de mortalidad alta, en la que apenas hace una década la esperanza de vida era de 32 años. Sin embargo, gracias al diagnóstico precoz y los nuevos tratamientos, la esperanza de vida actual para los pacientes nacidos entre 2017 y 2021 se estima que alcanzará de media los 53 años (Cystic Fibrosis Foundation, 2021).

Es una enfermedad multisistémica, ya que el gen CFTR codifica para un canal iónico de anión cloruro que regula el equilibrio de sal y agua dentro de la célula en diversos órganos, incluyendo los pulmones, el páncreas, el hígado y la vesícula biliar (Hanssens et al., 2021). Sin embargo, la principal causa de muerte en los pacientes es debido a complicaciones pulmonares. Cuando la proteína CFTR funciona correctamente, el canal favorece la hidratación de las secreciones mucosas que recubren las células de las vías respiratorias (Moran, 2017). Por el contrario, cuando hay una alteración en su producción, transporte o función, se produce la acumulación de moco espeso y deshidratado que favorece las infecciones bacterianas y la inflamación, lo que conlleva un daño en el tejido pulmonar y eventualmente la insuficiencia respiratoria y muerte prematura (Moran, 2017; Heijerman et al., 2019). Es por ello que la evolución de los pacientes se estudia mediante la función pulmonar, medida a través del ppFEV1 (volumen espiratorio forzado en el primer segundo) y el número de exacerbaciones, que son parámetros de fácil medición y cuantificación.

Se han encontrado unas 2000 mutaciones patogénicas del gen que se clasifican en seis tipos según su efecto en el producto proteico (Pittman & Ferkol, 2015; Marson et al., 2016), como se muestra en la *Tabla 1*. La mutación más común es la F508del ( $\Delta F508$ ), de clase II, de la que aproximadamente el 90% de los pacientes tienen al menos una copia para este alelo (Dębczyński et al., 2023).

Clase	Efecto sobre la proteína
I	Reducción severa o ausencia de expresión de CFTR, proteína truncada o degradación proteica
II	Tráfico inapropiado de la proteína CFTR a la superficie celular
III	Alteración de la regulación del canal iónico
IV	Flujo reducido de iones a través del canal de CFTR
V	Cantidad disminuida de proteína funcional de CFTR
VI	Retención disminuida de proteína CFTR en la superficie celular

**Tabla 1.** Clasificación de las clases de mutaciones patogénicas que se dan en el gen CFTR y el efecto que producen sobre la proteína.

El tratamiento principal de la fibrosis quística consiste en abordar los efectos de la disfunción del CFTR mediante agentes mucolíticos aerosolizados e inhalación de solución salina hipertónica para mejorar el aclaramiento mucociliar, antibióticos continuados para tratar las infecciones y antiinflamatorios (Pittman & Ferkol, 2015). Asimismo, se requiere de enzimas pancreáticas, suplementos nutricionales y una dieta rica en calorías para paliar los problemas de absorción que tienen los pacientes (Freswick et al., 2022).

Sin embargo, en la última década, la investigación se ha centrado en la búsqueda de moléculas que alteran la función mutante de la proteína CFTR (Pittman & Ferkol, 2015). La empresa Vertex Pharmaceuticals está a cargo del desarrollo de medicamentos conocidos como moduladores proteicos y desde 2012 han desarrollado cuatro moduladores (Vertex, s.f.). El más reciente es conocido como Trikafta en Estados Unidos (aprobado en 2019 por la FDA) o Kaftrio en Europa (aprobada su comercialización en la Unión Europea en 2020), y está suponiendo una mejora importante en la salud de los pacientes (U.S. Food And Drug Administration, 2019; European Medicines Agency, 2020). Kaftrio consiste en una combinación de tres compuestos: elexacaftor, tezacaftor e ivacaftor. Elexacaftor y tezacaftor son clasificados como “correctores”, y su mecanismo de acción consiste en la unión a proteínas CFTR defectuosas, mejorar su plegamiento, permitiendo así que un mayor número de proteínas alcancen la membrana plasmática. Una vez en la membrana entraría en acción ivacaftor, clasificado como “potenciador”, que ayuda a permitir la apertura adecuada del canal iónico (Trikafta, s.f.). Cabe destacar que, Kaftrio está indicado para pacientes que tengan al menos una mutación de tipo F508del, lo que actualmente cubre casi el 90% de los pacientes (Taylor-Cousar et al., 2019).

El objetivo del presente trabajo es analizar la eficacia y seguridad de Kaftrio, tratamiento comercializado en Europa desde hace apenas tres años, en los pacientes con fibrosis quística.

## **- MATERIAL Y MÉTODOS**

Se ha llevado a cabo una búsqueda bibliográfica exhaustiva en las bases de datos PubMed y Google Scholar, y en páginas web oficiales como European Cystic Fibrosis Society (ECFS), National Organization for Rare Disorders y Cystic Fibrosis Foundation, Vertex Pharmaceuticals y la web oficial de Trikafta. Para la búsqueda se usaron palabras clave como las que se citan a continuación: “CFTR”, “tezacaftor”, “ivacaftor”, “elexacaftor”, “Trikafta” y “Kaftrio”. Además, se aplicaron filtros de búsqueda como “texto completamente gratuito”, “revisión” y “5 años”, por tanto, se incluyeron artículos entre 2018 y 2023 para la sección de Kaftrio pero datados desde 2015 para otras referencias relacionadas con la fibrosis quística. El único artículo que no cumplió con el filtro de “revisión” fue el de Aspinall, S.A. et al, 2022.

## **- RESULTADOS**

La búsqueda bibliográfica reportó un total de 571 resultados. Todos ellos fueron examinados por su título y resumen. El número final de estudios incluidos en el trabajo fue de 8 páginas web oficiales y 12 artículos, entre los que se incluyen 3 estudios de ensayos clínicos controlados aleatorios (ECA).

El fin de los ensayos era evaluar la eficacia y seguridad de la terapia Kaftrio en pacientes con fibrosis quística. Eran ensayos de fase III aleatorizados y doble ciego. Utilizaron como control pacientes tratados con placebo. Los aspectos que estudiaron fueron la seguridad, farmacocinética, farmacodinámica, tolerabilidad y eficacia a partir de los resultados clínicos obtenidos de todos los pacientes. En la tabla 2 vienen en más detalle las características de los ensayos.

1 <sup>er</sup> autor y año de publicación	Población de estudio y genotipo	Genotipo	n	Duración
Harry GM Heijerman, 2019.	Pacientes con fibrosis quística estables durante el cribado, >12 años, con 40-90% ppFEV1.	F/F	Muestra de 107 pacientes n=52 con tezacaftor, ivacaftor; n=55 Kaftrio	4 meses
P.G. Middleton, 2019.	Pacientes con fibrosis quística estables durante el cribado, >12 años, con 40-90% ppFEV1.	F/FM	Usaron una n de 403 pacientes; n= 203 placebo n= 200 con triple terapia	10 meses
Edith T. Zemanick, 2021.	En niños de 6 a 11 años	F/FM; F/F	N = 66; F/MF (37), F/F (29)	6 meses

**Tabla 2.** Resumen de los ensayos clínicos. Porcentaje de predicción del volumen forzado en 1 s (ppFEV1); Phe508del / Phe508del (F/F); Phe508del/función mínima (F/FM).

Al finalizar los ensayos, el principal resultado determinó que el uso de Kaftrio incrementa la actividad de la proteína CFTR. Los efectos observados, dentro del sistema respiratorio, muestran que tanto en homocigotos como en heterocigotos hubo una mejora significativa de la función respiratoria reflejada en un aumento del ppFEV1 frente al grupo placebo, cuyo valor de ppFEV1 se mantuvo o incluso disminuyó. En cuanto al número de exacerbaciones, durante las 24 semanas del ensayo con heterocigotos, los pacientes con tratamiento tuvieron 41 exacerbaciones mientras que los tratados con placebo tuvieron 113. Es decir, en los heterocigotos el tratamiento Kaftrio disminuye en un 63% la tasa anual de exacerbaciones respiratorias. Los pacientes menores de 12 años, independientemente de sus mutaciones, mostraron un aumento de sus valores de ppFEV1 tras el periodo de tratamiento. Cabe subrayar, que Kaftrio tuvo un efecto sistémico que se comprobó mediante la medición de los niveles de cloruro en el sudor, el cual se utiliza como biomarcador de la calidad de la proteína CFTR (Zaher, A. et al., 2021). Los pacientes con tratamiento tuvieron una disminución sustancial en los niveles de cloruro y aquellos que, previamente, requerían de un suplemento de cloruro sódico pudieron eliminarlo. A su vez, el uso de Kaftrio generó un aumento del peso y del índice de masa corporal en pacientes tanto homocigotos como heterocigotos para la mutación.

Se registraron algunos efectos secundarios de gravedad leve o moderada. Los más comunes fueron erupciones cutáneas, dolor de cabeza, diarrea y dolor abdominal. Asimismo, se hallaron en algunos participantes niveles elevados de enzimas hepáticas en los análisis de sangre. En esas situaciones se detuvo el ensayo hasta que los niveles de enzima volvieron a sus valores normales y después se hizo una valoración riesgo-beneficio para continuar con el tratamiento. En niños menores de 12 años los efectos secundarios predominantes fueron tos, dolor de cabeza y pirexia.

## -DISCUSIÓN

El uso de los moduladores ha tenido un impacto positivo para los pacientes con fibrosis quística. El primero, ivacaftor, es específico para la mutación G551D y sólo cubre al 5% de pacientes. Los avances en investigación permitieron el desarrollo de Orkambi<sup>®</sup> que cubre al 50% de pacientes y aportó bases de corrección del tráfico, potenciación y amplificación del CFTR defectuoso (Chaudary N., 2018). Este conocimiento fue el impulso para el desarrollo de terapias combinadas como Kaftrio. Es una terapia triple que ha demostrado ser eficaz en la mejora de la

enfermedad, segura y aplicable al 90% de enfermos. Mejora la calidad de vida de los pacientes porque reduce el tiempo dedicado al tratamiento y consumo de medicación. Sin embargo, el 10% restante son un claro ejemplo de la heterogeneidad genética de la enfermedad y del reto que supone su abordaje terapéutico. Conviene señalar que los moduladores, si bien mejoran la calidad de vida de los pacientes, también generan efectos secundarios y los más graves son los hepáticos. En el caso de Kaftrio, la mayoría de los efectos adversos son leves o moderados. Además, estos tratamientos tienen un elevado coste por lo que si no están financiados por el Estado son inaccesibles para la mayoría de la población.

Es por ello, por lo que siguen siendo tan importantes las líneas de investigación enfocadas a la búsqueda de nuevos tratamientos como el uso de terapia génica o el desarrollo de nuevos antibióticos contra bacterias multirresistentes. Asimismo, la investigación está centrada en que los pacientes puedan iniciar el tratamiento con moduladores en base al uso de biomarcadores de la expresión de CFTR (ej. cloruro del sudor y diferencias del potencial nasal) en lugar de las mutaciones específicas del CFTR (Chaudary N., 2018).

#### - CONCLUSIONES

- La terapia revolucionaria Kaftrio es eficaz y segura para los pacientes de fibrosis quística y con efectos secundarios en su mayoría leves o moderados.
- Se deben hacer estudios para evaluar los efectos de Kaftrio a largo plazo y fomentar su accesibilidad para todos los pacientes.
- Es preciso investigar en fibrosis quística para desarrollar tratamientos que cubran a todos los enfermos y mejorar la atención sanitaria.

#### - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Cystic Fibrosis Foundation. (2021). *CF Foundation Patient Registry*. Consulta 6 de marzo de 2023. <https://www.cff.org/medical-professionals/patient-registry>

Chaudary N. (2018). Triplet CFTR modulators: future prospects for treatment of cystic fibrosis. *Therapeutics and clinical risk management*, 14, 2375–2383. <https://doi.org/10.2147/TCRM.S147164>

Dębczyński, M., Mojsak, D., Minarowski, Ł., Maciejewska, M., Lisowski, P., & Mróz, R. M. (2023). Genome-engineering technologies for modeling and treatment of cystic fibrosis. *Advances in Medical Sciences*, 68(1), 111-120. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2023.02.003>

European Cystic Fibrosis Society (ECFS). (2020). *ECFS Patient Registry Annual Report 2020*. Consulta 6 de marzo de 2023. [https://www.ecfs.eu/sites/default/files/ECFSPR\\_Report\\_2020\\_v1.0%20%2807Jun2022%29\\_website.pdf](https://www.ecfs.eu/sites/default/files/ECFSPR_Report_2020_v1.0%20%2807Jun2022%29_website.pdf)

European Medicines Agency. (2023, January 16). Kaftrio. Consulta 6 de marzo de 2023. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/kaftrio>

Freswick, P. N., Reid, E. K., & Mascarenhas, M. R. (2022). Pancreatic Enzyme Replacement Therapy in Cystic Fibrosis. *Nutrients*, 14(7), 1341. <https://doi.org/10.3390/nu14071341>

Hanssens, L. S., Duchateau, J., & Casimir, G. J. (2021). CFTR protein: Not just a chloride channel?. *Cells*, 10(11), 2844. <https://doi.org/10.3390/cells10112844>

Heijerman, H. G., McKone, E. F., Downey, D. G., Van Braeckel, E., Rowe, S. M., Tullis, E., ... & Majoor, C. (2019). Efficacy and safety of the elexacaftor plus tezacaftor plus ivacaftor combination regimen in people with cystic fibrosis homozygous for the F508del mutation: a

double-blind, randomised, phase 3 trial. *The Lancet*, 394(10212), 1940-1948. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32597-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32597-8)

Marson, F. A. L., Bertuzzo, C. S., & Ribeiro, J. D. (2016). Classification of CFTR mutation classes. *The Lancet Respiratory Medicine*, 4(8), e37-e38. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(16\)30188-6](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(16)30188-6)

Middleton, P. G., Mall, M. A., Dřevínek, P., Lands, L. C., McKone, E. F., Polineni, D., ... & Jain, R. (2019). Elexacaftor–tezacaftor–ivacaftor for cystic fibrosis with a single Phe508del allele. *New England Journal of Medicine*, 381(19), 1809-1819. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1908639>

Moran, O. (2017). The gating of the CFTR channel. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74, 85-92. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2390-z>

National Organization for Rare Disorders. (2020). *Cystic Fibrosis - Symptoms, Causes, Treatment/NORD*. Consulta 6 marzo 2023 <https://rarediseases.org/rare-diseases/cystic-fibrosis/>

Pittman, J. E., & Ferkol, T. W. (2015). The evolution of cystic fibrosis care. *Chest*, 148(2), 533-542. <https://doi.org/10.1378/chest.14-1997>

Shteinberg, M., Haq, I. J., Polineni, D., & Davies, J. C. (2021). Cystic fibrosis. *The Lancet*, 397(10290), 2195-2211. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)32542-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)32542-3)

Taylor-Cousar, J. L., Mall, M. A., Ramsey, B. W., McKone, E. F., Tullis, E., Marigowda, G., ... & Rowe, S. M. (2019). Clinical development of triple-combination CFTR modulators for cystic fibrosis patients with one or two F508del alleles. *ERJ open research*, 5(2). <https://doi.org/10.1183/23120541.00082-2019>

Trikafta.com. (s.f.). *How does Trikafta work?* Consulta 6 de marzo de 2023. <https://www.trikafta.com/how-trikafta-works>

Trikafta.com. (s.f.). *Who Trikafta is for?* Consulta 6 de marzo de 2023. <https://www.trikafta.com/who-trikafta-is-for>

U.S. Food And Drug Administration. (2019, October 21). *FDA approves new breakthrough therapy for cystic fibrosis*. Consulta 6 de marzo 2023. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-new-breakthrough-therapy-cystic-fibrosis>

Vertex (s.f.). *Cystic Fibrosis*. Consulta 6 de marzo de 2023 <https://www.vrtx.com/our-science/pipeline/cystic-fibrosis/>

Zaher, A., ElSaygh, J., ElSori, D., ElSaygh, H., & Sanni, A. (2021). A Review of Trikafta: Triple Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Modulator Therapy. *Cureus*, 13(7), e16144. <https://doi.org/10.7759/cureus.16144>

Zemanick, E. T., Taylor-Cousar, J. L., Davies, J., Gibson, R. L., Mall, M. A., McKone, E. F., ... & McColley, S. A. (2021). A phase 3 open-label study of elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor in children 6 through 11 years of age with cystic fibrosis and at least one F508del allele. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 203(12), 1522-1532. <https://doi.org/10.1164/rccm.202102-0509oc>



**76856: Consecuencias de variaciones cromosómicas numéricas en fertilidad: inferencias a partir del estudio del mutante *osd1* / Consequences of numerical chromosome variations in fertility: inferences from the study of *osd1* mutant****Área de conocimiento:** BIOLOGÍA**Autor(es):** Álvaro Carrasco Coquillat**Tutor(es):** Mónica Pradillo Orellana, Nadia Fernández Jiménez**Universidad:** Universidad Complutense de Madrid**Facultad:** Facultad de Ciencias Biológicas**Titulación:** Grado en Biología**Formato:** Comunicación Oral - Investigación básica**Palabras Clave:** meiosis, poliploidía, *Arabidopsis thaliana*, fertilidad, *osd1* / meiosis, polyploidy, *Arabidopsis thaliana*, fertility, *osd1*

Las mutaciones cromosómicas numéricas son variaciones en el número de cromosomas de un individuo con respecto a la dotación cromosómica de su especie. Estas mutaciones pueden originarse de distintas formas y existen varios tipos, siendo las aneuploidías (variación en el número de copias de un cromosoma concreto) las únicas variaciones cromosómicas viables en humanos. Las aneuploidías conllevan problemas graves de salud que incluyen defectos cognitivos y de fertilidad y se producen fundamentalmente por errores en la segregación cromosómica en la formación de los gametos. Por tanto, para entender el origen de las aneuploidías es fundamental el estudio de la meiosis, la división celular especializada que origina los gametos. Debido a su tolerancia a variaciones cromosómicas, las plantas representan un modelo ideal para el estudio de los problemas de segregación cromosómica que las originan, no siendo posible este tipo de estudio en modelos animales, en los que las aneuploidías son incompatibles con la progresión de la meiosis. En este contexto, el objetivo principal del presente trabajo es la caracterización de la meiosis masculina en el mutante *osd1* en la especie *Arabidopsis thaliana*. Este mutante se caracteriza por carecer de segunda división meiótica, lo que genera la formación de gametos diploides y de individuos poliploides tras la fecundación. La caracterización del fenotipo meiótico de *osd1* se ha realizado a través de una aproximación citológica basada en técnicas de extensión de la cromatina, hibridación in situ para la identificación de regiones cromosómicas específicas y la observación al microscopio de fluorescencia. En el presente trabajo se incluyen los resultados preliminares correspondientes a la caracterización del mutante, los cuales han permitido inferir cómo se originan los gametos diploides en *osd1*. Estos resultados constituyen la base de futuros estudios para entender las consecuencias de las variaciones cromosómicas numéricas en la fertilidad.

Numerical chromosomal mutations are variations in the number of chromosomes of an individual respect to the chromosome number of its species. These mutations can be originated in different ways and there are several types, being the aneuploidies (variation in the number a specific chromosome copies) the only viable chromosomal variations in humans. Aneuploidies imply serious health problems that include cognitive and fertility defects and are mainly caused by errors in chromosome segregation during the formation of gametes. Therefore, to understand the origin of aneuploidies, it is essential to study meiosis, the specialized cell division that originates gametes. Due to their tolerance to chromosomal variations, plants represent an ideal model for the study of chromosome segregation problems that cause them, not being possible this type of study in animal models, in which aneuploidies are incompatible with the progression of meiosis. In this context, the main objective of this work is the characterization of male meiosis in the *osd1* mutant in the species *Arabidopsis thaliana*. This mutant is characterized by the omission of the second meiotic division, leading to the formation of diploid gametes and polyploid individuals after fertilization. The characterization of the *osd1* meiotic phenotype has been done through a cytological approach based on chromatin spreading techniques, in situ hybridization for the identification of specific chromosomal regions, and cell analysis using an epifluorescence microscope. This work includes preliminary results corresponding to the characterization of the mutant, which have allowed us to infer how diploid gametes originate in *osd1*. These results are the basis for future studies to understand the consequences of numerical chromosomal variations on fertility.

## **Consecuencias de variaciones cromosómicas numéricas en fertilidad: inferencias a partir del estudio del mutante *osd1* / Consequences of numerical chromosome variations in fertility: inferences from the study of *osd1* mutant.**

Autor: Álvaro Carrasco Coquillat (alvcar02@ucm.es; N° identificador 1498044). Tutora 1: Mónica Pradillo Orellana (pradillo@bio.ucm.es) y Tutora 2: Nadia Fernández Jiménez (nadfer01@ucm.es). Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid.

Palabras clave: meiosis, poliploidía, *Arabidopsis thaliana*, fertilidad, *osd1*. Keywords: meiosis, polyploidy, *Arabidopsis thaliana*, fertility, *osd1*.

**Resumen:** Las mutaciones cromosómicas numéricas son variaciones en el número de cromosomas de un individuo con respecto a la dotación cromosómica de su especie. Estas mutaciones pueden originarse de distintas formas y existen varios tipos, siendo las aneuploidías (variación en el número de copias de un cromosoma concreto) las únicas variaciones cromosómicas viables en humanos. Las aneuploidías conllevan problemas graves de salud que incluyen defectos cognitivos y de fertilidad y se producen fundamentalmente por errores en la segregación cromosómica en la formación de los gametos. Por tanto, para entender el origen de las aneuploidías es fundamental el estudio de la meiosis, la división celular especializada que origina los gametos. Debido a su tolerancia a variaciones cromosómicas, las plantas representan un modelo ideal para el estudio de los problemas de segregación cromosómica que las originan, no siendo posible este tipo de estudio en modelos animales, en los que las aneuploidías son incompatibles con la progresión de la meiosis. En este contexto, el objetivo principal del presente trabajo es la caracterización de la meiosis masculina en el mutante *osd1* en la especie *Arabidopsis thaliana*. Este mutante se caracteriza por carecer de segunda división meiótica, lo que genera la formación de gametos diploides y de individuos poliploides tras la fecundación. La caracterización del fenotipo meiótico de *osd1* se ha realizado a través de una aproximación citológica basada en técnicas de extensión de la cromatina, hibridación *in situ* para la identificación de regiones cromosómicas específicas y la observación al microscopio de fluorescencia. En el presente trabajo se incluyen los resultados preliminares correspondientes a la caracterización del mutante, los cuales han permitido inferir cómo se originan los gametos diploides en *osd1*. Estos resultados constituyen la base de futuros estudios para entender las consecuencias de las variaciones cromosómicas numéricas en la fertilidad.

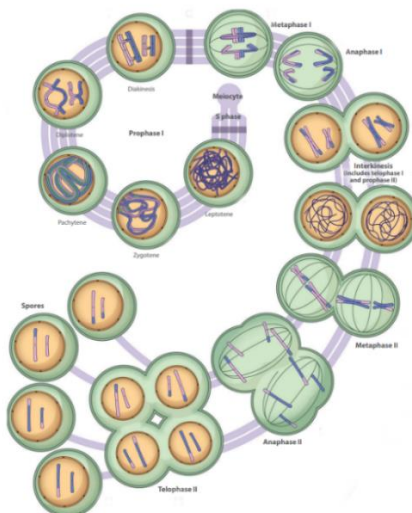
**Abstract:** Numerical chromosomal mutations are variations in the number of chromosomes of an individual respect to the chromosome number of its species. These mutations can be originated in different ways and there are several types, being the aneuploidies (variation in the number a specific chromosome copies) the only viable chromosomal variations in humans. Aneuploidies imply serious health problems that include cognitive and fertility defects and are mainly caused by errors in chromosome segregation during the formation of gametes. Therefore, to understand the origin of aneuploidies, it is essential to study meiosis, the specialized cell division that originates gametes. Due to their tolerance to chromosomal variations, plants represent an ideal model for the study of chromosome segregation problems that cause them, not being possible this type of study in animal models, in which aneuploidies are incompatible with the progression of meiosis. In this context, the main objective of this work is the characterization of male meiosis in the *osd1* mutant in the species *Arabidopsis thaliana*. This mutant is characterized by the omission of the second meiotic division, leading to the formation of diploid gametes and polyploid individuals after fertilization. The characterization of the *osd1* meiotic phenotype has been done through a cytological approach based on chromatin spreading techniques, *in situ* hybridization for the identification of specific chromosomal regions, and cell analysis using an epifluorescence microscope. This work includes preliminary results corresponding to the characterization of the mutant, which have allowed us to infer how diploid gametes originate in *osd1*. These results are the basis for future studies to understand the consequences of numerical chromosomal variations on fertility.

### Introducción:

La **meiosis** es un tipo de división celular especializada en la que se produce una sola replicación del DNA seguida de dos divisiones celulares consecutivas. Este tipo de división celular permite la formación de los gametos, los cuales presentan la mitad del número de cromosomas. De esta manera, tras la fecundación se restaura el número cromosómico de la especie. En la primera división meiótica se produce el apareamiento de cromosomas homólogos, su recombinación y su segregación, mientras que en la segunda división meiótica ocurre la segregación de las cromátidas hermanas, al igual que en una mitosis, pero en una célula haploide.

Las **mutaciones cromosómicas numéricas** se originan fundamentalmente por fallos en la segregación cromosómica en meiosis. Entre estas mutaciones se distinguen las variaciones en el número de juegos cromosómicos completos (**poliploidías**) y las variaciones en el número de copias de un cromosoma concreto (**aneuploidías**). Pese a que generalmente resultan en abortos, en humanos, las aneuploidías (trisomías o monosomías) pueden ser compatibles con la vida en algunos casos concretos, aunque se asocian a graves patologías. Estas aneuploidías pueden tener su origen en la primera o en la segunda división meiótica, tanto por la parte paterna como por la materna. No obstante, la mayoría de las aneuploidías se producen por una no disyunción meiótica (problema en la primera división) por parte materna (Pollard *et al.*, 2017). Un ejemplo de esto es la trisomía del cromosoma 21 (síndrome de Down), cuya frecuencia además aumenta con la edad materna (Qiao *et al.*, 2014). Sin embargo, la monosomía del cromosoma X (síndrome de Turner) se produce en más del 70% de los casos por la pérdida del cromosoma X o Y que aporta el padre (Hassold y Hunt, 2001). El fenotipo asociado a aneuploidías en humanos incluye diversas patologías, siendo algunas de las más comunes los defectos cognitivos, ciertas anomalías musculares o esqueléticas y problemas de fertilidad. En estos defectos de fertilidad cabe destacar la oligospermia o azoospermia por la parte masculina. Ésta se ha observado tanto en individuos con aneuploidías en cromosomas sexuales (como la trisomía XYY - síndrome de Jakob - o la trisomía XXY - síndrome de Klinefelter) como en autosomas (en individuos que presentan síndrome de Down) (Parizot *et al.*, 2019; Gunes y Esteves, 2021). En lo que respecta a la parte femenina, por ejemplo, las mujeres con síndrome de Turner son prácticamente infértiles (Viuff y Grabholt, 2022), mientras que mujeres con síndrome de Down son fértiles, pero presentan una menopausia temprana (Parizot *et al.*, 2019).

Las plantas presentan una tolerancia sorprendente a mutaciones cromosómicas numéricas (Matzke *et al.*, 2003). Dentro del mundo vegetal, la especie ***Arabidopsis thaliana***, constituye además un modelo ideal, ya que tiene un ciclo de vida corto, su genoma está completamente secuenciado y analizado y presenta un número cromosómico bajo ( $2n = 10$ ). La meiosis en *Arabidopsis thaliana* transcurre de manera muy similar a la de otras especies, aunque no hay citocinesis tras la primera división celular y las dos células hijas quedan separadas por una barrera de orgánulos (Figura 1). La formación de gametos aneuploides o poliploides se puede producir por errores en sinapsis, recombinación o segregación en el proceso meiótico (Pradillo *et al.*, 2014). El estudio de la meiosis en este organismo modelo ha permitido descubrir aspectos directamente relacionados con la salud humana (Jones *et al.*, 2008).



**Figura 1:** Representación esquemática de la meiosis masculina en *Arabidopsis thaliana* (adaptada de Mercier *et al.*, 2015)

Se conocen diversos mutantes con problemas en meiosis que originan gametos diploides y, por lo tanto, descendientes poliploides tras la fecundación (Pelé *et al.*, 2018). Entre esos mutantes cabe destacar *osd1*, cuyo nombre hace referencia al fenotipo meiótico de ausencia de segunda división (*omission of second division*) (D'arfuth *et al.*, 2009). Se ha descrito que la proteína OSD1 está implicada en la progresión de la meiosis mediante la inhibición del complejo APC/C (Complejo Promotor de la Anafase/Ciclosoma). Este APC/C es un regulador de la actividad de las CDK (Ciclinas Dependientes de Quinasas), las cuales son fundamentales en el avance del proceso meiótico (Cromer *et al.*, 2012). No obstante, pese a que se han descrito las características principales del mutante *osd1* y el mecanismo molecular de actuación de OSD1, hasta el momento no se ha incidido en la caracterización citológica del proceso meiótico del mutante, desconociéndose el mecanismo por el cual segregan las cromátidas hermanas a pesar de la inexistencia de una segunda división meiótica. Para tratar de determinar este proceso, en este trabajo se presenta una caracterización citogenética detallada de la meiosis masculina en este mutante.

#### **Material y métodos:**

Para la caracterización del mutante se utilizó una línea comercial de *A. thaliana* con una inserción de T-DNA en el gen *OSD1*. Además, se utilizó el ecotipo Col-0 (Columbia) como control para la comparación del proceso meiótico del mutante. Para el análisis de la meiosis se utilizaron botones florales del mutante en homocigosis que habían sido previamente fijados en solución Carnoy (60% etanol absoluto, 30% cloroformo, 10% ácido acético glacial) y conservados a -20°C hasta su utilización.

La caracterización citológica del mutante se hizo mediante técnicas de extensión (*spreading*) de la cromatina y de hibridación *in situ* fluorescente.

#### Spreading de la cromatina:

Para la extensión de la cromatina, los botones florales previamente fijados se lavaron 3 veces en solución 3:1 (3 porciones de etanol absoluto y 1 de ácido acético glacial). Tras esto, se realizaron otros tres lavados en tampón citrato y se llevó a cabo una digestión en una solución enzimática de pectoliasa, citohelicasa y celulasa durante 2 horas a 37°C. Tras este tiempo, se realizaron las preparaciones colocando cada botón floral en un portaobjetos, macerando el material con una aguja enmangada. Se añadió ácido acético al 60% frío y solución 3:1 para la

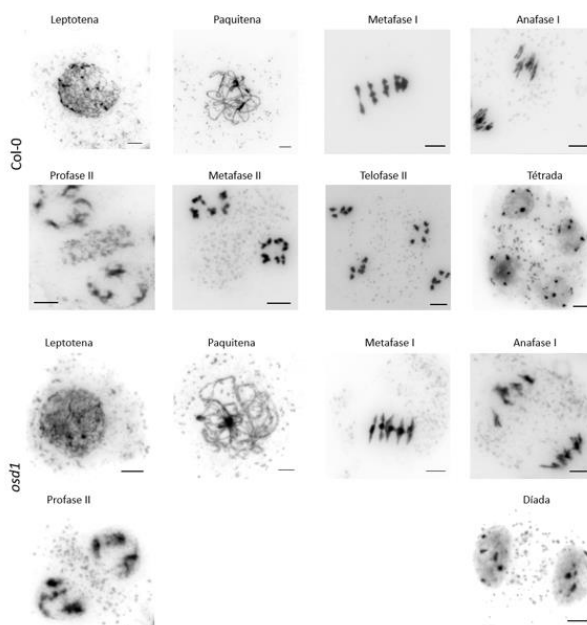
fijación. Finalmente, las preparaciones se tiñeron con DAPI (diamidino-2-fenilindol) diluido en medio de montaje *Vectashield*<sup>®</sup>, para su observación al microscopio de fluorescencia.

#### FISH (hibridación *in situ* fluorescente)

La FISH se realizó sobre las preparaciones anteriores para identificar regiones cromosómicas concretas mediante la utilización de sondas marcadas con fluorescencia. En este caso, se identificaron los centrómeros y el ADN ribosómico (ADNr) 5S. Para llevar a cabo la FISH, se siguió fundamentalmente el protocolo descrito por Armstrong *et al.* (2009). Para la preparación de las sondas, se mezclaron ambas en una mezcla de hibridación, y se marcaron por la técnica *Nick translation*, usando dUTP-biotina para la sonda de ADNr 5S y dUTP-digoxigenina para la sonda de centrómeros. Para la detección de las sondas se utilizaron anticuerpos FITC-antidigoxigenina (verde) y Cy3-avidina (rojo). Tras llevar a cabo el protocolo, se procedió a la observación de las preparaciones al microscopio de fluorescencia.

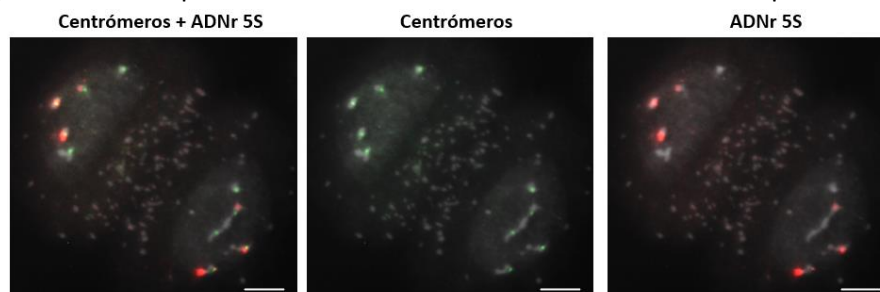
#### **Resultados:**

En lo que respecta a la caracterización del proceso meiótico del mutante, se observaron diferencias apreciables con respecto al control (Figura 2). En la meiosis del control se forman cinco bivalentes en metafase I, lo que garantiza una segregación correcta de cinco cromosomas a cada polo en anafase I. La segunda división comienza con cinco cromosomas en cada polo, que van aumentando su condensación conforme prosigue la meiosis. En anafase II estos cromosomas separan sus cromátidas a polos opuestos y al final del proceso meiótico se observan tétradas. En *osd1* la meiosis transcurre de manera similar al control hasta profase II. En este punto la meiosis parece detenerse sin que se aprecie en ningún momento ninguna estructura similar a una tétrada, aunque la morfología de la cromatina varía, siendo similar a la de la tétrada, pero únicamente con dos núcleos (díada). Estas díadas presentaron cinco estructuras cromosómicas observables en cada uno de los dos polos, lo cual indica que las dos cromátidas hermanas que conforman cada cromosoma continúan unidas y que cada núcleo es haploide. Sin embargo, se esperaría observar 10 estructuras en cada polo correspondientes a las 10 cromátidas individualizadas, lo que explicaría la formación de gametos diploides en este mutante.



**Figura 2:** Fases representativas de la meiosis en el mutante *osd1*, comparadas con el control (Col-0). Las barras hacen referencia a la escala (5  $\mu$ m)

En lo que respecta a la FISH, los datos que tenemos son aún muy preliminares, pero en general confirman los resultados del *spreading*. En la FISH se realizó una detección de los centrómeros y de ADNr 5S. En las díadas de *osd1* se apreciaron cinco señales centroméricas en cada polo y tres señales de ADNr 5S, correspondientes al marcaje de los cromosomas 3, 4 y 5 (Figura 3), confirmando que las cromátidas hermanas todavía no se han separado.



**Figura 3:** FISH en díada de *osd1* con cinco señales centroméricas y tres señales de ADNr 5S en cada polo, lo que indica que las cromátidas aún no se han separado.

#### Discusión:

A partir de los resultados observados se infiere que el mutante *osd1* parece estancarse en una fase similar a una profase II, con cinco cromosomas de dos cromátidas en cada núcleo, ya que las cromátidas hermanas parecen encontrarse unidas. Por tanto, ¿cómo se generarían los gametos diploides de diez cromosomas a partir de este tipo de células? Lo más probable es que las cromátidas acaben separándose, aunque no exista una anafase II. Se trataría de un fenómeno similar al que sucede cuando se aplica colchicina, la cual inhibe la polimerización de los microtúbulos, y se generan células poliploides (Bennet y Smith, 1979).

En humanos, la poliploidía es una anomalía bastante habitual en los abortos que ocurren durante el primer trimestre (van den Berg *et al.*, 2012). También el análisis genético preimplantacional de embriones ha demostrado que la poliploidía tiene una incidencia importante entre las anomalías cromosómicas que se detectan (Munné y Cohen, 1998).

Aunque *Arabidopsis thaliana* se describe tradicionalmente como el organismo modelo para estudios de biología vegetal, también es muy útil para comprender mecanismos citológicos y moleculares que subyacen a alteraciones en la formación de los gametos en humanos. En este trabajo se ha realizado la caracterización citogenética de un mutante en el que se forman gametos diploides. Los resultados son aún preliminares, pero la observación citológica del proceso de formación de estos gametos diploides en *osd1* podría aportar información útil para entender las causas por las que pueden aparecer embriones poliploides en humanos.

#### Conclusiones:

- El mutante *osd1* progresa de forma normal en su meiosis hasta la profase II, tras la que entra directamente en fase de díada, a partir de la cual se originan gametos diploides.
- En las díadas de *osd1* las cromátidas hermanas permanecen unidas. En un paso posterior en la formación de granos de polen las cromátidas deben separarse, aunque sin migrar a polos opuestos, y esto explicaría la formación de gametos diploides en el mutante.
- Aunque parezca sorprendente, este tipo de estudio puede proporcionar una información muy útil en el análisis de anomalías cromosómicas en gametos humanos.

#### Bibliografía:

- Armstrong, S. J., Sanchez-Moran, E., & Franklin, F. C. (2009). Cytological analysis of *Arabidopsis thaliana* meiotic chromosomes. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 558, 131–145. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-103-5\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-103-5_9)

- Bennett, M. D., & Smith, J. B. (1979). The effect of colchicine on fibrillar material in wheat meiocytes. *Journal of cell science*, 38, 33–47. <https://doi.org/10.1242/jcs.38.1.33>
- Cromer, L., Heyman, J., Touati, S., Harashima, H., Araou, E., Girard, C., ... & Mercier, R. (2012). OSD1 promotes meiotic progression via APC/C inhibition and forms a regulatory network with TDM and CYCA1; 2/TAM. *PLoS Genetics*, 8(7), e1002865. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002865>
- D'Erfurth I, Jolivet S, Froger N, Catrice O, Novatchkova M, *et al.* (2009) Turning Meiosis into Mitosis. *PLOS Biology* 7(6): e1000124. <https://doi.org/journal.pbio.1000124>
- Gunes, S., & Esteves, S. C. (2021). Role of genetics and epigenetics in male infertility. *Andrologia*, 53(1), e13586. <https://doi.org/10.1111/and.13586>
- Hassold T, Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet.* 2001 Apr;2(4):280-91. <https://doi.org/10.1038/35066065>.
- Jones, A. M., Chory, J., Dangl, J. L., Estelle, M., Jacobsen, S. E., Meyerowitz, E. M., Nordborg, M., & Weigel, D. (2008). The impact of *Arabidopsis* on human health: diversifying our portfolio. *Cell*, 133(6), 939–943. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.05.040>
- Matzke, M. A., Mette, M. F., Kanno, T., & Matzke, A. J. (2003). Does the intrinsic instability of aneuploid genomes have a causal role in cancer?. *Trends in genetics: TIG*, 19(5), 253–256. [https://doi.org/10.1016/s0168-9525\(03\)00057-x](https://doi.org/10.1016/s0168-9525(03)00057-x)
- Mercier, R., Mézard, C., Jenczewski, E., Macaisne, N., & Grelon, M. (2015). The molecular biology of meiosis in plants. *Annual review of plant biology*, 66, 297–327. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-035923>
- Munné, S., & Cohen, J. (1998). Chromosome abnormalities in human embryos. *Human reproduction update*, 4(6), 842–855. <https://doi.org/10.1093/humupd/4.6.842>
- Parizot, E., Dard, R., Janel, N., & Vialard, F. (2019). Down syndrome and infertility: what support should we provide? *Journal of assisted reproduction and genetics*, 36(6), 1063–1067. <https://doi.org/10.1007/s10815-019-01457-2>
- Pelé, A., Rousseau-Gueutin, M., & Chèvre, A. M. (2018). Speciation Success of Polyploid Plants Closely Relates to the Regulation of Meiotic Recombination. *Frontiers in plant science*, 9, 907. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00907>
- Pollard, T. D., Earnshaw, W. C., Earnshaw, W. C., Lippincott-Schwartz, J., Johnson, G. T., & Johnson, G. T. (2017). Meiosis (779-795). *Cell biology* (Third). Elsevier.
- Pradillo, M., Varas, J., Oliver, C., & Santos, J. L. (2014). On the role of AtDMC1, AtRAD51 and its paralogs during *Arabidopsis* meiosis. *Frontiers in plant science*, 5, 23. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00023>
- Qiao, J., Wang, Z. B., Feng, H. L., Miao, Y. L., Wang, Q., Yu, Y., ... & Sun, Q. Y. (2014). The root of reduced fertility in aged women and possible therapeutic options: current status and future prospects. *Molecular aspects of medicine*, 38, 54-85.
- van den Berg, M. M., van Maarle, M. C., van Wely, M., & Goddijn, M. (2012). Genetics of early miscarriage. *Biochimica et biophysica acta*, 1822(12), 1951–1959. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.07.001>
- Viuff, M., & Gravholt, C. H. (2022). Turner Syndrome and Fertility. *Annales d'endocrinologie*, 83(4), 244–249. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2022.06.001>



**76896: Niveles de vitaminas A y E en huevo tras la suplementación con orujo en dieta / Levels of vitamins A and E in eggs after diet supplementation with grape pomace****Área de conocimiento:** BIOLOGÍA**Autor(es):** Carlos Lavesa De Pablo**Tutor(es):** Mónica López Torres, Inés Sánchez-Román Rojas**Universidad:** Universidad Complutense de Madrid**Facultad:** Facultad de Ciencias Biológicas**Titulación:** Grado en Biología**Formato:** Comunicación Oral - Investigación básica**Palabras Clave:** huevo, orujo, economía circular, vitamina A & vitamina E; egg, pomace, circular economy, vitamin A & vitamin E.

El orujo es el principal residuo de la industria vinícola y posee un elevado contenido de polifenoles con actividad antioxidante, que le otorgan un gran interés como suplemento para piensos, eliminándose así el residuo y fomentando la economía circular. El objetivo principal de este trabajo es evaluar si la incorporación del orujo en la dieta de gallinas ponedoras produce un enriquecimiento en antioxidantes del huevo, analizando su contenido en retinol y  $\alpha$ - y  $\gamma$ -tocoferol, además de varios parámetros de calidad. Para esto se utilizaron 50 gallinas (25 estirpe Leghorn y 25 estirpe Isa Brown), divididas en dos grupos, control, alimentado con un pienso control y experimental, alimentado con un pienso suplementado con un 5% de orujo. Ambos piensos tenían una composición similar y el mismo contenido en fibra, proteínas y energía. El experimento duró seis semanas. En la última semana se recogieron los huevos y se midieron los parámetros de calidad, las yemas fueron liofilizadas y congeladas para posteriormente medir el contenido de retinol,  $\alpha$ - y  $\gamma$ -tocoferol mediante detección UV con HPLC. Estos resultados fueron analizados estudiando la influencia de dieta y estirpe mediante un ANOVA bifactorial. Se observó que la suplementación aumentó el peso de los huevos, pero no modificó el contenido de retinol y  $\alpha$ - y  $\gamma$ -tocoferol. También comprobamos que la estirpe tiene una influencia significativa sobre los parámetros de calidad del huevo, presentando valores mayores los huevos de la estirpe Isa Brown, y sobre el contenido de  $\alpha$ - y  $\gamma$ -tocoferol. En el caso del  $\alpha$ -tocoferol se observó que las yemas de los huevos de la estirpe Isa Brown presentaban valores mayores, mientras que respecto al  $\gamma$ -tocoferol eran mayores en la estirpe Leghorn. Esta ausencia de efectos negativos permite emplear el orujo como suplemento de bajo coste, logrando así eliminar un residuo muy abundante, favoreciendo la economía circular.

Grape pomace is the main waste of the wine industry. It has a high concentration of antioxidant polyphenols that makes it an interesting supplement in animal diets, allowing us to eliminate this waste and promote circular economy. Taking this into account, the main objective of this work is to evaluate whether grape pomace supplementation in diets of laying hens produces an enrichment in egg antioxidants, analyzing its retinol,  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherol content, in addition to various egg quality parameters. For this experiment, 50 hens in total (25 Leghorn and 25 Isa Brown) were used. These hens were divided into two groups, a control group which was fed with a control diet, and an experimental group, fed with a 5% grape pomace supplemented diet. Both diets had a similar composition and the same fiber, protein, and energy content. The experiment lasted six weeks. In the last week, eggs were collected to measure the quality parameters and the yolks were lyophilized and frozen for the posterior analysis of retinol,  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherol using UV detection with HPLC. These results were analyzed studying the influence of the diet and the strain with a two-factor ANOVA. In this study we observed that grape pomace supplementation increased egg weight, but it did not modify the level of retinol,  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherol when compared to the control group. We also observed that strain has a significant effect on the egg quality parameters, showing higher values the Isa Brown strain eggs. The strain also had a significant effect on  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherol content, showing the Isa Brown yolks a higher amount of  $\alpha$ -tocopherol and the Leghorn yolks a higher amount of  $\gamma$ -tocopherol. The lack of negative effects allows grape pomace to be used as a low-cost supplement, eliminating a very abundant residue, and contributing to circular economy.



## **Niveles de vitaminas A y E en huevo tras la suplementación con orujo en dieta**

### **Levels of vitamins A and E in eggs after diet supplementation with grape pomace**

Autor: 1505683, Carlos Lavesa De Pablo, [clavesa@ucm.es](mailto:clavesa@ucm.es)

Tutores: Mónica López Torres, [mltorres@ucm.es](mailto:mltorres@ucm.es) e Inés Sánchez-Román Rojas [inessa04@ucm.es](mailto:inessa04@ucm.es).

Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid (UCM).

#### **Abstract**

El orujo es el principal residuo de la industria vinícola y posee un elevado contenido de polifenoles con actividad antioxidante, que le otorgan un gran interés como suplemento para piensos, eliminándose así el residuo y fomentando la economía circular. El objetivo principal de este trabajo es evaluar si la incorporación del orujo en la dieta de gallinas ponedoras produce un enriquecimiento en antioxidantes del huevo, analizando su contenido en retinol y  $\alpha$ - y  $\gamma$ -tocoferol, además de varios parámetros de calidad. Para esto se utilizaron 50 gallinas (25 estirpe Leghorn y 25 estirpe Isa Brown), divididas en dos grupos, control, alimentado con un pienso control y experimental, alimentado con un pienso suplementado con un 5% de orujo. Ambos piensos tenían una composición similar y el mismo contenido en fibra, proteínas y energía. El experimento duró seis semanas. En la última semana se recogieron los huevos y se midieron los parámetros de calidad, las yemas fueron liofilizadas y congeladas para posteriormente medir el contenido de retinol,  $\alpha$ - y  $\gamma$ -tocoferol mediante detección UV con HPLC. Estos resultados fueron analizados estudiando la influencia de dieta y estirpe mediante un ANOVA bifactorial. Se observó que la suplementación aumentó el peso de los huevos, pero no modificó el contenido de retinol y  $\alpha$ - y  $\gamma$ -tocoferol. También comprobamos que la estirpe tiene una influencia significativa sobre los parámetros de calidad del huevo, presentando valores mayores los huevos de la estirpe Isa Brown, y sobre el contenido de  $\alpha$ - y  $\gamma$ -tocoferol. En el caso del  $\alpha$ -tocoferol se observó que las yemas de los huevos de la estirpe Isa Brown presentaban valores mayores, mientras que respecto al  $\gamma$ -tocoferol eran mayores en la estirpe Leghorn. Esta ausencia de efectos negativos permite emplear el orujo como suplemento de bajo coste, logrando así eliminar un residuo muy abundante, favoreciendo la economía circular.

Palabras clave: huevo, orujo, economía circular, vitamina A & vitamina E.

Grape pomace is the main waste of the wine industry. It has a high concentration of antioxidant polyphenols that makes it an interesting supplement in animal diets, allowing us to eliminate this waste and promote circular economy. Taking this into account, the main objective of this work is to evaluate whether grape pomace supplementation in diets of laying hens produces an enrichment in egg antioxidants, analyzing its retinol,  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherol content, in addition to various egg quality parameters. For this experiment, 50 hens in total (25 Leghorn and 25 Isa Brown) were used. These hens were divided into two groups, a control group which was fed with a control diet, and an experimental group, fed with a 5% grape pomace supplemented diet. Both diets had a similar composition and the same fiber, protein, and energy content. The experiment lasted six weeks. In the last week, eggs were collected to measure the quality parameters and the yolks were lyophilized and frozen for the posterior analysis of retinol,  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherol using UV detection with HPLC. These results were analyzed studying the influence of the diet and the strain with a two-factor ANOVA. In this study we observed that grape pomace supplementation increased egg weight, but it did not modify the level of retinol,  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherol when compared to the control group. We also observed that strain has a significant effect on the egg quality parameters, showing higher values the Isa Brown strain eggs. The strain also had a significant effect on  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherol content, showing the Isa Brown yolks a higher amount of  $\alpha$ -tocopherol and the Leghorn yolks a higher amount of  $\gamma$ -tocopherol. The lack of negative effects allows grape pomace to be used as a low-cost supplement, eliminating a very abundant residue, and contributing to circular economy.

Key words: egg, pomace, circular economy, vitamin A & vitamin E.

## **Introducción**

España es el país que posee una mayor superficie de viñedos, además, de ser el tercer país productor de vino y cuarto productor de uvas (Organización internacional de la viña y el vino, 2021). Esta industria genera una gran cantidad de residuos entre los que encontramos el orujo, una mezcla de semillas, pieles, pulpas y tallos de la uva obtenida tras el prensado. El orujo contiene una gran cantidad de polifenoles que presentan actividad antioxidante y antimicrobiana (Xia, 2010). Este elevado contenido en polifenoles hace que el orujo tenga un gran interés en la alimentación animal como suplemento para piensos, mejorando la estabilidad de los lípidos y otros parámetros (crecimiento microbiano, la coloración y la textura (Nardoia, 2018)), e induce un aumento en el contenido de vitamina E en la carne de estos (Romero, 2021).

También se ha descrito un efecto sobre la calidad del huevo, mejorando parámetros como la coloración y la altura del albumen y reduciendo la oxidación de lípidos, así como aumentando la cantidad de ácidos grasos polinsaturados (Romero, 2022). Esto es de gran importancia ya que el huevo es uno de los principales productos de origen animal presentes en nuestra dieta, con un consumo en nuestro país de 6.130 millones de huevos en 2020 (Asociación española de productores de huevos, s.f), siendo un alimento muy completo con un gran contenido en macro y micronutrientes con una alta biodisponibilidad (Instituto del Huevo, s.f). Entre los micronutrientes presentes en la yema de huevo encontramos dos vitaminas liposolubles, la A y la E. El retinol (vitamina A) tiene una gran importancia al intervenir en la visión, en el desarrollo y en la reproducción (Dawson, 2000), mientras que bajo el nombre de vitamina E encontramos varios compuestos entre los que están el  $\alpha$ - y  $\gamma$ -tocoferol, que son antioxidantes que principalmente protegen los ácidos grasos polinsaturados presentes en las membranas (Mustacich, 2007).

El empleo del orujo como suplemento en la dieta nos permite reutilizar un residuo que de otra forma no tendría ningún uso y se acabaría almacenando y destruyendo, produciendo una gran cantidad de contaminación. Esta pérdida de nutrientes tiene una gran importancia en el sector agrícola, especialmente en la industria del vino donde se estima que un 20% del peso total de las uvas se convierte en orujo (Iuga, 2020). Debido a esto, organismos como la FAO promueven la reutilización y valorización de estos subproductos (FAO, 2011).

El objetivo principal de este proyecto de investigación consiste en evaluar si la incorporación de subproductos de la uva (orujo) en la dieta de gallinas ponedoras puede producir un enriquecimiento en antioxidantes del huevo, analizando su contenido en retinol y  $\alpha$ - y  $\gamma$ -tocoferol.

## **Material y Métodos**

### **Animales de experimentación**

Para la realización de este experimento se utilizaron 50 gallinas (*Gallus gallus domesticus*), 25 de la estirpe Isa Brown y 25 de la estirpe Leghorn, distribuidas en 10 jaulas divididas en dos naves (5 por nave), situadas en la Granja Docente de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid. Los animales se dispusieron cumpliendo el Real Decreto 3/2002.

Al inicio del experimento, los animales tenían una edad de 22 semanas y fueron divididos en dos grupos, control y experimental. El experimental fue alimentado con el pienso suplementado con un 5% de orujo que previamente había sido deshidratado y molido, mientras

que el grupo control fue alimentado con un pienso de composición similar al cual se le añadió un 2,5% de paja como fuente de fibra en lugar de orujo. El resto de componentes de la dieta se modificaron para que ambas tuviesen el mismo contenido en energía, proteína y fibra. El experimento duró seis semanas. Los huevos puestos en la última semana fueron recogidos y en ellos se midieron todos los parámetros de calidad. Las yemas fueron liofilizadas y congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis.

### **Técnicas analíticas**

#### **Parámetros de calidad**

Con el fin de realizar la medición de los parámetros de calidad los huevos fueron pesados y se utilizó un micrómetro para medir el espesor de la cáscara, que también fue pesada. La altura del albumen se cuantificó utilizando un micrómetro Haugh digital, para después calcular las unidades Haugh.

#### **Extracción de muestras**

La extracción del retinol y del  $\alpha$ - y  $\gamma$ -tocoferol se realizó siguiendo el protocolo indicado por *Claeys et al.* (Claeys, 2016). En un tubo ámbar se pesaron 200 mg de yema que se agitaron vigorosamente en 6ml etanol con 5g/l de ácido Ascórbico. Se incubó en un baño a  $78^{\circ}\text{C}$  durante 30min, posteriormente se añadió 1ml agua destilada y se incubó en un baño de hielo durante 15min. Después se centrifugó durante 5min a 1100g y se transfirió el sobrenadante a otro tubo ámbar. Se añadieron 2ml de KCl 57,7g/l y 2ml de hexano, conteniendo 0,02g/l de BHT. Se mezcló vigorosamente y se centrifugó durante 5 min a 720g. La fase de hexano se transfirió a otro tubo ámbar, repitiéndose este último paso para a continuación evaporar el pool de fases de hexano, con  $\text{N}_2$ . Por último, se disolvió el pellet en 2ml de metanol y se filtró a través de una membrana de  $0,2\mu\text{m}$ .

#### **Cuantificación de retinol y $\alpha$ - y $\gamma$ -tocoferol**

Para el análisis se empleó la técnica de HPLC en fase reversa utilizando una bomba Gilson 305 y una columna de cromatografía KromaPhase  $\text{C}_{18}$  de  $5\mu\text{m}$  (100mm x 4,6mm). La fase móvil fue metanol-agua 97:3 y las condiciones las siguientes: flujo de 1ml/min, presión de 0,78KPsi y temperatura de  $25^{\circ}$ . La absorbancia se registró a una longitud de onda de 292nm con un detector UV (Jasco UV-2075Plus). Para la estimación de la concentración se utilizaron estándares de retinol y  $\alpha$ - y  $\gamma$ -tocoferol (Sigma), todos a una concentración de  $25\mu\text{g/ml}$ .

#### **Análisis estadístico**

Para realizar el análisis de los datos se ha recurrido a un análisis de la varianza ANOVA de 2 factores (Tratamiento y Estirpe), habiendo verificado la homocedasticidad de los datos. Todos los resultados se expresaron en forma de la media  $\pm$  error estándar (SE). El grado de significación obtenido se representó en todas las tablas y gráficas como: \* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,001$ ). El análisis estadístico se realizó con Statgraphics18.

### **Resultados**

#### **Parámetros de calidad**

Como se puede observar en la tabla 1 se ha encontrado un efecto significativo del tratamiento sobre el peso de los huevos ( $P$ -valor $<0,05$ ). Por otra parte, también se ha observado un efecto significativo de la estirpe, siendo significativamente más altos el peso ( $p$ -valor $<0,001$ ), unidades Haugh ( $p$ -valor $<0,01$ ), peso cáscara ( $p$ -valor $<0,05$ ) y espesor cáscara ( $p$ -valor $<0,001$ ) de la estirpe Isa Brown.

Tabla 1. Efecto de la suplementación con orujo y de la estirpe sobre los parámetros de calidad.

	Leghorn		Isa Brown		P-valor		
	Control	Orujo	Control	Orujo	Tratamiento	Estirpe	Tratamiento*Estirpe
<b>Peso (g)</b>	59,06±0,74	62,14±1,64	64,49±0,94	67,13±1,39	<b>0,0256</b>	<b>0,0001</b>	0,8626
<b>Unidades Haugh</b>	95,42±1,01	94,85±1,30	98,32±1,03	99,40±0,45	0,8169	<b>0,0011</b>	0,4529
<b>Peso cáscara (g)</b>	6,24±0,11	6,43±0,14	6,51±0,10	6,86±0,97	0,0539	<b>0,0139</b>	0,5802
<b>Espesor cáscara (mm)</b>	0,36±0,01	0,37±0,1	0,38±0,01	0,40±0,01	0,0513	<b>0,0003</b>	0,5885

Todos los resultados se expresan como media ± error estándar, n=28-40.

### Cuantificación de $\alpha$ - y $\gamma$ -tocoferol y retinol

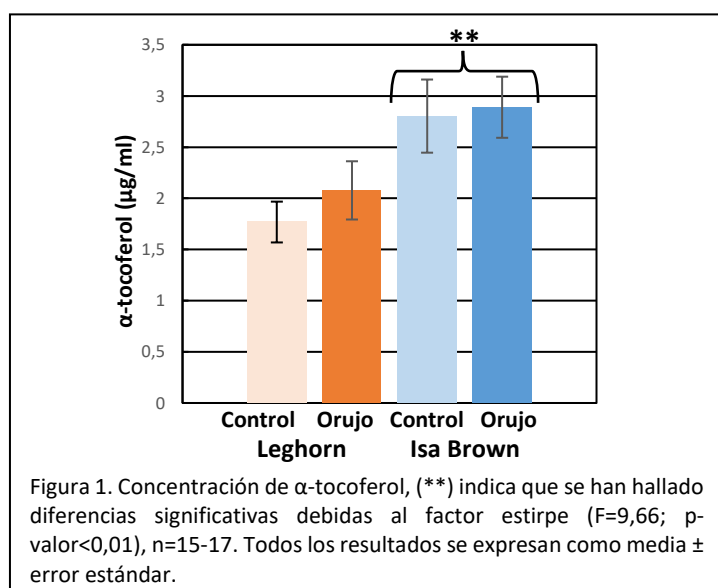


Figura 1. Concentración de  $\alpha$ -tocoferol, (\*\*) indica que se han hallado diferencias significativas debidas al factor estirpe (F=9,66; p-valor<0,01), n=15-17. Todos los resultados se expresan como media ± error estándar.

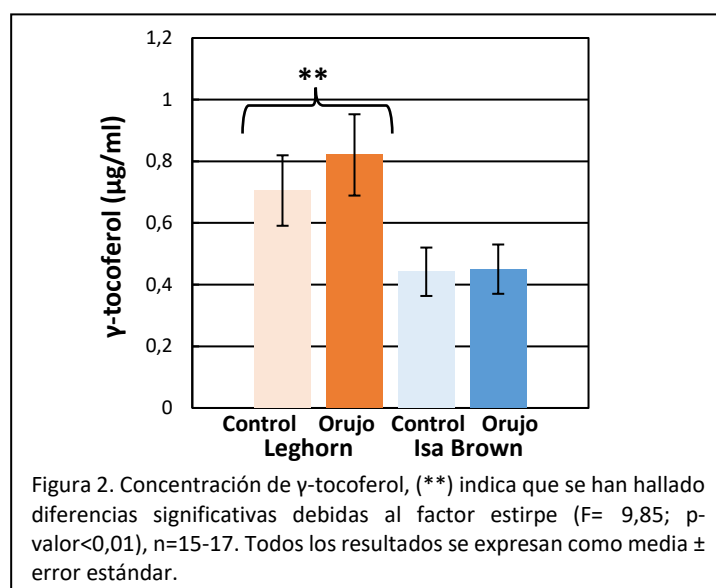


Figura 2. Concentración de  $\gamma$ -tocoferol, (\*\*) indica que se han hallado diferencias significativas debidas al factor estirpe (F= 9,85; p-valor<0,01), n=15-17. Todos los resultados se expresan como media ± error estándar.

Con respecto al  $\alpha$ -tocoferol, como se observa en la figura 1, no se ha encontrado un efecto significativo de la suplementación, mientras que sí que se ha observado un efecto significativo de la estirpe (p-valor<0,01), teniendo los huevos de la estirpe Isa Brown un mayor contenido de  $\alpha$ -tocoferol. No se observaron diferencias significativas con respecto al  $\gamma$ -tocoferol entre ambos grupos experimentales. Sin embargo, como se puede apreciar en la figura 2, la estirpe tiene un efecto significativo (p-valor<0,01) sobre el contenido de  $\gamma$ -tocoferol, teniendo valores mayores las yemas de huevos de la estirpe Leghorn.

Con respecto al retinol (datos no mostrados), no se han encontrado diferencias significativas entre los grupos experimentales debidas a la dieta (F=1,76; p-valor=0,1952), ni diferencias en el contenido de retinol debidas a la estirpe (F=0,32; p-valor=0,5732).

### Discusión

En este estudio se ha descrito por primera vez el efecto de la suplementación con orujo en la dieta de gallinas ponedoras sobre el contenido de  $\alpha$ - y  $\gamma$ -tocoferol y retinol en huevo. Se midieron también los parámetros de calidad, que se han visto afectados principalmente por el factor estirpe y por el tratamiento, teniendo mayor peso los huevos de gallinas alimentadas con el pienso suplementado. Este resultado difiere del estudio llevado a cabo por Romero et al. (Romero, 2022) donde se observó que la adición de orujo (con 1g/kg de extracto de uva y 30g/kg y 60g/kg de orujo) disminuía el peso de los huevos. Las diferencias entre resultados pueden deberse a la cantidad de orujo ingerida, ya que también se vio que existe una reducción en la

digestibilidad proteica, que tiene una relación directamente proporcional al tamaño de los huevos (Shim, 2013). Además, podemos ver que la estirpe ha tenido un efecto significativo, presentando los huevos puestos por la estirpe Isa Brown valores mayores que la Leghorn en todos los parámetros de calidad. Este resultado coincide con lo visto por Hanusová et al. (Hanusová, 2015), que describieron como los huevos de la estirpe Rhode Island Red, que al igual que los de la estirpe Isa Brown son morenos. También tenían un mayor tamaño, un mayor peso y espesor de la cáscara y un valor más alto de unidades Haugh, asociadas a una mayor frescura y calidad proteínica del huevo, que los huevos de la estirpe Oravka, que produce huevos blancos. Este efecto significativo de la estirpe se debe principalmente a factores genéticos (Biesiada-Drzazga, 2020).

Con respecto al contenido de  $\alpha$ -tocoferol en el huevo el tratamiento tampoco ha tenido un efecto significativo, pese a que sí que se haya descrito en otros trabajos un aumento en su contenido en plasma y en la carne (Romero, 2021). Al contrario, sí que se han observado diferencias significativas debidas al factor estirpe, teniendo mayor concentración los huevos de la estirpe Isa Brown. En cuanto al contenido de  $\gamma$ -tocoferol se puede observar que el tratamiento tampoco ha tenido un efecto significativo, mientras que en este caso son los huevos de la estirpe Leghorn los que presentan mayor contenido de  $\gamma$ -tocoferol. Otros trabajos han encontrado diferencias en el contenido de tocoferoles en el huevo, pero estos presentan diferencias que no hacen posible una comparación. Un ejemplo de esto es el trabajo de Skřivan et al. (Skřivan, 2019), en el que se describió un aumento de la concentración de  $\alpha$ - y  $\gamma$ -tocoferol al suplementar la dieta con aceite de semillas de cáñamo (*Cannabis sativa*) y colza (*Brassica napus*). Esta diferencia en el contenido de tocoferol puede deberse principalmente a que el contenido en polifenoles en el orujo no es suficiente para inducir estos cambios. También se debe considerar que hay un efecto compensatorio entre oxidantes homeostáticos (López-Torres, 1991), esto es importante porque los polifenoles presentes en el orujo también presentan un efecto antioxidante (Chamorro, 2015) y pueden contribuir al desajuste de antioxidantes. Por lo que en el futuro sería interesante poder realizar más mediciones de otros antioxidantes presentes en el huevo para determinar cual es el estado general.

El efecto de la estirpe en ambos tocoferoles al igual que con los parámetros de calidad puede deberse a principalmente a factores genéticos, ya que ambas estirpes han tenido la misma alimentación.

Al comparar el contenido de  $\alpha$ - y  $\gamma$ -tocoferol se puede observar que hay un contenido medio mucho mayor de  $\alpha$ -tocoferol en las yemas, pese a que en su dieta las gallinas consumen principalmente  $\gamma$ -tocoferol, el cual se encuentra presente en cereales y semillas. Esto se debe a que el ovocito tiene preferencia por el  $\alpha$ -tocoferol ya que es el tocoferol con mayor actividad biológica (Bunea, 2017).

En relación con el retinol, no se ha hallado un efecto significativo de ninguno de los dos factores. Estos resultados pueden deberse a que el orujo no posee una cantidad suficiente de carotenoides y se ha observado que el contenido de carotenoides en la dieta determina la cantidad de retinol presente en los huevos (Mendonca, 2002). Esta influencia de la dieta es visible cuando la suplementación tiene un mayor contenido de carotenoides (Rey, 2021).

Cabe destacar que la suplementación con orujo en la dieta no ha tenido efectos negativos ya que no ha disminuido la calidad ni el contenido de retinol y de  $\alpha$ - y  $\gamma$ -tocoferol. Esto

hace que el orujo sea una buena opción como suplemento en la dieta de las gallinas, siendo posible emplear un residuo que de otra forma tendría que ser destruido, favoreciendo así la economía circular y disminuyendo la pérdida de nutrientes.

### Conclusiones

En conclusión, la estirpe de gallina es un factor que determina la calidad y composición de los huevos y la suplementación con orujo no tiene un efecto negativo sobre la calidad y el contenido de retinol ni de  $\alpha$ - y  $\gamma$ -tocoferol. Esta ausencia de efectos negativos permite emplearlo como suplemento de bajo coste, que es una fuente de fibra y polifenoles, logrando así eliminar un residuo muy abundante, favoreciendo la economía circular.

### Bibliografía

- Asociación española de productores de huevos (s.f). *El sector español del huevo*. <https://www.aseprhu.es/>
- Biesiada-Drzazga, B., Banaszewska, D., Wielogórska, K. & Kaim-Mirowski, S. (2020). The effect of the genetic origin of hens on selected egg traits. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, 19(1), 101–107.
- Bunea, A., Copaciu, F. M., Paşcalău, S., Dulf, F., Rugină, D., Chira, R. & Pinte, A. (2017). Chromatographic analysis of lipophilic compounds in eggs from organically fed hens. *The Journal of Applied Poultry Research*, 26(4), 498–508.
- Chamorro, S., Viveros, A., Rebolé, A., Rica, B., Arija, I., & Brenes, A. (2015). Influence of dietary enzyme addition on polyphenol utilization and meat lipid oxidation of chicks fed grape pomace. *Food Research International*, 73, 197-203.
- Claeys, E., Vossen, E. & De Smet, S. (2016). Determination of  $\alpha$ -tocopherol by reversed-phase HPLC in feed and animal-derived foods without saponification. *J Sci Food Agric*. 2016 Jan 30;96(2):522-9.
- Dawson, MI. (2000). The importance of vitamin A in nutrition. *Curr Pharm Des*. 2000 Feb;6(3):311-25.
- FAO. (2011) *Global Food Losses and Food Waste-Extent, Causes and Prevention*; FAO: Rome, Italy; pp. 1–37.
- Hanusová, E., Hrnčár, C., Hanus, A. & Oravcová, M. (2015). Effect of breed on some parameters of egg quality in laying hens. *Acta fytotechn. zootechn.*, 18, 2015(1): 20–24.
- Instituto del Huevo. (s.f.). Composición nutricional del huevo. <https://www.institutohuevo.com>
- Iuga, M. & Mironeasa, S. (2020). Potential of grape byproducts as functional ingredients in baked goods and pasta. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2020 Sep;19(5):2473-2505. doi: 10.1111/1541-4337.12597
- López-Torres M., Pérez-Campo R. & Barja de Quiroga G. (1991). Effect of natural ageing and antioxidant inhibition on liver antioxidant enzymes, glutathione system, peroxidation, and oxygen consumption in *Rana perezi*. *J Comp Physiol*. 160(6):655-61. doi: 10.1007/BF00571264
- Meluzzi A., Sirri F., Manfreda G., Tallarico N. & Franchini A. (2000). Effects of dietary vitamin E on the quality of table eggs enriched with n-3 long-chain fatty acids. *Poult Sci*. 2000 Apr;79(4):539-45.
- Mendonca, C. X., Almeida, C. R. M., Mori, A. V. & Watanabe, C. (2002). Effect of Dietary Vitamin A on Egg Yolk Retinol and Tocopherol Levels. *The Journal of Applied Poultry Research*, 11(4), 373–378.
- Mustacich, DJ., Bruno, RS. & Traber, MG. (2007). Vitamin E. *Vitam Horm*. 76:1-21. d
- Nardoia, M., Ruiz-Capillas, C., Casamassima, D. et al. (2018). Effect of polyphenols dietary grape by-products on chicken patties. *Eur Food Res Technol* 244, 367–377.
- Organización internacional de la viña y el vino (s.f.). *Estadísticas de los países: España (2021)*. <https://www.oiv.int>
- Rey, A.I., de-Cara, A., Rebolé, A. & Arija, I. (2021). Short-Term Spirulina (*Spirulina platensis*) Supplementation and Laying Hen Strain Effects on Eggs' Lipid Profile and Stability. *Animals* 2021, 11, 1944.
- Romero, C.; Arija, I.; Viveros, A.; Chamorro, S. (2022). Productive Performance, Egg Quality and Yolk Lipid Oxidation in Laying Hens Fed Diets including Grape Pomace or Grape Extract. *Animals* 2022, 12, 1076.
- Romero, C., Nardoia, M., Arija, I., Viveros, A., Rey, AI., Prodanov, M. & Chamorro, S. (2021). Feeding Broiler Chickens with Grape Seed and Skin Meals to Enhance  $\alpha$ - and  $\gamma$ -Tocopherol Content and Meat Oxidative Stability. *Antioxidants* (Basel). 2021 Apr 28;10(5):699. doi: 10.3390/antiox10050699
- Shim, MY., Song, E., Billard, L., Aggrey, SE., Pesti, GM & Sodsee, P. (2013). Effects of balanced dietary protein levels on egg production and egg quality parameters of individual commercial layers. *Poult Sci*. 2013 Oct;92(10):2687-96.
- Skřivan M, Englmaierová M, Vít T, Skřivanová E (2019) Hempseed increases gammatocopherol in egg yolks and the breaking strength of tibias in laying hens. *PLoS ONE* 14(5): e0217509.
- Xia, EQ., Deng, GF., Guo, YJ. & Li, HB. (2010). Biological activities of polyphenols from grapes. *Int J Mol Sci*. 11(2):62.

**77003: Dinámica estacional y transmisión de Leishmania infantum de la subfamilia Phlebotominae en el parque zoológico Faunia / Seasonal dynamics and Leishmania infantum transmission of the subfamily Phlebotominae in Faunia zoological park****Área de conocimiento:** BIOLOGÍA**Autor(es):** Eva Ruano Romero**Tutor(es):** Ana Montoya Matute, Rosa Gálvez Esteban**Universidad:** Universidad Complutense de Madrid**Facultad:** Facultad de Ciencias Biológicas**Titulación:** Grado en Biología**Formato:** Comunicación Oral - Investigación básica**Palabras Clave:** Flebotomos, zoológico, leishmaniosis, fenología, variables climáticas / Sandflies, zoo, leishmaniasis, phenology, climatic variables

En España, la leishmaniosis es una enfermedad zoonótica endémica causada por el protozoo *Leishmania infantum* y transmitida por flebotomos, pudiendo afectar a diversos vertebrados como el perro y el ser humano, entre otros hospedadores. Estudios previos han demostrado la presencia de infección por *L. infantum* en animales cautivos de parques zoológicos, como en Faunia. Por tanto, surge la necesidad de llevar a cabo investigaciones entomológicas para determinar la presencia de flebotomos, estudiar la influencia de los factores climáticos en su distribución y detectar al parásito con el fin de obtener información sobre el riesgo de infección por *L. infantum* en dichas áreas. Este estudio se realizó durante dos años consecutivos en el parque zoológico Faunia en los periodos de máxima actividad de los flebotomos. El método de captura empleado fue mediante trampas de ricino, y su posterior identificación se realizó mediante claves dicotómicas. Asimismo, se registraron las variables macro y microclimáticas los días de colocación y retirada de las trampas. Además, en las hembras de *Phlebotomus perniciosus* capturadas se procedió a la búsqueda de ADN de *L. infantum* mediante técnicas de diagnóstico molecular. Los resultados demostraron la presencia de flebotomos en el parque, principalmente las especies *P. perniciosus* y *Sergentomyia minuta*, estando su distribución influenciada en diferente medida por la temperatura, la humedad y la precipitación. Además, se detectó la presencia de *L. infantum* y ADN de mamífero en las hembras de *P. perniciosus*, poniendo de manifiesto la existencia de un riesgo de transmisión del parásito a los animales cautivos del parque zoológico, siendo necesarias pruebas de identificación de las preferencias alimenticias de los flebotomos para determinar los animales que presentan un mayor riesgo de infección.

In Spain, leishmaniasis is an endemic zoonotic disease caused by the protozoan *Leishmania infantum* and transmitted by phlebotomine sandflies, which can affect various vertebrates such as dogs and humans, among other hosts. Previous studies have demonstrated the presence of *L. infantum* infection in captive animals in zoos, such as Faunia. Therefore, the need to carry out entomological investigations arises to determine the presence of phlebotomine sandflies, to study the influence of climatic factors on their distribution and to detect the parasite in order to obtain information about the risk of *L. infantum* infection in these areas. This study was carried out during two consecutive years in Faunia zoological park during the periods of maximum phlebotomine sandfly activity. The capture method used was castor oil traps, and subsequent identification was carried out using dichotomous identification keys. Macroclimatic and microclimatic variables were also recorded on the days the traps were set and removed. In addition, captured *Phlebotomus perniciosus* females were searched for *L. infantum* DNA using molecular diagnostic techniques. The results showed the presence of phlebotomine sandflies in the zoo, mainly the species *P. perniciosus* and *Sergentomyia minuta*, their distribution being influenced to different extents by temperature, humidity and precipitation. In addition, the presence of *L. infantum* and mammalian DNA was detected in *P. perniciosus* females, indicating a risk of parasite transmission to captive animals in the zoo, and tests to identify the feeding preferences of phlebotomine sandflies are needed to determine which animals are at highest risk of infection.

## **Dinámica estacional y transmisión de *Leishmania infantum* de la subfamilia Phlebotominae en el parque zoológico Faunia**

### **Seasonal dynamics and *Leishmania infantum* transmission of the subfamily Phlebotominae in Faunia zoological park**

**Autor:** Nº Identificador 1474914, Eva Ruano Romero, evaruano@ucm.es

**Tutor 1:** Ana Montoya Matute, amontoya@ucm.es

**Tutor 2:** Rosa Gálvez Esteban, rosa.galvez@uam.es

**Afiliaciones:** Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid.

#### **RESUMEN**

En España, la leishmaniosis es una enfermedad zoonótica endémica causada por el protozoo *Leishmania infantum* y transmitida por flebotomos, pudiendo afectar a diversos vertebrados como el perro y el ser humano, entre otros hospedadores. Estudios previos han demostrado la presencia de infección por *L. infantum* en animales cautivos de parques zoológicos, como en Faunia. Por tanto, surge la necesidad de llevar a cabo investigaciones entomológicas para determinar la presencia de flebotomos, estudiar la influencia de los factores climáticos en su distribución y detectar al parásito con el fin de obtener información sobre el riesgo de infección por *L. infantum* en dichas áreas. Este estudio se realizó durante dos años consecutivos en el parque zoológico Faunia en los periodos de máxima actividad de los flebotomos. El método de captura empleado fue mediante trampas de ricino, y su posterior identificación se realizó mediante claves dicotómicas. Asimismo, se registraron las variables macro y microclimáticas los días de colocación y retirada de las trampas. Además, en las hembras de *Phlebotomus perniciosus* capturadas se procedió a la búsqueda de ADN de *L. infantum* mediante técnicas de diagnóstico molecular. Los resultados demostraron la presencia de flebotomos en el parque, principalmente las especies *P. perniciosus* y *Sergentomyia minuta*, estando su distribución influenciada en diferente medida por la temperatura, la humedad y la precipitación. Además, se detectó la presencia de *L. infantum* y ADN de mamífero en las hembras de *P. perniciosus*, poniendo de manifiesto la existencia de un riesgo de transmisión del parásito a los animales cautivos del parque zoológico, siendo necesarias pruebas de identificación de las preferencias alimenticias de los flebotomos para determinar los animales que presentan un mayor riesgo de infección.

**Palabras clave:** Flebotomos, zoológico, leishmaniosis, fenología, variables climáticas

#### **ABSTRACT**

In Spain, leishmaniasis is an endemic zoonotic disease caused by the protozoan *Leishmania infantum* and transmitted by phlebotomine sandflies, which can affect various vertebrates such as dogs and humans, among other hosts. Previous studies have demonstrated the presence of *L. infantum* infection in captive animals in zoos, such as Faunia. Therefore, the need to carry out entomological investigations arises to determine the presence of phlebotomine sandflies, to study the influence of climatic factors on their distribution and to detect the parasite in order to



obtain information about the risk of *L. infantum* infection in these areas. This study was carried out during two consecutive years in Faunia zoological park during the periods of maximum phlebotomine sandfly activity. The capture method used was castor oil traps, and subsequent identification was carried out using dichotomous identification keys. Macroclimatic and microclimatic variables were also recorded on the days the traps were set and removed. In addition, captured *Phlebotomus perniciosus* females were searched for *L. infantum* DNA using molecular diagnostic techniques. The results showed the presence of phlebotomine sandflies in the zoo, mainly the species *P. perniciosus* and *Sergentomyia minuta*, their distribution being influenced to different extents by temperature, humidity and precipitation. In addition, the presence of *L. infantum* and mammalian DNA was detected in *P. perniciosus* females, indicating a risk of parasite transmission to captive animals in the zoo, and tests to identify the feeding preferences of phlebotomine sandflies are needed to determine which animals are at highest risk of infection.

**Keywords:** Sandflies, zoo, leishmaniasis, phenology, climatic variables

## INTRODUCCIÓN

La leishmaniosis es un grupo de enfermedades parasitarias causadas por especies del género *Leishmania*, transmitidos por la picadura de hembras de flebotomos infectados, pudiendo afectar tanto al ser humano como a otros vertebrados (Gálvez Esteban, 2010). En España la leishmaniosis es una zoonosis endémica causada por la especie *Leishmania infantum*, siendo las especies *Phlebotomus perniciosus* y *P. ariasi* vectores competentes (Risueño et al., 2017). *Sergentomyia minuta* es una especie de flebótomo muy abundante en la región con preferencias de alimentación herpetófila (Gálvez et al., 2010) que últimamente ha sido objeto de investigaciones sobre su papel vectorial (Maia & Depaquit, 2016).

En animales de parques zoológicos de Madrid se han registrado diversos casos de infección por *L. infantum*, en Faunia en el año 2011 el primer caso mortal de leishmaniosis adquirida de forma autóctona en un wallaby de Bennet (*Macropus rufogriseus rufogriseus*) (Montoya et al., 2016), y en el año 2018, se detectaron dos casos en orangutanes (*Pongo pygmaeus pygmaeus*) en el centro de rescate de primates Rainfer y el Zoo Aquarium de Madrid (Miró et al., 2018). Así, el registro de casos de leishmaniosis en animales cautivos impulsa la realización de este estudio en el parque zoológico Faunia, cuyo objetivo principal es la captura de flebotomos durante el periodo estival para el control y vigilancia del vector, así como la evaluación del riesgo de transmisión del parásito a los animales del parque.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio entomológico de flebotomos en Faunia mediante trampas de aceite de ricino colocadas durante cuatro días. Cada diez días se realizaba un nuevo muestreo durante los periodos de junio a octubre en 2020 y de mayo a septiembre en 2021. La selección de los sitios de muestreo se basó en hábitats donde se alojaban animales que habían registrado casos de leishmaniosis y cuyos módulos reunían condiciones propicias para la presencia de flebotomos (humedad y temperatura constantes, presencia de materia orgánica).

Para el estudio de fenología se recabaron datos climáticos registrados los días de muestreo, a nivel de microclima (temperatura y humedad relativa) mediante el uso de un termohigrómetro, y a nivel de macroclima (temperatura media, mínima y máxima, precipitación, viento, presión barométrica y humedad relativa) mediante la consulta del registro histórico de la estación meteorológica de la Junta Municipal del Distrito de Moratalaz (Ayuntamiento de Madrid, 2021).

Las trampas recogidas se procesaron en el laboratorio del Dpto. de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria (UCM). Los flebotomos capturados en las trampas se recogieron con un pincel, sumergiéndolos en alcohol 70° para disolver el aceite y proceder a su conservación. La identificación de sexo y especie se realizó con claves de identificación que atienden a las características anatómicas de la genitalia. Primero se identificó el sexo de los individuos, mediante la observación de la apariencia externa de la genitalia, y después la especie. Los machos se montaron enteros en preparaciones con líquido de Hoyer, y en las hembras se separó la genitalia con agujas entomológicas, siendo aclaradas con el líquido Marc André; el resto del abdomen se almacenó en alcohol 70°.

Para la detección de ADN de *Leishmania* se realizó una extracción de ADN del abdomen de las hembras de *P. perniciosus* con el kit comercial mini kit de QUIAGEN®. A continuación, se

realizó la técnica de PCR en tiempo real que permite en la misma reacción de amplificación la detección de ADN de *L. infantum* y ADN de mamífero (protocolo pendiente de publicación).

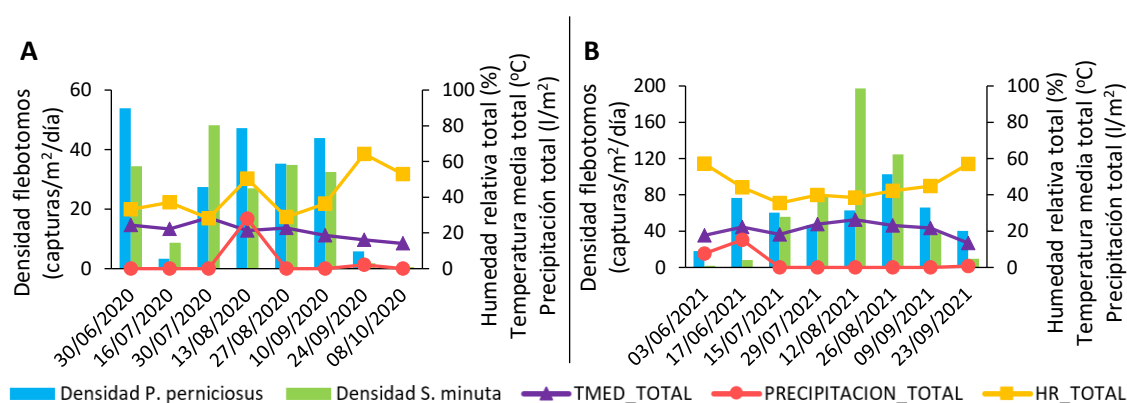
Los datos obtenidos se recogieron en una tabla de Excel, y de cada lugar de muestreo se estimó la densidad total y de cada especie de flebotomos mediante la fórmula descrita, en la que la superficie de trampa corresponde al área de un papel de tamaño DIN A5 por las dos caras. El test de Kruskal-Wallis determinó la posible relación entre las densidades de flebotomos y los hábitats donde se colocan las trampas, y el coeficiente de correlación de Spearman la relación entre las densidades y las variables climáticas, considerándose estadísticamente significativo un valor de *p* menor o igual a 0,05.

$$\text{Densidad de flebotomos por m}^2 = \frac{\text{N}^\circ \text{ de flebotomos capturados}}{\text{N}^\circ \text{ de trampas} \cdot \text{Superficie trampa} \cdot \text{N}^\circ \text{ días de muestreo}}$$

## RESULTADOS

Durante el periodo de estudio se colocaron un total de 662 trampas de ricino, 241 en el año 2020 y 421 en el año 2021, de las cuales se recuperaron 599 trampas. Se capturaron 1044 flebotomos que se identificaron como *P. perniciosus* (n=527; 50,5%), *Sergentomyia minuta* (n=516; 49,4%) y *P. papatasi* (n=1; 0,1%). En cuanto a la distribución por sexos, 183 (17,5%) fueron hembras y 861 machos (82,5%); contabilizándose de *P. perniciosus* 46 hembras (4,4%) y 481 machos (46,1%), de *S. minuta* 137 hembras (13,1%) y 379 machos (36,6%), y el único ejemplar de *P. papatasi* se identificó como un macho (0,1%).

La **fenología** en el año 2020 estuvo marcada por fluctuaciones en la densidad de *P. perniciosus* y *S. minuta* en los meses de muestreo, destacando el descenso de ambas especies a mediados de julio y en la etapa final del muestreo (Figura 1-A). En el año 2021 la densidad de capturas fue mayor, observándose una distribución estacional bifásica con dos máximos de densidad para *P. perniciosus*, a mediados de junio y a finales de agosto, mientras que *S. minuta* presentó una distribución monofásica, siendo la densidad máxima a mediados de agosto (197,43 capturas/m<sup>2</sup>/día) (Figura 1-B).



**Figura 1.** Densidad de *P. perniciosus* y *S. minuta* (capturas/m<sup>2</sup>/día), humedad relativa (HR\_TOTAL) (%), temperatura media (TMED\_TOTAL) (°C) y precipitación total (l/m<sup>2</sup>) en 2020 (A) y 2021 (B).

La densidad media de flebotomos capturados según el **hábitat** se refleja en la Tabla 1, siendo la presencia de *P. perniciosus* significativamente más elevada (*p*=0,0002) en la zona de lémures y kinkajou, y menos abundante en suricatas y wallabies.

Hábitat de captura	<i>P. perniciosus</i>	<i>S. minuta</i>	Total flebotomos
Canguros	7,096	2,664	9,792
Cobayas	2,004	0,000	2,004
Kinkajou	8,239**	29,394	37,634
Lémures	9,019**	2,004	11,023
Maras	4,621	1,67	6,291
Ocelotes	7,794	7,349	15,143
Suricatas	0,428*	4,748	5,176
Wallabies	1,802*	3,946	5,748
Valor de <i>p</i>	0,0002	0,414	0,072

**Tabla 1.** Densidad media (capturas/m<sup>2</sup>/día) de los flebotomos en cada hábitat muestreado del parque. Los símbolos \* y \*\* indican que el valor de densidad es bajo y alto, respectivamente.

Respecto a las **variables climáticas**, a nivel de micro y macroclima, la temperatura guardó una correlación positiva con la densidad total de flebotomos y de cada especie, sucediendo lo mismo con la humedad relativa y precipitación, solo que afectando negativamente a todos excepto a *P. perniciosus*. En cuanto al viento total solo influyó negativamente a la densidad de *S. minuta*, y la variable la presión barométrica no resultó significativa al ser el *p*-valor mayor de 0,05.

Variable climática		<i>P. perniciosus</i>	<i>S. minuta</i>	Total flebotomos	Coeficiente de correlación
Microclimática	Temperatura	0,19**	0,324**	0,317**	
	Humedad relativa	-0,037	-0,263*	-0,186*	
Macroclimática	Temperatura media total	0,186**	0,39**	0,329**	
	Precipitación total	-0,079	-0,347*	-0,196*	
	Viento total	-0,024	-0,211*	-0,099	
	Presión barométrica total	-0,028	0,081	-0,004	
	Humedad relativa total	-0,123	-0,43*	-0,3*	

**Tabla 2.** Correlación de las variables climáticas y la densidad de flebotomos. Las celdas sombreadas indican un valor de  $p < 0,05$ . Los símbolos \* y \*\* indican una correlación negativa y positiva, respectivamente.

Los resultados de **PCR a tiempo real** indicaron que de las 36 hembras de *P. perniciosus* analizadas 27 hembras (75%), entre las que había cinco alimentadas y tres grávidas, se habían alimentado sobre mamíferos, y en 12 hembras (33,3%), capturadas en los hábitats de canguros, ocelotes y lémures, se detectó la presencia de ADN de *L. infantum*, resultando nueve hembras (25%) positivas en ambas pruebas, entre ellas una alimentada.

## DISCUSIÓN

Los resultados del estudio señalan que en el parque zoológico Faunia las especies de flebotomos más abundantes son, en este orden, *P. perniciosus*, *S. minuta* y *P. papatasi*; estos datos coinciden con los reflejados por investigaciones anteriormente realizadas en la zona sur de Madrid (González et al., 2017). Respecto a la distribución por sexos, la proporción de hembras capturadas fue inferior a la de machos, lo que puede ser debido a que las trampas utilizadas (trampas adhesivas) atraen una mayor proporción de machos del género *Phlebotomus* debido a su comportamiento sexual (Elnaiem et al., 2020).

La fenología observada en el año 2021 muestra las fluctuaciones poblacionales anuales descritas de las especies *P. perniciosus* y *S. minuta* en España, una distribución bifásica y

monofásica, respectivamente (Gil Collado et al., 1989), con valores máximos de abundancia en el mes de agosto, lo cual puede deberse a que dicho mes presentó la mayor temperatura media, factor que favorece la proliferación de los flebotomos (Gálvez Esteban, 2010). Y, es que la temperatura influye positivamente en la densidad de flebotomos, mientras que la humedad relativa y la precipitación de forma negativa, como indican estudios previos realizados en la península (Gálvez et al., 2010; Ballart et al., 2014). No obstante, en nuestro estudio la densidad de *P. perniciosus* sólo mostró asociación con la temperatura, lo cual puede deberse a la capacidad de adaptación de esta especie a los cambios ambientales. El viento se considera uno de los principales factores limitantes de la actividad de los flebotomos (Gil Collado et al., 1989), pero en el presente estudio solo afectó a la densidad de *S. minuta*, lo que puede ser debido a que la actividad de esta especie tiene lugar, principalmente, en lugares resguardados que se ven más alterados por las rachas de viento (Risueño et al., 2017), y que no afecte a *P. perniciosus* puede deberse a la velocidad del viento, pues se ha demostrado que cuando es inferior de 3 m/s no supone un problema para el desplazamiento de los flebotomos (Lladó Villalonga & Rotger Sureda, 1990), siendo en nuestro estudio los valores registrados no superiores a 3 m/s.

La especie *P. perniciosus* fue la única cuya densidad media ha mostrado una relación con los hábitats de captura muestreados dentro del parque, lo que confirma que esta especie tiende a agregarse en instalaciones de animales y zonas cercanas a las mismas (Muñoz et al., 2018).

Los resultados del diagnóstico molecular indican la presencia de ADN de mamífero y de *L. infantum* en el 75% y 33% de las 36 hembras de *P. perniciosus* analizadas. Sin embargo, con estos resultados no podemos aseverar que se hayan alimentado sobre mamíferos de Faunia, pues en el parque los animales se encuentran en entornos cercanos y el alcance de vuelo medio de los flebotomos es de 200-400m de media (Gálvez Esteban, 2010), por lo que podrían desplazarse hasta otros módulos para alimentarse, además de que en algunos casos comparten módulos más de un tipo de animal, quedando pendiente la realización de pruebas de secuenciación específicas para determinar sobre qué animales se han alimentado. Sin embargo, la detección de hembras infectadas, y especialmente infectadas y alimentadas, indican la existencia de un riesgo de transmisión local del parásito a los animales cautivos del parque zoológico, resaltando la importancia en la detección y control de las poblaciones de flebotomos.

## CONCLUSIONES

Los resultados del estudio confirman la presencia de flebotomos en el parque zoológico Faunia, siendo *P. perniciosus* la especie más abundante, seguida por *S. minuta*. Asimismo, se confirma la presencia de ADN de *L. infantum* en hembras de *P. perniciosus* capturadas en Faunia, siendo necesarios futuros estudios para conocer las preferencias tróficas de los flebotomos en estos núcleos zoológicos.

## BIBLIOGRAFÍA

Ayuntamiento de Madrid. (2021). *Datos meteorológicos. Estaciones de control*. <https://datos.madrid.es/portal/site/egob/menuitem.c05c1f754a33a9f9be4b2e4b284f1a5a0/?vgnextoid=8d7357cec5efa610VgnVCM1000001d4a900aRCRD&vgnnextchannel=374512b9ace9f310VgnVCM100000171f5a0aRCRD&vgnnextfmt=default>

Ballart, C., Guerrero, I., Castells, X., Baròn, S., Castillejo, S., Alcover, M. M., Portús, M., & Gállego, M. (2014). Importance of individual analysis of environmental and climatic factors

affecting the density of *Leishmania* vectors living in the same geographical area: The example of *Phlebotomus ariasi* and *P. perniciosus* in northeast Spain. *Geospatial Health*, 8(2), Article 2. <https://doi.org/10.4081/gh.2014.28>

Elnaiem, D.-E., Khogali, A., Alsharif, B., Dakein, O., Jibreel, T., Hassan, M., Edries, H. H., Elhadi, H., Elnur, B., Osman, O. F., Boer, M. den, Alvar, J., & Khalid, N. M. (2020). Understanding sand fly sampling methods: Sticky traps are attraction-based and not interceptive sampling tools of *Phlebotomus orientalis*. *Parasites & Vectors*, 13(1), 389. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04249-1>

Gálvez Esteban, R. (2010). *Factores que influyen sobre la epidemiología de la leishmaniosis canina y sus vectores en la Comunidad de Madrid: Obtención de modelos predictivos de riesgo mediante sistemas de información geográfica* [Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid]. <https://doi.org/10.1/T32606.pdf>

Gálvez, R., Descalzo, M. A., Miró, G., Jiménez, M. I., Martín, O., Dos Santos-Brandao, F., Guerrero, I., Cubero, E., & Molina, R. (2010). Seasonal trends and spatial relations between environmental/meteorological factors and leishmaniosis sand fly vector abundances in Central Spain. *Acta Tropica*, 115(1-2), 95-102. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.02.009>

Gil Collado, J., Morillas Márquez, F., & Sanchis Marín, M. (1989). Los flebotomos en España. *Revista de sanidad e higiene pública*, 63(5-6), 15-34.

González, E., Jiménez, M., Hernández, S., Martín-Martín, I., & Molina, R. (2017). Phlebotomine sand fly survey in the focus of leishmaniasis in Madrid, Spain (2012–2014): Seasonal dynamics, *Leishmania infantum* infection rates and blood meal preferences. *Parasites & Vectors*, 10(1), 368. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2309-z>

Lladó Villalonga, T., & Rotger Sureda, M. J. (1990). *Estudio del flebotomo como vector de la leishmaniasis en la isla de Mallorca*. Conselleria de Sanitat i Seguretat Social.

Maia, C., & Depaquit, J. (2016). Can *Sergentomyia* (Diptera, Psychodidae) play a role in the transmission of mammal-infecting *Leishmania*? *Parasite*, 23, 55. <https://doi.org/10.1051/parasite/2016062>

Miró, G., Troyano, A., Montoya, A., Fariñas, F., Fermín, M. L., Flores, L., Rojo, C., Checa, R., Gálvez, R., Marino, V., Fragío, C., & Martínez-Nevado, E. (2018). First report of *Leishmania infantum* infection in the endangered orangutan (*Pongo pygmaeus pygmaeus*) in Madrid, Spain. *Parasites & Vectors*, 11(1), 1-7. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2772-1>

Montoya, A., de Quadros, L. P., Mateo, M., Hernández, L., Gálvez, R., Alcántara, G., Checa, R., Jiménez, M. Á., Chicharro, C., Cruz, I., & Miró, G. (2016). *Leishmania infantum* infection in Bennett's wallabies (*Macropus rufogriseus rufogriseus*) in a Spanish wildlife park. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 47(2), 586-593. <https://doi.org/10.1638/2014-0216.1>

Muñoz, C., Risueño, J., Yilmaz, A., Pérez-Cutillas, P., Goyena, E., Ortuño, M., Bernal, L. J., Ortiz, J., Alten, B., & Berriatua, E. (2018). Investigations of *Phlebotomus perniciosus* sand flies in rural Spain reveal strongly aggregated and gender-specific spatial distributions and advocate use of light-attraction traps. *Medical and Veterinary Entomology*, 32(2), 186-196. <https://doi.org/10.1111/mve.12275>

Risueño, J., Muñoz, C., Pérez-Cutillas, P., Goyena, E., González, M., Ortuño, M., Bernal, L. J., Ortiz, J., Alten, B., & Berriatua, E. (2017). Understanding *Phlebotomus perniciosus* abundance in south-east Spain: Assessing the role of environmental and anthropic factors. *Parasites & Vectors*, 10(1), 189. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2135-3>

**77030: Enfermedad renal crónica: modalidades y tratamientos en el desarrollo de un fenotipo secretor senescente (SASP). Chronic kidney disease: modalities and treatments in the development of a senescent secretory phenotype (SASP).****Área de conocimiento:** BIOLOGÍA**Autor(es):** Gabriela Ortiz Díaz**Tutor(es):** Julia María Carracedo Añón**Universidad:** Universidad Complutense de Madrid**Facultad:** Facultad de Ciencias Biológicas**Titulación:** Grado en Biología**Formato:** Comunicación Oral - Investigación clínica**Palabras Clave:** ERC, SASP, Envejecimiento prematuro, Inflamación. CKD, SASP, Premature aging, Inflammation

La enfermedad renal crónica (ERC) está asociada al envejecimiento prematuro de los pacientes por una mayor expresión del fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP) que establece una presencia heterogénea de distintas moléculas. El estudio consiste en la determinación del SASP en pacientes con ERC, antes y después de los diferentes tratamientos renales sustitutivos evaluando su eficacia en la regulación de este fenotipo. Se han analizado muestras de sangre de 17 individuos sanos y 142 individuos con ERC proporcionadas por el Hospital 12 de Octubre, de las que se ha obtenido el plasma. A partir de éste, se ha determinado la concentración de moléculas SASP mediante tecnología Luminex® xMAP® y ELISA. Se han estudiado 21 moléculas SASP, observándose un aumento en la concentración de citoquinas (TNF, IL6 o IL18), quimioquinas (MCP1) y receptores celulares (ILRI o VEGFR) en pacientes con enfermedad renal crónica avanzada no incluidos en tratamientos sustitutivos, y aquellos en diálisis peritoneal o hemodiálisis; así como una recuperación de los valores de estas moléculas SASP en pacientes con un trasplante renal. En conclusión, los pacientes con ERC presentan un envejecimiento prematuro asociado a un incremento de la concentración de moléculas SASP, mientras que los pacientes trasplantados muestran una reducción de las mismas relacionada con un menor desarrollo de dicho envejecimiento prematuro.

Chronic kidney disease (CKD) is associated with premature aging of patients due to the development of a senescence-associated secretory phenotype (SASP) that establishes a heterogeneous presence of different molecules. The study consists of determining SASP in CKD patients before and after different renal replacement therapies, evaluating their efficacy in regulating this phenotype. Blood samples from 17 healthy individuals and 142 CKD patients provided by Hospital 12 de Octubre have been analyzed, from which plasma has been obtained. From this, the concentration of SASP molecules has been determined using Luminex® xMAP® and ELISA. 21 SASP molecules have been studied, with an increase in the concentration of cytokines (TNF, IL6, or IL18), chemokines (MCP1), and cellular receptors (ILRI or VEGFR) observed in patients with advanced CKD not included in replacement therapies, and those on peritoneal or hemodialysis. As well as a recovery of SASP values in patients with a kidney transplant. In conclusion, CKD patients present premature aging associated with an increase in SASP molecule concentration, while transplant patients show a reduction in these molecules related to a lower development of such premature aging.

## **Enfermedad renal crónica: modalidades y tratamientos en el desarrollo de un fenotipo secretor senescente (SASP). Chronic kidney disease: modalities and treatments in the development of a senescent secretory phenotype (SASP).**

1471901, Gabriela Ortiz Díaz, [maorti11@ucm.es](mailto:maorti11@ucm.es)

**Tutor 1:** Julia María Carracedo Añón, [julcar01@ucm.es](mailto:julcar01@ucm.es)

**Afiliaciones:** Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid.

**Resumen:** La enfermedad renal crónica (ERC) está asociada al envejecimiento prematuro de los pacientes por una mayor expresión del fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP) que establece una presencia heterogénea de distintas moléculas. El estudio consiste en la determinación del SASP en pacientes con ERC, antes y después de los diferentes tratamientos renales sustitutivos evaluando su eficacia en la regulación de este fenotipo. Se han analizado muestras de sangre de 17 individuos sanos y 142 individuos con ERC proporcionadas por el Hospital 12 de Octubre, de las que se ha obtenido el plasma. A partir de éste, se ha determinado la concentración de moléculas SASP mediante tecnología Luminex® xMAP® y ELISA. Se han estudiado 21 moléculas SASP, observándose un aumento en la concentración de citoquinas (TNF, IL6 o IL18), quimioquinas (MCP1) y receptores celulares (ILRI o VEGFR) en pacientes con enfermedad renal crónica avanzada no incluidos en tratamientos sustitutivos, y aquellos en diálisis peritoneal o hemodiálisis; así como una recuperación de los valores de estas moléculas SASP en pacientes con un trasplante renal. En conclusión, los pacientes con ERC presentan un envejecimiento prematuro asociado a un incremento de la concentración de moléculas SASP, mientras que los pacientes trasplantados muestran una reducción de las mismas relacionada con un menor desarrollo de dicho envejecimiento prematuro. **Abstract:** Chronic kidney disease (CKD) is associated with premature aging of patients due to the development of a senescence-associated secretory phenotype (SASP) that establishes a heterogeneous presence of different molecules. The study consists of determining SASP in CKD patients before and after different renal replacement therapies, evaluating their efficacy in regulating this phenotype. Blood samples from 17 healthy individuals and 142 CKD patients provided by Hospital 12 de Octubre have been analyzed, from which plasma has been obtained. From this, the concentration of SASP molecules has been determined using Luminex® xMAP® and ELISA. 21 SASP molecules have been studied, with an increase in the concentration of cytokines (TNF, IL6, or IL18), chemokines (MCP1), and cellular receptors (ILRI or VEGFR) observed in patients with advanced CKD not included in replacement therapies, and those on peritoneal or hemodialysis. As well as a recovery of SASP values in patients with a kidney transplant. In conclusion, CKD patients present premature aging associated with an increase in SASP molecule concentration, while transplant patients show a reduction in these molecules related to a lower development of such premature aging.

**Palabras clave:** ERC, SASP, Envejecimiento prematuro, Inflamación. **Keywords:** CKD, SASP, Premature aging, Inflammation.



## 1. Introducción

La **enfermedad renal crónica (ERC)** constituye un síndrome anatomopatológico caracterizado por una pérdida progresiva e irreversible de nefronas funcionales con el consiguiente deterioro renal. Ésta queda definida clínicamente por una tasa de filtrado glomerular (FG) menor a 60 mL/min en una persona adulta de 1,73 m<sup>2</sup> de superficie, también por la observación durante más de tres meses consecutivos de daños estructurales en el riñón empleando técnicas diagnósticas. Con respecto a la **etiología** de la ERC, la diabetes mellitus y la hipertensión arterial constituyen las principales causas de la misma. La **sintomatología** es inespecífica hasta etapas avanzadas, evolucionando de forma solapada hasta estadios terminales en los que los pacientes precisarán de tratamientos renales sustitutivos del tipo diálisis (diálisis peritoneal o hemodiálisis) o trasplante renal.

Las mencionadas alteraciones estructurales y funcionales del riñón se consideran los principales signos de advertencia en el desarrollo de un **envejecimiento prematuro** por parte de los pacientes con ERC, asociado con altas tasas de morbilidad y mortalidad. Este envejecimiento prematuro está condicionado por una mayor expresión del **fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP)** consistente en la producción desregulada de citoquinas inflamatorias (como IL-1, IL-6 o TNF $\alpha$ ), quimioquinas (como MCP-1) factores de crecimiento y proteasas. Los principales **factores** que inducen su desarrollo son la inadecuada reparación del ADN y la alteración mitocondrial que implica una mayor liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Por un lado, este fenotipo se considera esencial en el control de los procesos de senescencia celular; por otro lado, puede convertir a dicho proceso en un fenómeno fisiopatológico. Así, cuando el SASP se expresa de manera descontrolada produce una acumulación de células senescentes contribuyendo al desarrollo de un estado de **inflamación crónica**.

La **hipótesis** del estudio consiste en la existencia de un envejecimiento prematuro en los pacientes con ERC que estaría determinada por una mayor expresión del SASP. Así, el **objetivo** principal se basa en la cuantificación de dicho perfil SASP en pacientes con ERC, antes y después de los diferentes tratamientos renales del tipo sustitutivo, evaluando su eficacia en la regulación del mismo.

## 2. Material y métodos

El estudio ha sido desarrollado en el Departamento de Genética, Fisiología y Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid (UCM), en colaboración con el Servicio de Nefrología del Hospital 12 de Octubre y forma parte de dos proyectos prospectivos financiados por el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII). Constituye un **estudio transversal** de 142 pacientes con ERC en diferentes fases, incluyendo: 38 pacientes con enfermedad renal crónica avanzada (**ERCA**), 27 pacientes en tratamientos de diálisis peritoneal (**DP**), 38 pacientes en tratamientos de hemodiálisis (**HD**) y 39 pacientes trasplantados (**TX**); además a 17 sujetos sanos (**CT**) como grupo de referencia e individuos de diferentes grupos de edad para minimizar las posibles variaciones debidas a la misma. Los datos clínicos quedan representados en la **Tabla 1**.

	CT	ERCA	DP	HD	TX
<b>Número</b>	17	38	27	38	39
<b>Edad</b>	51,07±15,54	60,77±17,16	56,20±13,40	57,43±14,60	56,22±13,55
<b>Sexo Masculino</b>	0,5	0,6	0,528	0,675	0,675
<b>Sexo femenino</b>	0,5	0,4	0,472	0,325	0,325

**Tabla 1:** tamaño de muestra y datos clínicos relevantes de los grupos participantes.

En cuanto a la **obtención y procesamiento de las muestras**, en el Servicio de Nefrología del Hospital 12 de Octubre de Madrid se extrajeron muestras de sangre periférica de pacientes con ERC e individuos control empleando tubos con anticoagulante EDTA. Tras esto, se transportaron a una temperatura de 4°C hasta la Facultad de Ciencias Biológicas de la UCM donde fueron procesadas en laboratorio. Posteriormente, se llevó a cabo una centrifugación a 4000 rpm durante 20 minutos para obtener el plasma, que quedó almacenado en tubos *ependorf* de 1 mL a -20°C.

Para la **cuantificación de marcadores SASP** en las muestras de plasma se emplearon los kits:

- **HCYTA-60K Human Cyto Panel A:** para la cuantificación de IFN-Gamma, IL-17A/CTLA8, IL-1 Alpha, IL-1 Beta, IL-6, IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2, TNF-Alpha, IL-18, EGF, Flt3 Ligand, Fractalkine/CX3CL1, VEGF-A, sCD40L. Se basa en el método fluorométrico denominado Luminex® xMAP®, que emplea perlas xMAP para la cuantificación simultánea de varias moléculas. Es comercializado por *Sigma-Aldrich* y su referencia es HCYTA-60K.
- **HSCRMAG-32K Human Soluble Cytokine Receptor MAG:** para la cuantificación de sEGFR, sIL-1RI, sTNFR1I, sVEGFR1/sFlt-1. Se basa en el método fluorométrico denominado Luminex® xMAP®, que emplea perlas xMAP para la cuantificación simultánea de varias moléculas. La referencia del mismo es HSCRMAG-32K-04.
- **HUMAN RANTES / CCL5 ELISA KIT:** para la cuantificación de Rantes (CCL5). Se basa en un método colorimétrico de detección mediante ELISA. Éste es comercializado por *Sigma-Aldrich* y su referencia es RAB0076-1KT.

El **análisis estadístico** se desarrolló empleando el programa informático "SPSS 21.0". Para analizar la normalidad de las variables implicadas se empleó la prueba **Kolmogorov-Smirnov**. Posteriormente, se compararon las medias entre las variables continuas SASP que se habían ajustado a la normalidad y las variables cualitativas mediante un **ANOVA** de un factor previo a la prueba Post Hoc de **Tukey**. Sin embargo, las variables que no seguían una distribución normal se analizaron mediante **ANOVA de 1 vía de Kruskal-Wallis** por parejas. En todos los casos se estableció que los resultados eran significativos con un P-valor inferior a 0,05 y muy significativos con un P-valor inferior a 0,01.

### 3. Resultados

Se analizó la concentración plasmática en pg/mL de 21 moléculas SASP en los grupos mencionados. Los resultados obtenidos quedan reflejados en la **Tabla 2**.

Moléculas SASP	CT	ERCA	DP	HD	TX
INF $\gamma$	1,74 $\pm$ 3,33	1,27 $\pm$ 3,22	1,64 $\pm$ 3,08	1,02 $\pm$ 3,29	1,18 $\pm$ 1,99
TNF $\alpha$	11,18 $\pm$ 16,02	<b>25,98<math>\pm</math>16,88*</b>	<b>30,85<math>\pm</math>15,12**</b>	<b>29,15<math>\pm</math>14,51**</b>	<b>15,90<math>\pm</math>13,52<math>^{\circ}</math>¶</b>
IL 1 $\alpha$	25,13 $\pm$ 20,30	22,01 $\pm$ 28,68	14,67 $\pm$ 14,00	19,18 $\pm$ 20,54	20,99 $\pm$ 22,24
IL 1 $\beta$	10,36 $\pm$ 19,40	14,64 $\pm$ 26,58	48,90 $\pm$ 186,16	12,71 $\pm$ 24,15	25,63 $\pm$ 40,38
IL 6	1,09 $\pm$ 1,53	<b>4,33<math>\pm</math>4,96***</b>	<b>3,94<math>\pm</math>7,10</b>	<b>3,07<math>\pm</math>2,44**</b>	<b>1,66<math>\pm</math>2,02<math>^{-}</math></b>
IL 8	1,71 $\pm$ 1,33	1,31 $\pm$ ,93	1,36 $\pm$ 1,52	1,95 $\pm$ 1,62	1,30 $\pm$ ,89
IL 10	,43 $\pm$ .	4,78 $\pm$ 5,67	1,78 $\pm$ 1,99	5,17 $\pm$ 4,22	1,13 $\pm$ ,52
IL 17A	8,62 $\pm$ 20,47	10,55 $\pm$ 17,40	3,37 $\pm$ 4,33	6,02 $\pm$ 11,20	11,17 $\pm$ 16,96
IL 18	11,12 $\pm$ 8,87	<b>33,09<math>\pm</math>17,11***</b>	<b>31,41<math>\pm</math>20,08**</b>	<b>33,60<math>\pm</math>12,83***</b>	<b>17,54<math>\pm</math>14,34<math>^{-}</math><math>^{\circ}</math>¶</b>
MCP1	241,61 $\pm$ 64,56	<b>378,70<math>\pm</math>103,41**</b>	328,57 $\pm$ 100,25	<b>365,27<math>\pm</math>108,07**</b>	<b>269,64<math>\pm</math>112,75<math>^{-}</math>¶</b>
TFG $\beta$	2016,56 $\pm$ 1689,64	4007,04 $\pm$ 3397,66	3093,77 $\pm$ 2613,56	4070,41 $\pm$ 3288,48	3134,27 $\pm$ 2300,05
sCD40L	96,34 $\pm$ 167,94	120,03 $\pm$ 141,74	154,20 $\pm$ 313,27	177,57 $\pm$ 230,28	123,01 $\pm$ 124,04
EGF	1,34 $\pm$ 3,11	,74 $\pm$ 2,77	1,44 $\pm$ 5,18	4,13 $\pm$ 7,32	1,93 $\pm$ 4,22
Flt3L	7,67 $\pm$ 3,41	11,33 $\pm$ 5,566	10,55 $\pm$ 5,96	11,68 $\pm$ 5,57	<b>5,26<math>\pm</math>4,09<math>^{-}</math>¶</b>
Fractalkina	16,79 $\pm$ 15,40	10,38 $\pm$ .	22,50 $\pm$ 5,39	15,29 $\pm$ 4,83	9,65 $\pm$ 3,63
VEGFA	18,72 $\pm$ 14,56	51,36 $\pm$ 27,37	33,79 $\pm$ 18,66	11,10 $\pm$ 7,59	30,88 $\pm$ 47,73
RANTES	10,77 $\pm$ 7,71	12,86 $\pm$ 7,52	11,50 $\pm$ 7,17	14,89 $\pm$ 8,73	<b>7,24<math>\pm</math>7,14¶</b>
ILRI	74,86 $\pm$ 69,39	133,74 $\pm$ 151,70	141,17 $\pm$ 79,60 $^{\circ}$	132,65 $\pm$ 86,18	121,50 $\pm$ 80,26
TNFRII	9,39 $\pm$ 12,85	20,96 $\pm$ 28,38	18,42 $\pm$ 29,73	11,72 $\pm$ 14,96	16,81 $\pm$ 27,78
EGFR	17466,05 $\pm$ 5984,37	15655,22 $\pm$ 7111,11	12721,78 $\pm$ 6428,35	14796,78 $\pm$ 8847,53	14502,32 $\pm$ 8467,80
VEGFR	629,16 $\pm$ 194,28	424,25 $\pm$ 179,07	474,82 $\pm$ 178,79	<b>401,46<math>\pm</math>181,57<math>^{\circ}</math></b>	523,66 $\pm$ 258,70

**Tabla 2:** resultados del estudio expresados como la media de la concentración plasmática de las moléculas SASP en pg/mL para cada grupo con su correspondiente desviación típica. Donde: \* P<0,05 vs. CT, \*\* P<0,01 vs. CT, \*\*\* P<0,001 vs. CT;  $^{-}$  P<0,05 vs. ERCA,  $^{-}$  P<0,01 vs. ERCA,  $^{-}$  P<0,001 vs. ERCA;  $^{\circ}$  P<0,05 vs. DP,  $^{\circ}$  P<0,01 vs. DP,  $^{\circ}$  P<0,001 vs. DP; ¶ P<0,05 vs. HD, ¶¶ P<0,01 vs. HD, ¶¶¶ P<0,001 vs. HD.

Con respecto a las **citoquinas**, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) tuvo un aumento significativo en su concentración plasmática en ERCA, DP y HD con respecto a CT y una disminución significativa de la misma en TX en relación con CT. En la interleucina 6 (IL 6) se obtuvo una concentración incrementada muy significativamente en ERCA y HD en relación con CT y una reducción significativa en TX con respecto a ERCA. Por otro lado, la interleucina 18 (IL 18) aumentó significativamente su concentración en ERCA, DP y HD con respecto a CT y, de igual forma, la redujo en TX en relación con ERCA, DP y HD. Refiriéndonos a las **quimioquinas**, la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP 1) presentó un aumento significativo en su concentración plasmática en ERCA y HD en relación con CT; así como una disminución muy significativa en TX con respecto a ERCA y significativa con respecto a HD. En **RANTES** se observaron valores de concentración plasmática ligeramente superiores en ERCA, DP y HD con respecto CT pero los valores no mostraron significación estadística; sin embargo, sí fue significativa la reducción en dichos valores en TX en relación a HD. El ligando del receptor tirosina-quinasa-3 relacionado con FMS (Flt3L) tuvo valores ligeramente superiores de concentración en ERCA, DP y HD con respecto a CT, pero no resultaron estadísticamente

significativos. Sin embargo, sí fue significativa la reducción de estos valores en TX en relación a ERCA y HD. De los **receptores celulares** estudiados, el receptor para interleucinas-1 (**ILRI**) tuvo un aumento en su concentración plasmática en ERCA, DP, HD y TX con respecto a CT que sólo resultó estadísticamente significativo en el grupo DP. Por el contrario, el receptor del factor de crecimiento endotelial (**VEGFR**) tuvo una disminución en sus concentraciones plasmáticas en ERCA, DP, HD y TX pero esta reducción sólo fue estadísticamente significativa HD en relación con CT.

#### 4. Discusión

Los pacientes con ERC desarrollan un envejecimiento prematuro relacionado con la expresión de un SASP, resultante de un exceso de uremia. El SASP se caracteriza por la presencia de citoquinas, factores de crecimiento, quimioquinas y proteasas que van a inducir un estado senescente generalizado, afectando mayoritariamente a células endoteliales. En cuanto a las **citoquinas**, el **TNF $\alpha$**  tiene efectos pleiotrópicos provocando inflamación a nivel sistémico y fenómenos de apoptosis. Además, estudios establecen que una concentración plasmática mayor de TNF $\alpha$  resulta en una mayor mortalidad en ERCA y en un peor rescate de la función renal en pacientes trasplantados (Molnar *et al.*, 2017, p. 2152); esto puede deberse a que su expresión desregulada induce la transición epitelio-mesénquima de las células del tejido renal mediante la ruta AKT/Smurfs 2 generando un estado fibrótico (Zhao *et al.*, 2018, pp. 483–490). Por otro lado, la **IL 6** presenta tanto efectos proinflamatorios como antiinflamatorios y es producida en respuesta a estímulos como la expresión de TNF $\alpha$  o el estrés oxidativo. Así, se podrían asociar niveles altos de IL 6 con una elevada expresión de TNF $\alpha$  en los pacientes, no obstante, esto debería ser confirmado mediante futuros análisis de correlación; otros autores se refieren a la sobreproducción de IL 6 como una causa del envejecimiento prematuro de los pacientes provocando la pérdida de masa muscular (Stenvinkel *et al.*, 2005, pp. 1216–1233). La **IL 18** es una citoquina proinflamatoria que atrae neutrófilos favoreciendo su adhesión a células endoteliales y fenómenos de aterogénesis. Por tanto, sus altos niveles podrían asociarse a la acumulación de células endoteliales senescentes típica del envejecimiento prematuro; sin embargo, no se ha encontrado bibliografía al respecto. La producción de IL 18 se desarrolla a partir de un precursor dentro del complejo inflamasoma; en relación con esto, otros estudios demuestran que pacientes con ERC presentan una mayor expresión de estos complejos (concretamente del tipo NLRP3) que produciría una mayor expresión de IL 18 (Vilaysane *et al.*, 2010, p. 1732). Con respecto a las **quimioquinas**, la **MCP 1** se define como quimioatrayente de monocitos y su expresión está implicada en la aterogénesis y, por tanto, en el desarrollo de eventos. MCP 1 es expresada en sitios de daño e inflamación y, por tanto, en ERC se incrementa su expresión en los túbulos renales. Además, en modelos animales en los que se bloquea la acción de esta quimioquina se produce un menor daño tubulointersticial (Eardley *et al.*, 2006, pp. 1189–1197). Por otro lado, **RANTES** atrae a células inmunes a los lugares de inflamación y, en ocasiones, promueve el desarrollo de enfermedades autoinmunes e inflamatorias (Levy, 2009). Así, el aumento observado en ERC puede deberse a los estados inflamatorios característicos del perfil SASP. En relación a otras moléculas, **Flt3L** mediante la unión a su receptor del tipo tirosina-kinasa regula el desarrollo de células dendríticas. Por tanto, una acumulación renal de células dendríticas promovida por Flt3L promueve la activación de células T de memoria favoreciendo la inducción

local de citoquinas; estudios animales describen cómo los ratones deficientes para estas moléculas presentan menos eventos de hipertensión y patología renal (Lu *et al.*, 2020, pp. 131–138). Por otro lado, **VEGFR** es un receptor que promueve la vasculogénesis y la angiogénesis. Otros autores establecen un mayor riesgo de desarrollar ERC cuando hay niveles elevados de VEGF (Anderson *et al.*, 2018, p. 117), sin embargo, no se ha encontrado bibliografía en cuanto al papel de sus receptores en la enfermedad (VEGFR). En ningún caso se han encontrado referencias a estudios que analicen los niveles plasmáticos de estas moléculas SASP distinguiendo entre las diferentes modalidades y/o tratamientos de la ERC como se refleja en este trabajo.

## 5. Conclusión

Dentro de la ERC, los grupos ERCA, DP y HD cuentan con una mayor expresión del SASP que contribuye a un estado inflamatorio generalizado, con un mayor envejecimiento prematuro asociado. Además, los pacientes receptores de un trasplante de riñón (TX) muestran un rescate de la función renal consistente en la recuperación de unos valores de moléculas SASP similares a los de sujetos sanos, lo que indica un menor estado de envejecimiento prematuro.

**Agradecimientos:** María del Mar Rodríguez San Pedro, Gemma Valera Arévalo, Víctor Cabanillas García, Julia María Carracedo Añón.

## 6. Bibliografía

- Anderson, C.E. *et al.* (2018) 'The association of angiogenic factors and chronic kidney disease', *BMC Nephrology*, 19(1), p. 117. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12882-018-0909-2>.
- Eardley, K.S. *et al.* (2006) 'The relationship between albuminuria, MCP-1/CCL2, and interstitial macrophages in chronic kidney disease', *Kidney International*, 69(7), pp. 1189–1197. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5000212>.
- Lu, X. *et al.* (2020) 'Classical Dendritic Cells Mediate Hypertension by Promoting Renal Oxidative Stress and Fluid Retention', *Hypertension*, 75(1), pp. 131–138. Available at: <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.13667>.
- Molnar, M.Z. *et al.* (2017) 'Inflammatory Markers and Outcomes in Kidney Transplant Recipients', *Transplantation*, 101(9), p. 2152. Available at: <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000001548>.
- Stenvinkel, P. *et al.* (2005) 'IL-10, IL-6, and TNF- $\alpha$ : Central factors in the altered cytokine network of uremia—The good, the bad, and the ugly', *Kidney International*, 67(4), pp. 1216–1233. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00200.x>.
- Vilaysane, A. *et al.* (2010) 'The NLRP3 Inflammasome Promotes Renal Inflammation and Contributes to CKD', *Journal of the American Society of Nephrology*, 21(10), p. 1732. Available at: <https://doi.org/10.1681/ASN.2010020143>.
- Zhao, C. *et al.* (2018) 'Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in epithelial-to-mesenchymal transition in transplanted kidney cells in recipients with chronic allograft dysfunction', *Gene*, 642, pp. 483–490. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.11.059>.

**76292: EN: Risk of suicide on nursing students after COVID-19 pandemic. ES: Riesgo de suicidio en estudiantes de Enfermería tras la pandemia por COVID-19****Área de conocimiento:** ENFERMERÍA**Autor(es):** Marina Martín Núñez**Tutor(es):** Luis Iván Mayor Silva, Guillermo Moreno Muñoz**Universidad:** Universidad Complutense de Madrid**Facultad:** Facultad de Enfermería, Fisioterapia y Podología**Titulación:** Grado en Enfermería**Formato:** Comunicación Oral - Investigación básica**Palabras Clave:** EN: suicide, nursing, students, Covid-19 ES: suicidio, enfermería, estudiantes, Covid-19

EN: Suicide is currently the fourth leading cause of death among people aged 15-29. The COVID-19 pandemic has been well-studied as an aggravator of suicide risk due to the loneliness and uncertainty associated with its unpredictable behavior. It has been noted that the mental health status of healthcare workers such as nurses has been severely affected by the pandemic, so the question arose as to whether nursing students were also affected. Therefore, the following study was conducted to determine whether the risk of suicide among nursing students increased after the COVID-19 pandemic. To this end, an observational, descriptive, transversal study was conducted among first-year nursing students. The results showed that a total of 16.4% of the students were at high risk of suicide.

ES: Actualmente, el suicidio es la cuarta causa de muerte en jóvenes de entre 15 y 29 años. Un conocido y estudiado agravante del riesgo de suicidio ha sido la pandemia por COVID-19, debido a la soledad y la incertidumbre asociadas a su impredecibilidad. Se ha observado que la salud mental de los profesionales sanitarios, incluyendo enfermería, se ha visto gravemente afectada por la pandemia, por lo que muy probablemente haya afectado también a los estudiantes de enfermería. Por ello, se llevó a cabo un estudio observacional, descriptivo y transversal con alumnos de primer año de enfermería, para determinar si el riesgo de suicidio en estudiantes de enfermería había incrementado tras la pandemia por COVID-19. Se empleó el cuestionario de riesgo de suicidio de Plutchik, así como cuestionarios autoadministrados y validados para evaluar las estrategias de regulación emocional, el nivel de resiliencia, los rasgos de personalidad y el nivel de calidad de vida. Se calculó la prevalencia de riesgo de suicidio, así como su relación con las variables psicológicas mediante la correlación de Pearson. Los resultados mostraron que un 16,4% de los estudiantes presentaban un riesgo alto de suicidio. El riesgo de suicidio se asoció más directamente con el neuroticismo y la supresión de las respuestas emocionales, e inversamente con la resiliencia, la extroversión, la responsabilidad, el intelecto/la mentalidad abierta y la calidad de vida.

## **Riesgo de suicidio en estudiantes de Enfermería tras la pandemia por COVID-19**

### **Risk of suicide on nursing students after COVID-19 pandemic**

**Autor:** 1509492. Marina Martín Núñez, marinm52@ucm.es

**Tutor 1:** Luis Iván Mayor Silva, limayors@ucm.es

**Tutor 2:** Guillermo Moreno Muñoz, guimoren@ucm.es

*Facultad de Enfermería, Fisioterapia y Podología, Universidad Complutense de Madrid (UCM)*

#### **RESUMEN**

Actualmente, el suicidio es la cuarta causa de muerte en jóvenes de entre 15 y 29 años. Un conocido y estudiado agravante del riesgo de suicidio ha sido la pandemia por COVID-19, debido a la soledad y la incertidumbre asociadas a su impredecibilidad. Se ha observado que la salud mental de los profesionales sanitarios, incluyendo enfermería, se ha visto gravemente afectada por la pandemia, por lo que muy probablemente haya afectado también a los estudiantes de enfermería. Por ello, se llevó a cabo un estudio observacional, descriptivo y transversal con alumnos de primer año de enfermería, para determinar si el riesgo de suicidio en estudiantes de enfermería había incrementado tras la pandemia por COVID-19. Se empleó el cuestionario de riesgo de suicidio de Plutchik, así como cuestionarios autoadministrados y validados para evaluar las estrategias de regulación emocional, el nivel de resiliencia, los rasgos de personalidad y el nivel de calidad de vida. Se calculó la prevalencia de riesgo de suicidio, así como su relación con las variables psicológicas mediante la correlación de Pearson. Los resultados mostraron que un 16,4% de los estudiantes presentaban un riesgo alto de suicidio. El riesgo de suicidio se asoció más directamente con el neuroticismo y la supresión de las respuestas emocionales, e inversamente con la resiliencia, la extroversión, la responsabilidad, el intelecto/la mentalidad abierta y la calidad de vida.

**Palabras clave:** suicidio, enfermería, estudiantes, Covid-19

#### **ABSTRACT**

Suicide is currently the fourth leading cause of death among young people aged 15-29. The COVID-19 pandemic has been known and studied to increase the risk of suicide due to the loneliness and uncertainty associated with its unpredictability. The mental health of healthcare professionals, including nurses, has been observed to be severely affected by the pandemic, and it is therefore likely that nursing students have also been affected. Therefore, an observational, descriptive and cross-sectional study of first-year nursing students was conducted to determine whether the risk of suicide in nursing students had increased following the COVID-19 pandemic. The Plutchik Suicide Risk Questionnaire was used, as well as self-administered and validated questionnaires to assess emotional regulation strategies, levels of resilience, personality traits and quality of life. The prevalence of suicide risk was calculated, as well as its relationship with psychological variables using Pearson's correlations. The results showed that 16.4% of the students were at high risk of suicide. Suicide risk was most directly related to Neuroticism and Suppressed Emotional Responses, and inversely related to Resilience, Extroversion, Responsibility, Intellect/ Openness, and Quality of Life.

**Key words:** suicide, nursing, students, Covid-19

## INTRODUCTION

Suicidal behavior is most common among adolescents and young adults and is the fourth leading cause of death among people aged 15-29 years (WHO, 2021). Suicide is described by Crosby A. et al. as "death caused by injuring oneself with the intent to die", while suicide attempt is described as "when someone harms themselves with any intent to end their life but do not die because of their actions" (Crosby AE et al., 2011.).

In recent years, suicide research has focused its attention on undergraduate students, who are at high risk of developing mental disorders (Demenech et al., 2022a; Gao et al., 2021; Mendez-Pinto et al., 2022a), even more so recently, when the COVID-19 pandemic exposed populations around the world to situations of exceptional emotional distress. Following the COVID-19 pandemic, an increase in generalized anxiety disorder, depressive symptoms, and perceived stress was observed, as well as a higher risk of suicide among undergraduate health science students (Demenech et al., 2022a; Marcén-Román et al., 2021). A higher prevalence of anxiety, depression, PTSD, insomnia and academic stress was also observed among nursing students after the COVID-19 pandemic (Gao et al., 2021; Mendez-Pinto et al., 2022a; Reverté-Villarroya et al., 2021).

Perceived loneliness, younger age, reduced perceived social support, intolerance of uncertainty, social distancing, imposed isolation and higher anxiety sensitivity are factors that have been associated with an increased risk of suicide during the COVID-19 pandemic in the general population (Allan et al., 2021a; Farooq et al., 2021; Shah et al., 2021). Nursing students may have been vulnerable to the social changes of the COVID-19 pandemic, which may have had a rapid negative impact on them. It is possible that a large number of nursing students were at high-risk following the COVID-19 pandemic. Therefore, the aim of this study is to measure the risk of suicide among nursing students after the COVID-19 pandemic and the factors associated with the risk of suicidal ideation.

## METHODS

### Design and study population

To this end, an observational, descriptive, transversal study was conducted with undergraduate nursing students during the 2021-2022 academic year. The data used in this study were collected from 196 first-year nursing students at the Faculty of Nursing, Physiotherapy and Podiatry at the Complutense University of Madrid. The students were explained the aim of the study they were about to undergo and its methodology, after which they were given an informed consent form to sign. This document was approved by the Research Commission of the Faculty of Nursing, Physiotherapy and Podiatry of the Complutense University of Madrid.

### Measures

Participants in the study were given an average of five scales and self-report questionnaires, which showed high internal consistency and convergent validity:

- Plutchik Risk of Suicide Scale (RS): 15-item version. It has been designed to assess suicide risk, distinguishing between average individuals and those with a history of suicidal



ideation or current suicidal ideation. Scores equal to or greater than 6 indicate a risk of suicide. This scale has item internal consistency indices between 0.84 and 0.90 and a retest reliability of 0.89 (Plutchik et al., 1989).

- Emotional Regulation Questionnaire (ERQ): 10 items. It assesses emotional regulation tendencies using two subscales: cognitive reappraisal and expressive suppression. According to the scale results, the higher the score, the higher the ability to regulate the emotion of the person tested. This scale showed adequate Cronbach's alpha index values (0.70 - 0.80). It uses a Likert type scale with 7 categories ranging from strongly disagree – 1 – to strongly agree – 7 – (Pérez-Sánchez and Prieto, 2020).
- 14 items Resilience Scale (ER-14). This scale measures the level of resilience, which is considered a positive personality trait that allows adaptive behaviour in the face of adverse situations and is negatively associated with anxiety and depression. Sánchez-Teruel et al. measured its psychometric parameters and found an adequate internal consistency with a Cronbach's alpha index of 0.79 (Sánchez-Teruel, 2016).
- Brief Personality Inventory (BPI). Consisting of 20 items, it includes five personality traits and 10 facets that tend to cluster around the expected components, two facets for each of the five traits. It includes all five personality traits (Extroversion, Friendliness, Responsibility, Neuroticism and Intellect). Torreblanca-Murillo et al. concluded from a study that the Cronbach's alpha index score of this scale was adequate for each personality trait, with values ranging from 0.72 to 0.80 (Torreblanca Murillo Director and Ruiz García, 2017).
- EuroQol- 5 Dimension Quality of Life Health Questionnaire. Consists of two parts; a 5-item first part and a 0-100 scale for the second half, which assesses the generic quality of life developed in Europe. The first part assesses 5 dimensions, including mobility, self-care, basic activities of daily living, pain/discomfort and anxiety/depression. The second part consists of an analogue visual scale with values ranging from 0, representing the worst possible health state, to 100, representing the best possible health state (Herdman et al., 2001).

The risk of suicide was used as the dependent variable and the socio-demographic scores, the ERQ, the ER-14, the CBP and the EQ-5D as the independent variables.

### **Ethic And Legal Considerations**

Participants' personal information was anonymised using numerical codes to ensure confidentiality. Data collection took place between October and December 2021, and surveys were conducted anonymously online using Google Forms. The resulting data were transcribed into an SPSS (v. 25.0) database using the previously used anonymous identification codes for each participant. Helsinki's Declaration on Biomedical Investigation on Human Beings' terms were followed at all times. A survey form was handed to each student, who were also given a written consent form that included the voluntary and anonymous nature of the study, which was also approved by the University Ethics Committee.

### **Statistical Analysis**

SPSS statistical tools were used to carry out data analysis procedures. Descriptive statistics by means with standard deviation and absolute and relative frequencies were used to

analyse sex, age variables and suicidal ideation intention. The chi-square test was used to assess the relationship between sex and risk of suicidal ideation in the target population. Quantitative variables were compared using Pearson's correlation, which links the association between the scores on the questionnaires with the intention of identifying the suicide protective factor that most influences the target population and identifying the personality trait that most protect against suicide risk.

## RESULTS

### Sample characteristics

Of the total number of participating students ( $n = 195$ ), 86.2% were female. Age ranged from 18 to 53 years (mean (standard deviation) = 19.7(5.5)). Overall, 16.4% ( $n = 32$ ) of the patients were at high risk of suicide according to their scores on the RS scale. Of the total males, 11.1% were at high risk of suicide, whereas 17.3% of the females were at high risk of suicide, with no statistically significant differences ( $p = 0.58$ ).

### Correlations with risk of suicide

Differences in the scores on the scales administered during the students' assessment were grouped according to suicide risk (low/high) and are shown in Table 1. A weak positive association was found between expressive suppression and suicide risk. Neuroticism also showed a moderate positive association with suicide risk. There was a moderate negative association between Resilience and suicide risk. Extroversion, responsibility, intellect and quality of life showed weak negative associations with suicide risk. There was no statistical association between age, cognitive reappraisal, kindness and suicide risk (Table 1).

	High risk of suicide MT (SD)	Low risk of suicide MT (SD)	Correlation	p-value
Age	21.78 (8.76)	19.33 (4.57)	$r = 0.06$	$p = 0.38$
Cognitive reappraisal (ERQ)	26.72 (8.76)	29.01 (5.362)	$r = 0.03$	$p = 0.68$
Expressive suppression (ERQ)	16.78 (5.517)	12.87 (4.57)	$r = 0.37$	$p < 0.01$
Resilience (ER-14)	66.09 (13.13)	76.26 (8.82)	$r = -0.44$	$p < 0.01$
Extraversion (BPI)	8.66 (3.615)	9.29 (3.03)	$r = -0.20$	$p < 0.01$
Kindness (BPI)	12.03 (2.40)	12.56 (2.86)	$r = -0.09$	$p = 0.21$
Responsibility (BPI)	7.91 (3.81)	9.70 (3.53)	$r = -0.22$	$p < 0.01$
Neuroticism	10.69 (2.68)	7.01 (2.82)	$r = 0.57$	$p < 0.01$
Intellect (BPI)	9.38 (3.55)	10.20 (2.55)	$r = -0.14$	$p = 0.05$
Quality of life (EQ-5D)	55.84 (29.80)	79.06 (20.04)	$r = -0.37$	$p < 0.01$

Table 1. Correlations with risk of suicide

## DISCUSSION

According to our results, about 16% of nursing students are at high risk of suicide after the COVID-19 pandemic. Suicide risk was most strongly associated with neuroticism and suppression of emotional responses, and inversely with resilience, extroversion, responsibility, intellect/open-mindedness and quality of life. This last association is consistent with other studies showing that the worse the living conditions of individuals, such as reduced income,

poverty, food insecurity, etc., the higher the risk of suicide, as noted by Miranda Demenech et al (Demenech et al., 2022b). Some studies included in the literature also link poorer mental health status and suicide risk to gender, but these observations don't seem to be particularly consistent, as some authors have found that men tend to be more affected by the pandemic (Gao et al., 2021), while others have found the opposite, with woman being the most affected by the COVID-19 pandemic (Allan et al., 2021b; Demenech et al., 2022b). In line with our own findings, but this may very well be due to the disparity in the number of females to males in the study samples. Surprisingly, two studies identified having a relative infected with COVID-19 as a protective factor against psychological distress and thus suicidality (Demenech et al., 2022b; Mendez-Pinto et al., 2022b).

Overall, the general conclusion regarding the association between the COVID-19 pandemic and suicide risk seems to be one and the same; the risk has increased among students after the effects of the COVID-19 pandemic, bringing to our attention a very sensible matter that cannot be left unattended and therefore must be considered in the interest of ensuring healthy generations of new nurses for the near future.

## CONCLUSIONS

- 16.4% of nursing students are at high risk of suicide after the COVID-19 pandemic.
- Higher levels of emotional suppression and neuroticism are directly related to suicide risk in nursing students.
- The risk of suicide is inversely related to higher levels of resilience, extraversion, sense of responsibility, intellect and quality of life in nursing students.

## REFERENCES

Allan, N.P., Volarov, M., Koscinski, B., Pizzonia, K.L., Potter, K., Accorso, C., Saulnier, K.G., Ashrafioun, L., Stecker, T., Suhr, J., Allan, D.M., 2021a. Lonely, anxious, and uncertain: Critical risk factors for suicidal desire during the COVID-19 pandemic. *Psychiatry Res* 304. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2021.114144>

Allan, N.P., Volarov, M., Koscinski, B., Pizzonia, K.L., Potter, K., Accorso, C., Saulnier, K.G., Ashrafioun, L., Stecker, T., Suhr, J., Allan, D.M., 2021b. Lonely, anxious, and uncertain: Critical risk factors for suicidal desire during the COVID-19 pandemic. *Psychiatry Res* 304. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2021.114144>

Crosby AE, Ortega L, Melanson C., 2011. *Self-directed Violence Surveillance: Uniform Definitions and Recommended Data Elements, Version 1.0*. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Injury Prevention and Control.

Demenech, L.M., Neiva-Silva, L., Brignol, S.M.S., Marcon, S.R., Lemos, S.M., Tassitano, R.M., Dumith, S.C., 2022a. Suicide risk among undergraduate students in Brazil in the periods before and during the COVID-19 pandemic: Results of the SABES-Grad national survey. *Psychol Med*. <https://doi.org/10.1017/S0033291722001933>

Demenech, L.M., Neiva-Silva, L., Brignol, S.M.S., Marcon, S.R., Lemos, S.M., Tassitano, R.M., Dumith, S.C., 2022b. Suicide risk among undergraduate students in Brazil in the periods before

and during the COVID-19 pandemic: Results of the SABES-Grad national survey. *Psychol Med*. <https://doi.org/10.1017/S0033291722001933>

Farooq, S., Tunmore, J., Ali, W., Ayub, M., 2021. Suicide, self-harm and suicidal ideation during COVID-19: A systematic review. *PsychiatryRes*. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2021.114228>

Gao, J., Wang, F., Guo, S., Hu, F., 2021. Mental Health of Nursing Students amid Coronavirus Disease 2019 Pandemic. *Front Psychol* 12. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2021.699558>

Herdman, M., Badia, X., Berra, S., 2001. El EuroQol-5D: una alternativa sencilla para la medición de la calidad de vida relacionada con la salud en atención primaria. *Aten Primaria* 28, 425–430.

Marcén-Román, Y., Gasch-Gallen, A., Vela Martín de la Mota, I.I., Calatayud, E., Gómez-Soria, I., Rodríguez-Roca, B., 2021. Stress Perceived by University Health Sciences Students, 1 Year after COVID-19 Pandemic. *Int J Environ Res Public Health* 18, 5233. <https://doi.org/10.3390/ijerph18105233>

Mendez-Pinto, I., Antuña-Casal, M., Mosteiro-Díaz, M.P., 2022a. Psychological disorders among Spanish Nursing students three months after COVID-19 lockdown: A cross-sectional study. *Int J Ment Health Nurs*. <https://doi.org/10.1111/inm.13086>

Mendez-Pinto, I., Antuña-Casal, M., Mosteiro-Díaz, M.P., 2022b. Psychological disorders among Spanish Nursing students three months after COVID-19 lockdown: A cross-sectional study. *Int J Ment Health Nurs*. <https://doi.org/10.1111/inm.13086>

Pérez-Sánchez, J., Prieto, G., 2020. Propiedades psicométricas de las puntuaciones de los test más empleados en la evaluación de la regulación emocional. *Papeles del Psicólogo - Psychologist Papers* 41. <https://doi.org/10.23923/pap.psicol2020.2931>

Plutchik, R., van Praag, H.M., Conte, H.R., Picard, S., 1989. Correlates of suicide and violence risk 1: The suicide risk measure. *Compr Psychiatry* 30, 296–302. [https://doi.org/10.1016/0010-440X\(89\)90053-9](https://doi.org/10.1016/0010-440X(89)90053-9)

Reverté-Villarroya, S., Ortega, L., Lavedán, A., Masot, O., Burjalés-Martí, M.D., Ballester-Ferrando, D., Fuentes-Pumarola, C., Botigué, T., 2021. The influence of COVID-19 on the mental health of final-year nursing students: comparing the situation before and during the pandemic. *Int J Ment Health Nurs* 30, 694–702. <https://doi.org/10.1111/inm.12827>

Sánchez-Teruel, D., 2016. 4-item Resilience Scale (RS-14): Psychometric Properties of the Spanish Version Assessment of suicidal behavior View project Proyecto de innovación docente View project.

Shah, M., Roggenkamp, M., Ferrer, L., Burger, V., Brassil, K.J., 2021. Mental health and covid-19 the psychological implications of a pandemic for nurses. *Clin J Oncol Nurs* 25, 69–75. <https://doi.org/10.1188/21.CJON.69-75>

Torreblanca Murillo Director, L., Ruiz García, V.M., 2017. Desarrollo de un Nuevo Instrumento de Evaluación: El Cuestionario Breve de Personalidad (CBP).

**76840: Estudio transversal del consumo de tabaco en los estudiantes de ciencias de la salud Universidad Complutense. Cross-sectional study of tobacco consumption in students of the area of health sciences at the Complutense University.**

**Área de conocimiento:** ENFERMERÍA

**Autor(es):** Laura Roales-Nieto Alonso

**Tutor(es):** Maria Julia Ajejas Bazán

**Universidad:** Universidad Complutense de Madrid

**Facultad:** Facultad de Enfermería, Fisioterapia y Podología

**Titulación:** Grado en Enfermería

**Formato:** Comunicación Oral - Investigación básica

**Palabras Clave:** Tabaquismo, estudiantes, prevalencia, factores de riesgo. Tobacco Use Disorder, students, prevalence, risk factors.

**Resumen**

Introducción. El tabaco es una sustancia perjudicial que provoca fundamentalmente enfermedades cardiovasculares y diferentes tipos de cánceres. Objetivos. Se ha estudiado la prevalencia del consumo de tabaco entre los estudiantes del área de ciencias de la salud de la Universidad Complutense (UCM) y los factores de riesgo asociados. Material y métodos. Se ha realizado un estudio transversal durante 2023. Para la selección de la muestra se ha realizado un muestreo no probabilístico entre los estudiantes de ciencias de la salud de la UCM. Los datos se obtuvieron a través de un cuestionario compartido en redes sociales y canales de mensajería a los estudiantes de dicha Universidad. Se realizó una descripción haciendo uso de frecuencias absolutas y porcentajes. Se calculó la prevalencia haciendo uso de probabilidades. Resultados. Respondieron al cuestionario 128 estudiantes (84,4 % mujeres). Un 71,4% de la muestra no consume tabaco. Los fumadores se han iniciado en la franja de edad de 18-20 años (16,4%). Han manifestado que lo hacen por gusto o costumbre (13,3%) o para ayudarles a controlar el estrés que les produce el grado. No se halló asociación significativa entre padres fumadores y estudiantes consumidores de tabaco (27,3%). Conclusiones. La prevalencia de tabaco entre los estudiantes del área de las ciencias de la salud en la universidad Complutense es baja, mayor en las mujeres que cursan primero de grado de Enfermería y Medicina entre los 18 y 20 años.

**Abstract**

Introduction. Tobacco is a harmful substance that mainly causes cardiovascular diseases and different types of cancers. Objectives. We studied the prevalence of tobacco use among students of the health sciences area of the Complutense University (UCM) and the associated risk factors. Material and methods. A cross-sectional study was carried out during 2023. For the selection of the sample, non-probabilistic sampling was carried out among the students of health sciences at the UCM. The data were obtained through a questionnaire shared in social networks and messaging channels to the students of that University. A description was made using absolute frequencies and percentages. Prevalence was calculated using probabilities. Results. The questionnaire was answered by 128 students (84.4 % female). Of the sample, 71.4% did not use tobacco. Smokers started smoking in the 18-20 years age group (16.4%). They stated that they do it for pleasure or habit (13.3%) or to help them control the stress caused by the grade. No significant association was found between parents who smoke and students who use tobacco (27.3%). Conclusions. The prevalence of smoking among students of the health sciences at the Complutense University of Madrid is low, and is higher among women in the first year of nursing and medicine between 18 and 20 years of age.

## Estudio transversal del consumo de tabaco en los estudiantes de ciencias de la salud de la Universidad Complutense.

Identificador: 1478985

Laura Roales–Nieto Alonso. [lroalesn@ucm.es](mailto:lroalesn@ucm.es)

Tutora: María Julia Ajejas Bazán. [majejas@ucm.es](mailto:majejas@ucm.es)

Facultad de Enfermería, Fisioterapia y Podología. Universidad Complutense de Madrid.

### Resumen

**Introducción.** El tabaco es una sustancia perjudicial que provoca fundamentalmente enfermedades cardiovasculares y diferentes tipos de cánceres. **Objetivos.** Se ha estudiado la prevalencia del consumo de tabaco entre los estudiantes del área de ciencias de la salud de la Universidad Complutense (UCM) y los factores de riesgo asociados. **Material y métodos.** Se ha realizado un estudio transversal durante 2023. Para la selección de la muestra se ha realizado un muestreo no probabilístico entre los estudiantes de ciencias de la salud de la UCM. Los datos se obtuvieron a través de un cuestionario compartido en redes sociales y canales de mensajería a los estudiantes de dicha Universidad. Se realizó una descripción haciendo uso de frecuencias absolutas y porcentajes. Se calculó la prevalencia haciendo uso de probabilidades. **Resultados.** Respondieron al cuestionario 128 estudiantes (84,4 % mujeres). Un 71,4% de la muestra no consume tabaco. Los fumadores se han iniciado en la franja de edad de 18-20 años (16,4%). Han manifestado que lo hacen por gusto o costumbre (13,3%) o para ayudarles a controlar el estrés que les produce el grado. No se halló asociación significativa entre padres fumadores y estudiantes consumidores de tabaco (27,3%). **Conclusiones.** La prevalencia de tabaco entre los estudiantes del área de las ciencias de la salud en la universidad Complutense es baja, mayor en las mujeres que cursan primero de grado de Enfermería y Medicina entre los 18 y 20 años.

### Palabras clave

Tabaquismo, estudiantes, prevalencia, factores de riesgo

### Abstract

**Introduction.** Tobacco is a harmful substance that mainly causes cardiovascular diseases and different types of cancers. **Objectives.** We studied the prevalence of tobacco use among students of the health sciences area of the Complutense University (UCM) and the associated risk factors. **Material and methods.** A cross-sectional study was carried out during 2023. For the selection of the sample, non-probabilistic sampling was carried out among the students of health sciences at the UCM. The data were obtained through a questionnaire shared in social networks and messaging channels to the students of that University. A description was made using absolute frequencies and percentages. Prevalence was calculated using probabilities. **Results.** The questionnaire was answered by 128 students (84.4 % female). Of the sample, 71.4% did not use tobacco. Smokers started smoking in the 18-20 years age group (16.4%). They stated that they do it for pleasure or habit (13.3%) or to help them control the stress caused by the grade. No significant association was found between parents who smoke and students who use tobacco (27.3%). **Conclusions.** The prevalence of smoking among students of the health sciences at the Complutense University of Madrid is low, and is higher among women in the first year of nursing and medicine between 18 and 20 years of age.

### Keywords.

Tobacco Use Disorder, students, prevalence, risk factors

## **1. Introducción**

El tabaco es una sustancia perjudicial en todas sus formas y aspectos. Habitualmente es consumido en formato de cigarro, aunque hay otras como el tabaco picado, puritos, tabaco para pipa (1).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el tabaquismo genera pérdidas de dinero en países de ingresos medios o bajos, debido a la morbilidad y mortalidad que genera y los diferentes tratamientos necesarios. Cada año, más de 8 millones de personas mueren a causa del tabaco y 1,2 millones por una exposición directa al humo (1).

En el 2020 el 22,3% de la población mundial consumía tabaco, siendo el 36,7% hombres y el 7,8% mujeres (1). La media de consumo de tabaco entre los 27 países que conforman la Unión Europea fue de un 18,4% siendo en España un punto por encima de dicha media (4). Además, en 2020, el 16,4% de las mujeres y un 23,3% de los hombres españoles fumaban a diario, encontrándose España entre los diez países de la Unión Europea con más fumadores diarios (2). Los efectos negativos del consumo de esta sustancia dan lugar al padecimiento de enfermedades relacionadas la mayoría de ellas con el aparato respiratorio, siendo las más habituales la bronquitis crónica, el enfisema pulmonar, cáncer de laringe, de pulmón y bucofaríngeo. Otras, están ligadas al sistema cardiovascular como la hipertensión arterial, una angina de pecho, hemorragias y trombosis (3).

Además, genera impotencia sexual en hombres y mujeres es muy dado la osteoporosis o menopausia temprana con una media entre 2 y 3 años de forma prematura (3).

No se deben olvidar las personas que viven en hogares con personas fumadoras que se convierten en fumadores pasivos y tienen un riesgo más alto de padecer infartos agudos de miocardio, enfermedades cardiovasculares y cáncer de pulmón (5).

Por último, es de gran importancia destacar las nefastas consecuencias que el tabaco provoca en la salud mental y emocional de los sujetos que lo consumen. Provoca depresión y falta de autocontrol, ya que su consumo está relacionado con la sensación de relajación que produce (5).

## **2. Objetivos**

El objetivo general ha sido analizar el hábito tabáquico entre los estudiantes de los grados de ciencias de la salud de la Universidad Complutense (UCM). Como objetivo específico se ha examinado la prevalencia del tabaquismo según diferentes factores de riesgo.

## **3. Metodología**

Se ha realizado un muestreo no probabilístico por conveniencia, enviándose un cuestionario a través de redes sociales. La población elegida para este estudio han sido diferentes estudiantes de las facultades que componen el área de ciencias de la salud en la UCM. No se ha calculado el tamaño muestral debido a las dificultades de acceso a la población y por la baja tasa de respuesta esperada. Las variables incluidas en el estudio han sido el sexo (hombre/mujer), lugar de procedencia (Madrid/otras), carrera cursada (Enfermería, Medicina, Veterinaria, Farmacia, Fisioterapia, Psicología, Logopedia, Podología, Terapia Nutricional, Nutrición y Dietética, consumo de tabaco (Si, No, Ocasionalmente), tipo de fumador (No fumo, consumo habitual, lo he probado, muy puntual, ocasionalmente), por qué fuman (causa social, estrés y ansiedad, gusto y costumbre) y si tenían padres fumadores (sí/no), cigarros fumaban (1-3 cigarrillos, 4-6 cigarrillos, 7-9 cigarrillos, más de 10), años de consumo (meses, 1-3 años, 4-6 años, más de 6 años) y con cuántos años empezaron a fumar (11-15 años, 16-20 años). Se ha enviado un cuestionario a través de las redes sociales a los estudiantes que cursaban dichos grados durante

el periodo comprendido entre el 17 de febrero y el 21 de febrero de 2023. Se esperó para cerrar dicho cuestionario hasta el 22 de febrero, estando activo durante cinco días. No se ha enviado al Comité de Ética de la Universidad, pero si se hiciera un estudio más amplio para obtener resultados más interesantes, sería obligatorio su paso por dicho Comité. En relación con el análisis estadístico se han utilizado frecuencias absolutas y porcentajes para describir las variables cualitativas. Para describir las cuantitativas se ha empleado la media y la desviación típica. Para establecer la asociación de los diferentes factores de riesgo se llevaron a cabo las pruebas de chi cuadrado, T Student y ANOVA.

#### 4. Resultados

Del total de estudiantes a los que se envió el cuestionario, (dato que no se pudo conocer porque se envió a grupos y redes sociales) finalmente respondieron 128 personas, siendo el 84,4% mujeres, estudiantes en la franja entre los 18 y los 20 años (80,5 %), pertenecientes a los grados de enfermería (29,7 %) y medicina (25,8 %), cursando primer curso (66,4 %) (Tabla 1). En relación con la prevalencia de consumo, el 71,1 % no consume tabaco actualmente. De los consumidores se iniciaron en el tramo etario de los 16-20 años (16,4 %), el 18, 8 % ha intentado dejar de fumar alguna vez y manifiestan que consumen por gusto o costumbre (13,3 %), ayudándoles a controlar el estrés en el 12,5 % de los casos. De los fumadores el 27,3 % tiene algún familiar fumador, no hallándose asociación estadísticamente significativa en ningún caso (Tabla 2).

Tabla 1. Características de la muestra

	Total n (%)	
<b>Sexo</b>	Femenino	108 (84,4)
	Masculino	20 (15,6)
<b>Edad</b>	18-20 años	103 (80,5)
	21-24	23 (18,0)
	>25 años	2 (1,6)
<b>Lugar nacimiento</b>	Madrid	61 (47,7)
	Otros	67 (52,3)
<b>Grado</b>	Enfermería	38 (29,7)
	Medicina	33 (25,8)
	Veterinaria	8 (6,3)
	Farmacia	20 (15,6)
	Fisioterapia	2 (1,6)
	Psicología	5 (3,9)
	Logopedia	7 (5,5)
	Podología	8 (6,3)
	Terapia ocupacional	1 (0,8)
	Nutrición y dietética	6 (4,7)
<b>Curso</b>	Primero	85 (66,4)
	Segundo	26 (20,3)
	Tercero	8 (6,3)
	Cuarto	5 (3,9)
	Quinto	4 (3,1)
<b>Consumo de tabaco</b>	Sí	18 (14,1)
	No	91 (71,1)
<b>Años de inicio</b>	11-15 años	11 (8,6)
	16-20 años	21 (16,4)
<b>Cuántos cigarrillos fuma</b>	1-3 cigarrillos	4 (3,1)
	4-6 cigarrillos	2 (1,6)
	7-9 cigarrillos	6 (4,7)
	> 10 cigarrillos	12 (9,4)
<b>Años de consumo tabaco</b>	Meses	7 (5,5)
	1-3 años	19 (14,8)
	4-6 años	6 (4,7)



	> 6 años	1 (0,8)
<b>Tipo de consumo</b>	No fumo	71 (55,5)
	consumo habitual	17 (13,3)
	lo he probado	19 (14,8)
	Muy puntual	15 (11,7)
	ocasionalmente	6 (4,7)
<b>¿Ha intentado dejarlo?</b>	Sí	24 (18,8)
	No	11 (8,6)
<b>¿Padres o familiares fuman?</b>	Sí	35 (27,3)
	No	11 (8,6)
<b>Motivo fuma</b>	Causa social	11 (8,6)
	Estrés y ansiedad	12 (9,4)
	Gusto y costumbre	17 (13,3)
<b>Ayuda a controlar el estrés</b>	Sí	16 (12,5)
	Tal vez	11 (8,6)
	No	14 (10,9)

Fuente: elaboración propia

Tabla 2. Prevalencia del consumo de tabaco en función de diferentes factores de riesgo

		Consumo tabaco			p-valor
		Sí n(%)	No n(%)	Ocasionalmente n(%)	
<b>Sexo</b>	Femenino	13 (72,2)	78 (85,7)	17 (89,5)	0,284
	Masculino	5 (27,8)	13 (14,3)	2 (10,5)	
<b>Edad</b>	18-20 años	15 (83,3)	71 (78,0)	17 (89,5)	0,762
	21-24	3 (16,7)	18 (19,8)	2 (10,5)	
	>25 años	0 (0,0)	2 (2,2)	0 (0,0)	
<b>Lugar nacimiento</b>	Madrid	9 (50,0)	43 (47,3)	9 (47,4)	0,977
	Otros	9 (50,0)	48 (52,7)	10 (14,9)	
<b>Grado</b>	Enfermería	5 (27,8)	26 (28,6)	7 (36,8)	0,826
	Medicina	4 (22,2)	24 (72,7)	5 (26,3)	
	Veterinaria	2 (11,1)	5 (62,5)	1 (5,3)	
	Farmacia	4 (22,2)	15 (16,5)	1 (5,3)	
	Fisioterapia	0 (0,0)	2 (2,2)	0 (0,0)	
	Psicología	1 (5,6)	3 (3,3)	1 (5,3)	
	Logopedia	0 (0,0)	4 (4,4)	3 (15,8)	
	Podología	2 (11,1)	6 (6,6)	0 (0,0)	
	Terapia ocupacional	0 (0,0)	1 (1,1)	0 (0,0)	
Nutrición y dietética	0 (0,0)	5 (5,5)	1 (5,3)		
<b>Curso</b>	Primero	12 (66,7)	60 (65,9)	13 (68,4)	0,762
	Segundo	4 (22,2)	17 (18,7)	5 (26,3)	
	Tercero	2 (11,1)	5 (5,5)	1 (5,3)	
	Cuarto	0 (0,0)	5 (5,5)	0 (0,0)	
	Quinto	0 (0,0)	4 (4,4)	0 (0,0)	

Fuente: elaboración propia

## 5. Discusión

El porcentaje de respuesta al cuestionario no fue muy elevado haciendo que la muestra fuera pequeña y poco representativa. Si se comparan los resultados de prevalencia de este estudio con otros europeos, nuestros estudiantes parece que fuman menos (14,1 %) que los de un estudio que se realizó en Grecia en 2021 dónde fumaban el 35%, siendo mayormente mujeres (65 %), resultados similares a los nuestros <sup>(6)</sup>. Sin embargo, otro estudio hecho en Pamplona en 2016 habla de una prevalencia del 15%, siendo el consumo mayor en hombres, (11 %) <sup>(6)</sup>. En el caso de este estudio, el consumo de tabaco entre los estudiantes de la Universidad Complutense es de 14,1% y siendo algo mayor en las mujeres, tanto las fumadoras como las personas que lo hacen de manera ocasional <sup>(7)</sup>. Por ello, se puede establecer que es diferente el consumo que se

realiza en España en comparación con otros países, como en el caso que se ha expuesto, el hábito de consumo de tabaco es mucho mayor en Grecia que en España. Al igual que vemos que la diferencia entre el consumo de tabaco entre los estudiantes de la Universidad de Pamplona y de la Universidad Complutense es poca. Se puede ver que el consumo ha decaído de 15 a 14 desde 2017 hasta 2023, por lo que esto se puede asociar con el éxito de las diferentes campañas para disminuir el consumo. También parece que el hábito ha aumentado entre las mujeres. También hay que tener en cuenta que puede ser que los que no consumen tabaco se hayan animado a contestar el cuestionario frente a los que si consumen de forma habitual. Sería interesante hacer un estudio en profundidad sobre el hábito tabáquico en los estudiantes de la UCM y luego hacerlo extensivo al resto de universidades de la CCAA de Madrid, para dedicar más recursos a campañas de promoción de la salud entre estudiantes. En cuanto a las limitaciones del estudio, no se realizó un muestreo probabilístico por lo que la muestra no ha sido representativa de la población estudiada. Al no estratificar por sexo, grupo etario, grado o curso algunos estratos han estado sobre o infra representados. Por tanto, no se ha podido Inferenciar a la población de origen.

### **Conclusiones**

La prevalencia de consumo de tabaco entre los universitarios de los grados de ciencias de la salud es baja. Parece que fuman más, las mujeres de los grados de enfermería y medicina que están cursando primero y con edades entre los 18 y 20 años.

### **Referencias bibliográficas**

1. Organización Mundial de la Salud. Tabaco [Internet]. Publicado el 25 de mayo de 2022 [citado el 17 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/tobacco>
2. Instituto Nacional de Estadística. Determinantes de salud (consumo de tabaco, exposición pasiva al humo del tabaco, problemas ambientales en la vivienda) [Internet]. Publicado el 8 de agosto de 2022 [citado el 18 de febrero de 2023]. Disponible en: [https://www.ine.es/ss/Satellite?L=es\\_ES&c=INESeccion\\_C&cid=1259926698156&p=1254735110672&pagename=ProductosYServicios%2FPYSLayout](https://www.ine.es/ss/Satellite?L=es_ES&c=INESeccion_C&cid=1259926698156&p=1254735110672&pagename=ProductosYServicios%2FPYSLayout)
3. Plan Nacional sobre Drogas. ¿Qué riesgos y consecuencias tiene el consumo de tabaco? [Internet]. Publicado 4 de mayo de 2020 [citado el 17 de febrero de 2023] Disponible en: <https://pnsd.sanidad.gob.es/ciudadanos/informacion/tabaco/home.htm>
4. Espinosa J. España, entre los diez países de la UE con más fumadores diarios [Internet]. Neutral. 30 de mayo de 2022 [citado el 18 de febrero del 2023]. Disponible en: <https://www.newtral.es/espana-fumadores-diarios-union-europea/20220530/>
5. Psicólogos Madrid Capital. Efectos negativos del Tabaco para la Salud Física y Mental [Internet]. Publicado el 30 de mayo de 2022 [citado el 18 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://www.psicologosmadridcapital.com/blog/efectos-negativos-tabaco-salud-fisica-salud-emocional/>
6. Papagiannis D, Malli F, Papathanasiou IV, Routis P, Fradelos E, Kontopoulou L, et al. Attitudes and smoking prevalence among undergraduate students in Central Greece. Adv Exp Med Biol [Internet]. 2021 [citado el 17 de marzo de 2023];1339:1–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35023083/>
7. Mantilla-Tolosa SC, Villamizar CE, Peltzer K. Consumo de alcohol, tabaquismo y características sociodemográficas en estudiantes universitarios. Univ Salud [Internet]. 2016 [citado 17 de marzo de 2023] Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0124-71072016000100002](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0124-71072016000100002)

**76831: Corea de Huntington: acercando la fisioterapia a las enfermedades raras. Huntington's disease: a Physical Therapy approach to rare diseases****Área de conocimiento:** FISIOTERAPIA**Autor(es):** Laura de Francisco, Carmen de Aguilar Cañellas, Ines Christien Sánchez**Tutor(es):** Ángela Concepción Álvarez Melcón**Universidad:** Universidad Complutense de Madrid**Facultad:** Facultad de Enfermería, Fisioterapia y Podología**Titulación:** Grado en Fisioterapia**Formato:** Póster - Investigación clínica**Palabras Clave:** Enfermedad de Huntington, Fisioterapia, Tratamiento, Rehabilitación. Huntington's disease, Physical Therapy, Treatment, Rehabilitation

La enfermedad de Huntington (EH) es una enfermedad neurodegenerativa que presenta una herencia autosómica dominante y cursa con síntomas motores de tipo corea; psiquiátricos como apatía, y psicosis; y deterioro cognitivo; actualmente es una enfermedad incurable que lleva al encamamiento. La prevalencia actual es de 13,7 de cada 100.000 habitantes. El impacto en la calidad de vida comienza con el diagnóstico de un pariente cercano y se ve aumentado por la falta de concienciación sobre las enfermedades raras.

El objetivo del presente trabajo es determinar los tratamientos de fisioterapia aplicables en EH, basados en la evidencia, indicando una propuesta en un caso clínico. Para realizar este trabajo se contactó con la Asociación de Corea de Huntington Española (ACHE), y posteriormente, se procedió a la búsqueda en bases de datos científicas: PubMed, PEDro y Cochrane Library. En base a esto, se planteó el tratamiento fisioterápico para un caso clínico de un paciente diagnosticado de EH, que a su vez recibió tratamiento farmacológico conservador orientado a paliar los trastornos motores y psicológicos.

La investigación disponible actualmente indica entre los mejores tratamientos: ejercicios aeróbicos, como el cicloergómetro; los ejercicios de fuerza, entre lo que destacamos el método Kabat, con aplicaciones en la reeducación de la marcha; y el trabajo respiratorio y de la deglución para reducir las aspiraciones, una de las principales causas de muerte. Destacamos también la importancia de las transferencias seguras y la educación de los cuidadores.

A pesar del buen resultado de estos estudios, la investigación de la EH es muy reducida, especialmente en el área de la fisioterapia. Consideramos que se debe seguir investigando desde un punto de vista multidisciplinar, para mejorar la calidad de vida de estos pacientes, sobre todo en el ámbito respiratorio.

Huntington's disease (HD) is an autosomal dominant, inherited, neurodegenerative disease. It presents with various symptoms: motor symptoms such as chorea; psychiatric with apathy, and psychosis; and cognitive decline. It is currently an incurable disease which significantly affects quality of life, leading to bed rest. Its prevalence is approximately 13,7 out of 100.000 inhabitants. The aim of this study is to determine the physiotherapy treatments applicable in HD, based on evidence, indicating a proposal for a clinical case.

In order to carry out this work, the Spanish Huntington's Disease Association (ACHE) was contacted, and subsequently, a search was carried out in scientific databases: PubMed, PEDro and Cochrane Library, of articles published in the last 5 years, with the keywords "Huntington Disease" and "Physical Therapy". Based on this, physical therapy treatment was proposed for a clinical case of a patient diagnosed with HD, who was also receiving pharmacological treatment aimed at alleviating motor and psychological disorders.

Currently available research indicates that the best treatments include: aerobic exercise (cycloergometer); strength training specially with Kabat techniques applied to gait rehabilitation; and respiratory and swallowing exercises to avoid aspirations (one of the main causes of death in HD) and improving expectoration. We should also highlight the importance of safe transfers and caregivers' education.

Despite the good results these studies provide, research on HD is still lacking, specially within physical therapy modalities. We consider there is still much research to be done to improve these patients' quality of life, more so in the respiratory field and multidisciplinary team.

## **Corea de Huntington: acercando la fisioterapia a las enfermedades raras**

### **Huntington's Disease: a Physical Therapy approach to rare diseases**

1522970 Laura de Francisco Sánchez, [laurdefr@ucm.es](mailto:laurdefr@ucm.es), 1522972 Carmen de Aguilar Cañellas, [cdeagu01@ucm.es](mailto:cdeagu01@ucm.es), 1458947 Ines Christien Sánchez, [inchri01@ucm.es](mailto:inchri01@ucm.es)

Tutor: Dra. Ángela Concepción Álvarez Melcón. [angela.alvarez@ucm.es](mailto:angela.alvarez@ucm.es)

Facultad de Enfermería, Fisioterapia y Podología, Universidad Complutense de Madrid

**Abstract:** La enfermedad de Huntington (EH) es una enfermedad neurodegenerativa que presenta una herencia autosómica dominante y cursa con síntomas motores de tipo corea; psiquiátricos como apatía, y psicosis; y deterioro cognitivo; actualmente es una enfermedad incurable que lleva al encamamiento. La prevalencia actual es de 13,7 de cada 100.000 habitantes. El impacto en la calidad de vida comienza con el diagnóstico de un pariente cercano y se ve aumentado por la falta de concienciación sobre las enfermedades raras. El objetivo del presente trabajo es determinar los tratamientos de fisioterapia aplicables en EH, basados en la evidencia, indicando una propuesta en un caso clínico. Para realizar este trabajo se contactó con la Asociación de Corea de Huntington Española (ACHE), y posteriormente, se procedió a la búsqueda en bases de datos científicas: PubMed, PEDro y Cochrane Library. En base a esto, se planteó el tratamiento fisioterápico para un caso clínico de un paciente diagnosticado de EH, que a su vez recibió tratamiento farmacológico conservador orientado a paliar los trastornos motores y psicológicos. La investigación disponible actualmente indica entre los mejores tratamientos: ejercicios aeróbicos, como el cicloergómetro; los ejercicios de fuerza, entre lo que destacamos el método Kabat, con aplicaciones en la reeducación de la marcha; y el trabajo respiratorio y de la deglución para reducir las aspiraciones, una de las principales causas de muerte. Destacamos también la importancia de las transferencias seguras y la educación de los cuidadores. A pesar del buen resultado de estos estudios, la investigación de la EH es muy reducida, especialmente en el área de la fisioterapia. Consideramos que se debe seguir investigando desde un punto de vista multidisciplinar, para mejorar la calidad de vida de estos pacientes, sobre todo en el ámbito respiratorio.

**Palabras clave:** Enfermedad de Huntington, Fisioterapia, Tratamiento, Rehabilitación

**Abstract:** Huntington's disease (HD) is an autosomal dominant, inherited, neurodegenerative disease. It presents with various symptoms: motor symptoms such as chorea; psychiatric with apathy, and psychosis; and cognitive decline. It is currently an incurable disease which significantly affects quality of life, leading to bed rest. Its prevalence is approximately 13,7 out of 100.000 inhabitants. The aim of this study is to determine the physiotherapy treatments applicable in HD, based on evidence, indicating a proposal for a clinical case. In order to carry out this work, the Spanish Huntington's Disease Association (ACHE) was contacted, and subsequently, a search was carried out in scientific databases: PubMed, PEDro and Cochrane Library, of articles published in the last 5 years, with the keywords "Huntington Disease" and "Physical Therapy". Based on this, physical therapy treatment was proposed for a clinical case of a patient diagnosed with HD, who was also receiving pharmacological treatment aimed at alleviating motor and psychological disorders. Currently available research indicates that the best treatments include: aerobic exercise (cycloergometer); strength training specially with Kabat techniques applied to gait rehabilitation; and respiratory and swallowing exercises to avoid aspirations (one of the main causes of death in HD) and improving expectoration. We should also highlight the importance of safe transfers and caregivers' education. Despite the good results these studies provide, research on HD is still lacking, specially within physical therapy modalities. We consider there is still much research to be done to improve these patients' quality of life, more so in the respiratory field and multidisciplinary team.

**Keywords:** Huntington's disease, Physical Therapy, Treatment, Rehabilitation

## 1.Introducción

La enfermedad de Huntington (EH) es una enfermedad neurodegenerativa que normalmente se manifiesta en la edad adulta. Presenta una herencia autosómica dominante y se expresa mediante síntomas motores, psiquiátricos y deterioro cognitivo. (1) Se produce por una repetición del trinucleótido CAG en el primer exón del gen HTT (Huntingtin). El resultado es que la proteína (Huntingtina) que se codifica a partir de ese gen queda mutada (mHTT), no se pliega adecuadamente y se acumula en áreas del cerebro, alterando su funcionamiento adecuado. Este gen se encuentra en el cuarto cromosoma y se desarrollará la enfermedad si se repite el CAG más de 39 veces. Entre 36 y 39 repeticiones hay baja penetrancia, 27-35 hay riesgo intermedio y <27 es negativo, fisiológico. Según va aumentando, se reduce la edad a la que empiezan a aparecer los síntomas. La anticipación (que el descendiente la desarrolle antes que el progenitor) es más frecuente cuando el portador del gen es el padre (2). Se produce atrofia de los ganglios basales incluyendo el núcleo caudado y putamen (máxima degeneración), globo pálido y núcleo subtalámico y materia blanca subcortical (3) junto con una alteración en los niveles de neurotransmisores (1). A medida que la enfermedad progresa se va observando pérdida de neuronas en áreas talámica e hipotalámica y finalmente en todo el cerebro. (3) La prevalencia es de 10.6-13.7 individuos de cada 100.000 en poblaciones occidentales. Japón, Taiwan y Hong Kong tienen una incidencia mucho menor; en Sudáfrica hay menor incidencia en raza negra comparado con caucásicos y mixtos. Esto se debe a diferencias genéticas en el gen HTT (2).

En cuanto a los síntomas motores, son progresivos. El más característico es la corea pero también se produce discinesia (dificultad para realizar movimientos voluntarios), síntomas oculomotores y distonía (contracción muscular involuntaria). En general estos síntomas se caracterizan por la dificultad para mantener una contracción muscular voluntaria. Los síntomas psiquiátricos normalmente se manifiestan antes que los motores e incluyen apatía, depresión, ansiedad, alteraciones del sueño, demencia progresiva (1) y comportamientos obsesivo-compulsivos y psicosis (2). La EH también cursa con deterioro cognitivo, caracterizado por dificultades para concentrarse y retener información nueva, deterioro en habilidades lingüísticas, discurso desorganizado y problemas de percepción. (1).

El objetivo de este trabajo es analizar la evidencia actual en el tratamiento fisioterápico de la EH y elaborar un plan de tratamiento, basado en los mejores resultados de esta investigación, para un caso clínico de EH que se describe a continuación: Mujer de 33 años diagnosticada de EH mediante test genético en mayo de 2004 con una carga genética alta de la enfermedad. A la primera evaluación presenta anomalías motoras inespecíficas como habla poco fluida y mínima inestabilidad de la marcha. La paciente se pierde el seguimiento hasta mayo de 2019, cuando ingresa en un centro neuropaliativo, y se observa un empeoramiento con corea severa, pérdida de peso marcada, deterioro cognitivo avanzado y alteraciones como adicción a múltiples sustancias y hasta 3 intentos de suicidio. Se aplica tratamiento farmacológico con Haloperidol 0,5mg y posteriormente 1,5mg, con un resultado de ausencia de corea en reposo. También se aplican medidas de protección para las caídas y otros cuidados inespecíficos (4).

## 2.Material y métodos

La metodología utilizada para este trabajo fue bien meditada con el objetivo de presentar un caso cercano a la realidad y con un enfoque personal. Se decidió contactar vía mail con la Asociación de Corea de Huntington Española (ACHE) para obtener información y puntos de vista diferentes a los que se pueden encontrar en los recursos bibliográficos. Fueron

dos horas de conversación enriquecedora con Ruth Blanco, Presidenta de la ACHE. Posteriormente, se procedió a la búsqueda en bases de datos científicas: PubMed, PEDro y Cochrane Library.

En PubMed, se usaron los términos MESH "Huntington Disease" y "Physical Therapy Modalities" con los filtros free full text y textos publicados en los últimos 5 años. En PEDro, se usaron los términos Physical Therapy y Huntington en Abstract & Title unidos por el operador booleano AND, y publicaciones desde 2017. En Cochrane Library se usaron los términos de Huntington Disease en Title Abstract Keyword y Physical Therapy unidos por el operador booleano AND.

Nuestros criterios de elegibilidad se basaron en artículos publicados en los últimos 5 años, de idioma accesible y que tuvieran un enfoque fisioterápico en el programa de tratamiento. Del total de resultados (= 19), se eligieron 12 que cumplieren los criterios establecidos. Debido al gran número de revisiones sistemáticas se aceptaron a su vez artículos procedentes de dichas revisiones, constituyendo una lista final de 21 recursos bibliográficos elegidos para la elaboración del trabajo.

### 3.Resultados

En base a la investigación disponible actualmente y la fisiopatología de la EH que nos ayuda a comprender las necesidades del paciente, nos centramos en la elaboración de un plan de tratamiento desde la fisioterapia que se centre en los síntomas motores de la paciente, así como su impacto en la salud mental.

Para ello, empezaremos con un plan de ejercicio aeróbico, para el que hemos encontrado evidencia de grado A en la mejoría de la función motora (5). En base a la evidencia (6), hemos definido nuestro programa con un calentamiento de 5 minutos, seguido de una franja de ejercicio aeróbico de 25 minutos en cicloergómetro o caminando según las posibilidades del paciente y si podemos conseguir una marcha segura. Para terminar haríamos 5 minutos de estiramientos y vuelta a la calma. Esto lo repetiremos 3 veces por semana, durante un mínimo de 12 semanas (7).

Los ejercicios de fuerza, en combinación con el trabajo aeróbico, han demostrado tener beneficios en la marcha y los aspectos espacio temporales, por medio de la facilitación neuromuscular propioceptiva (5), con una dosis de 90 minutos por sesión, 3 veces a la semana. En general, el ejercicio aeróbico y de resistencia ha demostrado ser seguro y beneficioso cuando es aplicado 3-4 veces por semana, con una duración de 30-50 minutos durante al menos 12 semanas a intensidad moderada (5, 6, 8, 9, 10).

El ejercicio respiratorio lo realizaremos con 5 series de 5 repeticiones de inspiraciones y espiraciones resistidas, con una resistencia del 30%, aumentando hasta un 75% de la presión respiratoria máxima de cada paciente durante cuatro meses, con una dosis de 6 sesiones a la semana (11). Esto ha demostrado mejoría en la capacidad vital forzada y otros parámetros de la espirometría que sugieren mejor función respiratoria, así como pequeños beneficios no muy significativos en la disnea y la deglución (11).

La deglución puede verse alterada hasta en estadios iniciales de la enfermedad, incluso cuando los síntomas motores todavía no son evidentes (12, 13), por lo que tratarla y dar pautas a pacientes y cuidadores es esencial. Para ello daremos directrices de maniobras compensatorias como llevar la comida a la zona de los molares, para asegurar que sea bien triturada (12, 14), recomendaciones posturales para minimizar los movimientos involuntarios (15) como la postura neutral del cuello o la maniobra chin tuck para reducir el rango de los

órganos fonoarticulares (14, 16). También podemos recurrir a la estimulación sensorial, ya que las comidas frías y ácidas mejoran el inicio de la fase oral de la deglución, reduce el retraso de la fase faríngea y disminuye los movimientos involuntarios y la frecuencia de aspiración (12, 17, 18). Por último podemos hacer modificaciones en la consistencia del alimento, ya que cuanto más viscoso sea el alimento, tendrá menos posibilidades de penetración en la vía aérea inferior (12, 19).

Debido a la alta tasa de caídas en la enfermedad de Huntington, es importante que el fisioterapeuta intervenga en este aspecto enseñando a paciente y cuidador maneras seguras de hacer transferencias, sobre todo centradas de sedestación a bipedestación y en la postura de bipedestación. Esto lo haremos dos veces a la semana durante al menos 8 semanas (20).

Consideramos que como parte del tratamiento del paciente con Corea de Huntington también debemos tener en cuenta el aspecto social de la patología, ya que es muy aislante y el aspecto psicológico se ve muy afectado. Para ello nos parece importante el papel de las asociaciones, tanto para el paciente como para el cuidador, como la Asociación Corea de Huntington Española, que ofrece servicios como el Café del Cuidador, en el que los cuidadores de los pacientes con EH comparten experiencias y sienten el apoyo mutuo (21).

#### 4. Conclusiones

A pesar de los buenos resultados de los estudios elegidos para elaborar este trabajo, la investigación de la EH todavía es muy reducida, sobre todo en el campo de la fisioterapia, y en especial en el área respiratoria. Consideramos de vital importancia que se siga avanzando en la creación de protocolos estandarizados debido a su naturaleza de enfermedad rara, que puedan ser aplicados en numerosos casos de esta patología a menudo descuidada. No debemos olvidar su aspecto social y el impacto en el entorno cercano al paciente, al tener un carácter genético y sus grandes implicaciones psiquiátricas. Por último destacamos la utilidad del equipo multidisciplinar, ya que las implicaciones, como ya se ha mencionado, no son solo motoras y se debe incluir en el tratamiento del paciente con EH un neuropsicólogo, así como un neurólogo, neumólogo, fisioterapeuta y terapeuta ocupacional o logopeda.

#### 5. Referencias bibliográficas

- (1) Pandey M, Rajamma U. Huntington's disease: the coming of age. *J Genet* [Internet]. 2018;97(3):649–64. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30027901/>
- (2) McColgan P, Tabrizi SJ. Huntington's disease: a clinical review. *Eur J Neurol* [Internet]. 2018;25(1):24–34. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/ene.13413>
- (3) Tabrizi SJ, Estevez-Fraga C, van Roon-Mom WMC, Flower MD, Scahill RI, Wild EJ, et al. Potential disease-modifying therapies for Huntington's disease: lessons learned and future opportunities. *Lancet Neurol* [Internet]. 2022 ;21(7):645–58. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35716694/>
- (4) Shah R, CM Lee S, Strasser RB, Grossman C. An Australian Neuro-Palliative perspective on Huntington's disease: a case report. *BMC*. 2021. <https://doi.org/10.1186/s12904-021-00744-z>
- (5) Quinn L, Kegelmeyer D, Kloos A, Rao AK, Busse M, Fritz NE. Clinical recommendations to guide physical therapy practice for Huntington disease. *Neurol*. 2020;94:217-228. doi:10.1212/WNL.0000000000008887 Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31907286/>
- (6) Thompson JA, Cruickshank TM, Penailillo LE, Lee JW, Newton RU, Barker RA, Ziman MR. The effects of multidisciplinary rehabilitation in patients with early-to-middle-stage Huntington's disease: a pilot study. *Eur J Neurol*. 2013 Sep;20(9):1325-9. doi: 10.1111/ene.12053. Epub 2012 Dec 7. PMID: 23216520. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23216520/>



- (7) Fritz NE, Rao AK, Kegelmeyer D, Kloos A, Busse M, Hartel L, Carrier J, Quinn L. Physical Therapy and Exercise Interventions in Huntington's Disease: A Mixed Methods Systematic Review. *J Huntingtons Dis.* 2017;6(3):217-235. doi: 10.3233/JHD-170260. PMID: 28968244; PMCID: PMC5676854. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28968244/>
- (8) Busse M, Quinn L, Debono K, Jones K, Collett J, Playle R, Kelly M, Simpson S, Backx K, Wasley D, Dawes H, Rosser A; Members of the COMMET-HD Management Group. A randomized feasibility study of a 12-week community-based exercise program for people with Huntington's disease. *J Neurol Phys Ther.* 2013 Dec;37(4):149-58. doi: 10.1097/NPT.000000000000016. PMID: 24232362. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24232362/>
- (9) Quinn L, Hamana K, Kelson M, Dawes H, Collett J, Town-son J, et al. A randomized, controlled trial of a multi-modal exercise intervention in Huntington's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2016;31:46-52. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27423921/>
- (10) Dawes H, Collett J, Debono K, Quinn L, Jones K, Kelson MJ, Simpson SA, Playle R, Backx K, Wasley D, Nemeth AH, Rosser A, Izardi H, Busse M. Exercise testing and training in people with Huntington's disease. *Clin Rehabil.* 2015 Feb;29(2):196-206. doi: 10.1177/0269215514540921. Epub 2014 Aug 20. PMID: 25142278. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25142278/>
- (11) Reyes A, Cruickshank T, Nosaka K, Ziman M. Respiratory muscle training on pulmonary and swallowing function in patients with Huntington's disease: a pilot randomised controlled trial. *Clin Rehabil.* 2015 Oct;29(10):961-73. doi: 10.1177/0269215514564087. Epub 2014 Dec 31. PMID: 25552526. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25552526/>
- (12) Camargo-Mendoza M, Castillo-Triana N, Fandiño-Cardona JM, Mateus-Moreno A, Moreno-Martínez M. [Speech, language and swallowing in Huntington' Disease]. *Rev. Fac. Med.* 2017;65(2):343-8. Spanish. doi: <http://dx.doi.org/10.15446/revfacmed.v65n2.57449>.
- (13) Aziz NA, Anguelova GV, Marinus J, van Dijk JG, Roos RA. Autonomic symptoms in patients and pre-manifest mutation carriers of Huntington's disease. *Eur J Neurol.* 2010 Aug;17(8):1068-74. doi: 10.1111/j.1468-1331.2010.02973.x. Epub 2010 Feb 24. PMID: 20192977. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20192977/>
- (14) Heemskerk AW, Roos RA. Dysphagia in Huntington's disease: a review. *Dysphagia.* 2011 Mar;26(1):62-6. doi: 10.1007/s00455-010-9302-4. Epub 2010 Sep 14. PMID: 20838817. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20838817/>
- (15) Kagel MC, Leopold NA. Dysphagia in Huntington's disease: a 16-year retrospective. *Dysphagia.* 1992;7(2):106-14. doi: 10.1007/BF02493441. PMID: 1533361. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1533361/>
- (16) Nance MA. Therapy in Huntington's disease: where are we? *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2012 Aug;12(4):359-66. doi: 10.1007/s11910-012-0277-4. PMID: 22544535. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22544535/>
- (17) Logemann JA, Pauloski BR, Colangelo L, Lazarus C, Fujiu M, Kahrilas PJ. Effects of a sour bolus on oropharyngeal swallowing measures in patients with neurogenic dysphagia. *J Speech Hear Res.* 1995 Jun;38(3):556-63. doi: 10.1044/jshr.3803.556. PMID: 7674647. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7674647/>
- (18) Pelletier CA, Lawless HT. Effect of citric acid and citric acid-sucrose mixtures on swallowing in neurogenic oropharyngeal dysphagia. *Dysphagia.* 2003 Fall;18(4):231-41. doi: 10.1007/s00455-003-0013-y. PMID: 14571326. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14571326/>
- (19) Clavé P, Arreola V, Romea M, Medina L, Palomera E, Serra-Prat M. Accuracy of the volume-viscosity swallow test for clinical screening of oropharyngeal dysphagia and aspiration. *Clin Nutr.* 2008 Dec;27(6):806-15. doi: 10.1016/j.clnu.2008.06.011. Epub 2008 Sep 11. PMID: 18789561. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18789561/>
- (20) Quinn L, Debono K, Dawes H, Rosser AE, Nemeth AH, Rickards H, Tabrizi SJ, Quarrell O, Trender-Gerhard I, Kelson MJ, Townson J, Busse M; members of the TRAIN-HD project group.



Task-specific training in Huntington disease: a randomized controlled feasibility trial. *Phys Ther.* 2014 Nov;94(11):1555-68. doi: 10.2522/ptj.20140123. Epub 2014 Jul 10. PMID: 25012999. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25012999/>  
(21) Material aportado por Ruth Blanco, directora de la Asociación Corea de Huntington Española <https://www.e-huntington.es/>

**76905: EVOLUCIÓN DE LOS PACIENTES CON FASCITIS PLANTAR TRAS INFILTRACIÓN CON PLASMA RICO EN PLAQUETAS (PRP)./EVOLUTION OF PATIENTS WITH PLANTAR FASCIITIS AFTER PLATELET-RICH PLASMA INFILTRATION (PRP).****Área de conocimiento:** PODOLOGÍA**Autor(es):** Ana Arévalo Díaz, Duna Gil de Gómez Jiménez, Rodrigo Sánchez Naranjo**Tutor(es):** Alejandra Sierra Rodríguez, Aroa Tardáguila García**Universidad:** Universidad Complutense de Madrid.**Facultad:** Facultad de Enfermería, Fisioterapia y Podología.**Titulación:** Grado en Podología**Formato:** Comunicación Oral - Investigación clínica**Palabras Clave:** Palabras clave: fascitis plantar, tratamiento conservador, no cirugía, plasma rico en plaquetas./Keywords: plantar fasciitis, conservative treatment, nonsurgical, platelet-rich plasma.**Resumen**

La fascitis plantar es la causa más común del dolor en talón plantar en adultos. Es el resultado de la tensión repetitiva de la fascia plantar en su origen en el tubérculo medial del calcáneo produciendo un proceso degenerativo de la misma. El tratamiento con infiltración de plasma rico en plaquetas (PRP) ha surgido como una opción de tratamiento potencial más nueva y novedosa para la fascitis plantar crónica. Hipótesis: La sintomatología dolorosa de los pacientes con fascitis plantar mejoran cuando reciben una infiltración de PRP. Objetivo: Valorar el efecto del PRP en el alivio de la sintomatología dolorosa secundaria a la fascitis plantar. Metodología: Se ha realizado un estudio retrospectivo. Todos los datos para el estudio se han obtenido de la Unidad de Patología y Ortopedia de Clínica de la Universidad Complutense de Madrid. Las características y variables de los pacientes se han extraído de las historias clínicas correspondientes. Se reclutaron aquellos pacientes siguiendo los criterios de inclusión exclusión especificados. Resultados: Se incluyeron en el estudio un total de 24 pacientes con diagnóstico de fascitis plantar. En el punto de mejoría de dolor, hubo diferencias estadísticamente significativas entre muestras relacionadas pre-post dolor matutino ( $p < 0,001$  (OR 1,167, respectivamente)). Los pacientes que tuvieron tratamiento previo con ondas de choque y que posteriormente fueron infiltrados con PRP tuvieron una curación estadísticamente significativa con respecto al resto de tratamientos previos ( $p = 0,021$  (OR 0,410, respectivamente)). Conclusión: Los pacientes que han recibido tratamiento para la fascitis plantar mediante infiltración con PRP han mejorado su sintomatología dolorosa. Aquellos pacientes tratados previamente con ondas de choque experimentaron tras la infiltración con PRP como segunda opción de tratamiento una mejoría completa de su sintomatología.

Palabras clave: fascitis plantar, tratamiento conservador, no cirugía, plasma rico en plaquetas.

**Abstract**

Plantar fasciitis is the most common cause of plantar heel pain in adults. It results from repetitive strain of the plantar fascia at its origin in the medial calcaneal tubercle leading to a degenerative process of the plantar fascia. Platelet-rich plasma (PRP) infiltration therapy has emerged as a newer and novel potential treatment option for chronic plantar fasciitis. Hypothesis: The painful symptomatology of patients with plantar fasciitis improves when they receive PRP infiltration. Aim: To assess the effect of PRP in the relief of painful symptomatology secondary to plantar fasciitis. Methods: A retrospective study was carried out. All the data for the study were obtained from the Clinical Pathology and Orthopedics Unit of the Complutense University of Madrid. Patient characteristics and variables were extracted from the corresponding medical records. Patients were recruited following the specified inclusion and exclusion criteria. Results: A total of 24 patients with a diagnosis of plantar fasciitis were included in the study. At the point of pain improvement, there were statistically significant differences between related samples pre-post morning pain ( $p < 0.001$  (OR 1.167, respectively)). Patients who had previous shockwave treatment and were subsequently infiltrated with PR had statistically significant healing with respect to all other previous treatments ( $p = 0.021$  (OR 0.410, respectively)). Conclusion: Patients who have received treatment for plantar fasciitis by infiltration with PR have improved their painful symptomatology. Those patients previously treated with shock waves experienced after infiltration with PR as a second treatment option a complete improvement of their symptomatology.

Keywords: plantar fasciitis, conservative treatment, nonsurgical, platelet-rich plasma.

## EVOLUCIÓN DE LOS PACIENTES CON FASCITIS PLANTAR TRAS INFILTRACIÓN CON PLASMA RICO EN PLAQUETAS (PRP). EVOLUTION OF PATIENTS WITH PLANTAR FASCIITIS AFTER PLATELET- RICH PLASMA INFILTRATION (PRP).

### Autores:

Autor 1, Ana Arévalo Díaz: 1469976, [anaareva@ucm.es](mailto:anaareva@ucm.es)

Autor 2, Duna Gil de Gómez Jiménez: 1507269, [dunagild@ucm.es](mailto:dunagild@ucm.es)

Autor 3, Rodrigo Sánchez Naranjo: 1507714, [rodrsa03@ucm.es](mailto:rodrsa03@ucm.es)

### Tutoras:

Alejandra Sierra Rodríguez: [asierr02@ucm.es](mailto:asierr02@ucm.es)

Aroa Tardáguila García: [aroa.tardaguila@ucm.es](mailto:aroa.tardaguila@ucm.es)

### Afiliación:

Facultad de Enfermería, Fisioterapia y Podología. Universidad Complutense de Madrid.

### RESUMEN

La fascitis plantar es la causa más común del dolor en talón plantar en adultos. Es el resultado de la tensión repetitiva de la fascia plantar en su origen en el tubérculo medial del calcáneo produciendo un proceso degenerativo de la misma. El tratamiento con infiltración de plasma rico en plaquetas (PRP) ha surgido como una opción de tratamiento potencial más nueva y novedosa para la fascitis plantar crónica. **Hipótesis:** La sintomatología dolorosa de los pacientes con fascitis plantar mejoran cuando reciben una infiltración de PRP. **Objetivo:** Valorar el efecto del PRP en el alivio de la sintomatología dolorosa secundaria a la fascitis plantar. **Metodología:** Se ha realizado un estudio retrospectivo. Todos los datos para el estudio se han obtenido de la Unidad de Patología y Ortopedia de Clínica de la Universidad Complutense de Madrid. Las características y variables de los pacientes se han extraído de las historias clínicas correspondientes. Se reclutaron aquellos pacientes siguiendo los criterios de inclusión exclusión especificados. **Resultados:** Se incluyeron en el estudio un total de 24 pacientes con diagnóstico de fascitis plantar. En el punto de mejoría de dolor, hubo diferencias estadísticamente significativas entre muestras relacionadas pre-post dolor matutino ( $p < 0,001$  (OR 1,167, respectivamente)). Los pacientes que tuvieron tratamiento previo con ondas de choque y que posteriormente fueron infiltrados con PRP tuvieron una curación estadísticamente significativa con respecto al resto de tratamientos previos ( $p = 0,021$  (OR 0,410, respectivamente)). **Conclusión:** Los pacientes que han recibido tratamiento para la fascitis plantar mediante infiltración con PRP han mejorado su sintomatología dolorosa. Aquellos pacientes tratados previamente con ondas de choque experimentaron tras la infiltración con PRP como segunda opción de tratamiento una mejoría completa de su sintomatología.

**Palabras clave:** fascitis plantar, tratamiento conservador, no cirugía, plasma rico en plaquetas.

### Abstract

Plantar fasciitis is the most common cause of plantar heel pain in adults. It results from repetitive strain of the plantar fascia at its origin in the medial calcaneal tubercle leading to a degenerative process of the plantar fascia. Platelet-rich plasma (PRP) infiltration therapy has emerged as a

newer and novel potential treatment option for chronic plantar fasciitis. **Hypothesis:** The painful symptomatology of patients with plantar fasciitis improves when they receive PRP infiltration. **Aim:** To assess the effect of PRP in the relief of painful symptomatology secondary to plantar fasciitis. **Methods:** A retrospective study was carried out. All the data for the study were obtained from the Clinical Pathology and Orthopedics Unit of the Complutense University of Madrid. Patient characteristics and variables were extracted from the corresponding medical records. Patients were recruited following the specified inclusion and exclusion criteria. **Results:** A total of 24 patients with a diagnosis of plantar fasciitis were included in the study. At the point of pain improvement, there were statistically significant differences between related samples pre-post morning pain ( $p < 0.001$  (OR 1.167, respectively)). Patients who had previous shockwave treatment and were subsequently infiltrated with PR had statistically significant healing with respect to all other previous treatments ( $p = 0.021$  (OR 0.410, respectively)). **Conclusion:** Patients who have received treatment for plantar fasciitis by infiltration with PR have improved their painful symptomatology. Those patients previously treated with shock waves experienced after infiltration with PR as a second treatment option a complete improvement of their symptomatology.

**Keywords:** plantar fasciitis, conservative treatment, nonsurgical, platelet-rich plasma.

1. INTRODUCCIÓN.
2. JUSTIFICACIÓN.
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.
4. MATERIAL Y MÉTODOS.
5. RESULTADOS
6. DISCUSIÓN
7. CONCLUSIONES
8. BIBLIOGRAFIA

## 1. INTRODUCCIÓN

La fascitis plantar es una de las etiologías más frecuentes del dolor de pie y talón en adultos, que provoca un engrosamiento patológico de esta. Contrariamente a su nombre, la fascitis plantar no es una patología inflamatoria, sino degenerativa, debida a microtraumatismos repetitivos.

El diagnóstico de la fascitis plantar es principalmente clínico, aunque se puede complementar con pruebas de imagen.

El tratamiento conservador de la fascitis plantar generalmente implica ejercicios de estiramiento y vendaje, AINEs, hielo local, modificación de la actividad física, masoterapia de tejido profundo y fisioterapia; mientras que la inyección intralesional de esteroides y la terapia con ondas de choque pueden estar justificadas en casos refractarios.

Más recientemente, la inyección de plasma rico en plaquetas (PRP) ha surgido como una opción de tratamiento potencial más nueva y novedosa para la fascitis plantar crónica. Esta última se usa clínicamente como un tratamiento mínimamente invasivo. Estudios clínicos han encontrado que el PRP tiene una buena perspectiva de aplicación en el tratamiento de lesiones. A corto plazo, los resultados de las inyecciones de dosis única de PRP muestran mejoría clínica estadísticamente significativa en la escala EVA del dolor en el talón, mejorando de valores en torno a 7 a 1,9 en 12 meses. Además, en la literatura, se describe que todos los pacientes habrían mejorado significativamente su dolor en el talón en torno a las 6 semanas y aún más a las 12, viéndose en este tiempo una reducción significativa del grosor de la fascia.

## 2. JUSTIFICACIÓN

La fascitis plantar es una de las patologías más comunes que encontramos en consulta. Tiene una alta prevalencia y se piensa que esta con el tiempo aumentará.

Suele limitar el estilo de vida en casi el 80% de los pacientes. En algunos casos adopta un curso crónico, y afecta gravemente a las actividades cotidianas, además de suponer una pesada carga para la asistencia sanitaria.

Al ser una patología tan frecuente, la ciencia está en busca de un tratamiento que sea realmente efectivo y que mejore notablemente la calidad de vida de nuestros pacientes. La infiltración de plasma rico en plaquetas es un tratamiento innovador muy prometedor según la bibliografía, y es por eso por lo que hemos realizado este estudio, para evaluar la evolución clínica de pacientes con fascitis plantar tras la infiltración de PRP.

### **3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS:**

La sintomatología dolorosa de los pacientes con fascitis plantar mejoran cuando reciben una infiltración de PRP.

Objetivo primario:

1. Estudiar la evolución de la sintomatología dolorosa en pacientes con fascitis plantar tras infiltración con PRP.

Objetivos secundarios:

2. Determinar la relación de las distintas variables clínicas y demográficas analizadas con la mejoría clínica de los pacientes infiltrados con PRP.

### **4. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### ***4.1 Diseño del estudio***

Se propone la realización de un estudio retrospectivo observacional. El reclutamiento de pacientes se realizará incluyendo en la muestra aquellos pacientes que acudieron a la Unidad de Patología y Ortopedia de la Clínica Universitaria de Podología (CUP) de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) en el periodo comprendido entre enero del 2015 a enero de 2020.

#### ***4.2 Población de estudio***

La población de estudio escogida para formar parte del estudio, presentaron los siguientes criterios de selección detallados a continuación

- *Criterios de inclusión:*
  - Pacientes mayores de 18 años.
  - Pacientes que han sido infiltrados de PRP para el tratamiento de fascitis plantar.
  - Pacientes diagnosticados de fascitis plantar mediante examen clínico.
  - Pacientes con dolor en la tuberosidad anteromedial del calcáneo (inserción de la fascia).
  - Pacientes con fracaso del tratamiento conservador mediante Ondas de choque, infiltración con corticoides.
- *Criterios de exclusión:*
  - Historia previa de cirugías o intervenciones a nivel de la fascia plantar.
  - Cirugía o intervenciones en rodilla o tobillo.
  - Pacientes con enfermedades sistémicas: Diabetes Mellitus, artritis reumatoide.

#### ***4.3 Material y métodos de recogida de datos y descripción de las variables seleccionadas para el análisis.***

Todos los datos para el estudio se obtendrán de la Unidad de Patología y Ortopedia de Clínica de la Universidad Complutense de Madrid. Las características y variables de los pacientes se

extraerán de las historias clínicas correspondientes.

Los registros clínicos donde se encuentran las historias clínicas serán revisadas desde enero del 2015 a enero del 2020 y a partir de este momento se obtendrá la población a estudio.

Debido al carácter retrospectivo del diseño del estudio y a la revisión de los datos exportados a través del sistema de gestión de datos de la CUP de la UCM, no se pasó consentimiento informado ni hoja de información a los pacientes incluidos en el estudio.

#### 4.3.1 Variables de estudio.

- *Variable principal:*
  - Mejoría en la escala EVA.
- Variables secundarias:
  - Variables demográficas.
    - N.º de identificación: Número aleatorio al que se le asigna al paciente (variable cuantitativa).
    - Fecha de nacimiento: Definida en formato día/mes/año (variable cuantitativa)
    - Sexo: 0 hombre/1 mujer
    - Peso (Kg): (variable cuantitativa continua).
    - Altura: Altura en metros (m) del paciente (variable cuantitativa continua).
    - Índice de Masa Corporal (IMC) ( $\text{Kg}/\text{m}^2$ ): (variable cuantitativa continua).
      - Bajo peso:  $< 18,5 \text{ kg}/\text{m}^2$
      - Normopeso:  $18,5 - 24,9 \text{ kg}/\text{m}^2$
      - Sobrepeso:  $25,0 - 29,9 \text{ kg}/\text{m}^2$
      - Obesidad:  $30 - > 30 \text{ kg}/\text{m}^2$
  - Variables historia clínica
    - Tiempo de evolución de la fascitis plantar.
    - Tratamientos pasados: 0 PRP/ 1 corticoides/ 2 ondas de choque/ 3 ortesis plantar.
    - Resultado clínico:
      - 0: No curación, tratamientos coadyuvantes pre o postinfiltración.
      - 1: Curación.
    - Presencia de dolor tras los primeros pasos de la mañana antes del tratamiento: 0 no/ 1 sí
    - Cuantificación dolor según EVA antes del tratamiento.
    - Presencia de dolor actualmente, tras los primeros pasos de la mañana: 0 no/ 1 sí
    - Cuantificación dolor según EVA en el momento actual.
    - Tipo de trabajo: 0 sedestación/ 1 bipedestación prolongada/ 2 mixto/ 3 no trabaja.

## 5. RESULTADOS

De la muestra de 40 pacientes infiltrados en la CUP, 24 fueron estudiados y 16 excluidos por los siguientes motivos: enfermedad sistémica como Diabetes *mellitus*, cirugías previas en fascia, tobillo o rodilla, ausencia de dolor en el tubérculo medial del calcáneo, no diagnóstico de fascitis plantar, ausencia de datos y/o respuesta telefónica.

De los 24 incluidos en el estudio, 10 fueron hombres (42%) y 14 mujeres (58%), en edades comprendidas entre los 41 y los 82 años. Cabe destacar que el 62,5% de la muestra padecía obesidad o sobrepeso.

El 87,5% de la muestra padecía dolor en la fascia plantar en los primeros pasos del día:

### Pre\_dolor\_matutino

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	No	3	12,0	12,5	12,5
	Si	21	84,0	87,5	100,0
	Total	24	96,0	100,0	
Perdidos	Sistema	1	4,0		
Total		25	100,0		

### Resumen de procesamiento de casos

	Casos Válido		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Pre_dolor_matutino * Post_dolor_matutino	24	96,0%	1	4,0%	25	100,0%

### Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,490 <sup>a</sup>	1	,484		
Corrección de continuidad <sup>b</sup>	,000	1	1,000		
Razón de verosimilitud	,860	1	,354		
Prueba exacta de Fisher				1,000	,657
Asociación lineal por lineal	,469	1	,493		
N de casos válidos	24				

a. 3 casillas (75,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es ,38.

b. Sólo se ha calculado para una tabla 2x2

## 6. DISCUSIÓN

En este estudio, la mayoría de los pacientes tuvieron una curación de: cambio de 9 a 0 en la escala EVA de dolor. A pesar de referir que esta curación fue muy progresiva. Algunos de estos pacientes acudieron a otros tipos de tratamiento como las ondas de choque o la infiltración de corticoides para obtener una ausencia completa del dolor.



Otro pequeño grupo de pacientes no obtuvo curación y tuvo que recurrir al último escalón de tratamiento; la cirugía.

En la bibliografía encontramos mucha controversia acerca de este tratamiento innovador, sin embargo en nuestro estudio la estadística dice que la mayoría de pacientes obtienen una curación y que esta puede estar relacionada también con factores como IMC, tiempo de evolución y estilo de vida del paciente.

## 7. CONCLUSIONES

La infiltración con PRP es una alternativa de tratamiento eficaz ante la fascitis plantar crónica en los casos en los cuales otros tratamientos conservadores no han dado resultado. Su efectividad se observa a largo plazo, viéndose notable mejoría en la escala EVA de dolor.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Kalia, R. B., Singh, V., Chowdhury, N., Jain, A., Singh, S. K., & Das, L. (2021). Role of platelet rich plasma in chronic plantar fasciitis: A prospective study. *Indian Journal of Orthopaedics*, 55(Suppl 1), 142–148. <https://doi.org/10.1007/s43465-020-00261-w>
2. Yu, T., Xia, J., Li, B., Zhou, H., Yang, Y., & Yu, G. (2020). Outcomes of platelet-rich plasma for plantar fasciopathy: a best-evidence synthesis. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 15(1), 432. <https://doi.org/10.1186/s13018-020-01783-7>
3. Pontious, J., Flanigan, P., Hillstrom, H. J., & de Planell i Mas, E. (1997). Función de la fascia plantar en la estabilización digital. Un caso clínico. *El Peu*, 69, 316–320. <https://enfispo.es/servlet/articulo?codigo=8696703>
4. Gupta, A., Ortiz-Babilonia, C., Xu, A. L., Rogers, D., Vulcano, E., & Aiyer, A. A. (2022). The statistical fragility of platelet-rich plasma as treatment for plantar fasciitis: A systematic review and simulated fragility analysis. *Foot & Ankle Orthopaedics*, 7(4), 24730114221144050. <https://doi.org/10.1177/24730114221144049>
5. Xu, P.-C., Xuan, M., & Cheng, B. (2020). Effects and mechanism of platelet-rich plasma on military drill injury: a review. *Military Medical Research*, 7(1), 56. <https://doi.org/10.1186/s40779-020-00285-1>
6. Latt, L. D., Jaffe, D. E., Tang, Y., & Taljanovic, M. S. (2020). Evaluation and treatment of chronic plantar fasciitis. *Foot & Ankle Orthopaedics*, 5(1), 2473011419896763. <https://doi.org/10.1177/2473011419896763>
7. Riddle, D. L., Pulisic, M., Pidcoe, P., & Johnson, R. E. (2003). Risk factors for plantar fasciitis: A matched case-control study. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 85(5), 872–877. <https://doi.org/10.2106/00004623-200305000-00015>
8. Tiwari, M., & Bhargava, R. (2013). Platelet rich plasma therapy: A comparative effective therapy with promising results in plantar fasciitis. *Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma*, 4(1), 31–35. <https://doi.org/10.1016/j.jcot.2013.01.008>
9. Kumar, V., Millar, T., Murphy, P. N., & Clough, T. (2013). The treatment of intractable plantar fasciitis with platelet-rich plasma injection. *Foot (Edinburgh, Scotland)*, 23(2–3), 74–77. <https://doi.org/10.1016/j.foot.2013.06.002>
10. Fei, X., Lang, L., Lingjiao, H., Wei, C., & Zhou, X. (2021). Platelet-rich plasma has better mid-term clinical results than traditional steroid injection for plantar fasciitis: A systematic review and meta-analysis. *Orthopaedics & Traumatology, Surgery & Research: OTSR*, 107(6), 103007. <https://doi.org/10.1016/j.otsr.2021.103007>
11. Ling, Y., & Wang, S. (2018). Effects of platelet-rich plasma in the treatment of plantar fasciitis: A meta-analysis of randomized controlled trials: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Medicine*, 97(37), e12110. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000012110>

12. Trojian, T., & Tucker, A. K. (2019). Plantar fasciitis. *American Family Physician*, 99(12), 744–750. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31194492/>
13. Thompson, J. V., Saini, S. S., Reb, C. W., & Daniel, J. N. (2014). Diagnosis and management of plantar fasciitis. *The Journal of the American Osteopathic Association*, 114(12), 900–906. <https://doi.org/10.7556/jaoa.2014.177>
14. Buchanan, B. K., & Kushner, D. (2022). *Plantar Fasciitis*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28613727/>
15. Peerbooms, J. C., van Laar, W., Faber, F., Schuller, H. M., van der Hoeven, H., & Gosens, T. (2010). Use of platelet rich plasma to treat plantar fasciitis: design of a multi centre randomized controlled trial. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 11(1), 69. <https://doi.org/10.1186/1471-2474-11-69>
16. Wilson, J. J., Lee, K. S., Miller, A. T., & Wang, S. (2014). Platelet-rich plasma for the treatment of chronic plantar fasciopathy in adults: a case series: A case series. *Foot & Ankle Specialist*, 7(1), 61–67. <https://doi.org/10.1177/1938640013509671>
17. López-Gavito, E., Gómez-Carlín, L. A., Parra-Téllez, P., & Vázquez-Escamilla, J. (2011). Platelet-rich plasma for managing calcaneus tendon tendinopathy and plantar fasciitis. *Acta ortopedica mexicana*, 25(6), 380–385. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22512103/>

**76644: Desarrollo de un vector de expresión para la sobreexpresión de MYC mediante CRISPR/SAM. Development of an expression vector for MYC overexpression using CRISPR/SAM****Área de conocimiento:** FARMACIA**Autor(es):** María Giménez García**Tutor(es):** María Hernández Sánchez, María Linares Gómez**Universidad:** Universidad Complutense de Madrid**Facultad:** Facultad de Farmacia**Titulación:** Grado en Farmacia**Formato:** Comunicación Oral - Investigación básica**Palabras Clave:** MYC, oncogén, CRISPR SAM, ingeniería genética, secuenciación Sanger. MYC, oncogene, CRISPR SAM, genetic engineering, Sanger sequencing.

MYC es un protooncogén que codifica para una fosfoproteína con un importante papel en la regulación de la expresión génica. Múltiples estudios señalan la implicación de MYC en el desarrollo de procesos de proliferación celular descontrolada, y se estima que existe sobreexpresión de este oncogén en hasta un 70% de los cánceres. Las implicaciones de esta sobreexpresión son por tanto un campo de estudio de gran relevancia. En este trabajo se plantea la técnica CRISPR/SAM como método de sobreexpresión del oncogén MYC en una línea celular. Esta técnica de ingeniería genética se basa en la fusión de una proteína deadCas9 y un dominio de activación de la transcripción (VP64). Este complejo es guiado por la sgRNA a la región determinada del ADN diana, produciéndose en última instancia la activación específica del gen de interés, y su consecuente sobreexpresión. El objetivo de este trabajo consiste en generar un vector de expresión para sobreexpresar MYC mediante CRISPR/SAM para generar modelos celulares con sobreexpresión de este gen. Para ello se realizó en primer lugar un diseño de las sgRNAs, complementarias a regiones cercanas al sitio de inicio de la transcripción de MYC. A continuación, se efectuó el anillamiento de los oligos y su ligación a un vector plasmídico lentiSAMv2. Posteriormente se llevó a cabo la transformación de bacterias competentes y mediante secuenciación Sanger se comprobó si las sgRNAs se habían clonado correctamente en el vector de expresión. La elevada eficacia de clonación que muestran las secuencias obtenidas, junto con la correcta cantidad de DNA puro extraído por maxiprep, nos permitirán continuar en el futuro con la generación de líneas celulares en las que queramos sobreexpresar el oncogén MYC. Así, podremos caracterizar las implicaciones moleculares de la sobreexpresión de este oncogén, así como utilizar estas líneas celulares como modelos preclínicos para testar nuevos fármacos.

MYC is a proto-oncogene that codes for a phosphoprotein with an important role in the regulation of gene expression. Multiple studies point to the involvement of MYC in the development of uncontrolled cell proliferation processes, and it is estimated that there is overexpression of this oncogene in up to 70% of cancers. The implications of this overexpression are therefore a highly relevant field of study. In this work, the CRISPR/SAM technique is proposed as a method for overexpression of the MYC oncogene in a cell line. This genetic engineering technique is based on the fusion of a deadCas9 protein and a transcription activation domain (VP64). This complex is guided by the sgRNA to the determined region of the target DNA, ultimately leading to the specific activation of the gene of interest and its consequent overexpression. The aim of this work is to generate an expression vector to overexpress MYC by means of CRISPR/SAM to generate cellular models with overexpression of this gene. For this purpose, we first designed the sgRNAs, complementary to regions close to the MYC transcription start site. Then, the oligos were banded and ligated into a plasmid vector lentiSAMv2. Subsequently, the transformation of competent bacteria was carried out and Sanger sequencing was used to check whether the sgRNAs had been correctly cloned into the expression vector. The high cloning efficiency shown by the sequences obtained, together with the correct amount of pure DNA extracted by maxiprep, will allow us to continue in the future with the generation of cell lines in which we want to overexpress the MYC oncogene. In this way we will be able to characterize the molecular implications of the overexpression of this oncogene, as well as to use these cell lines as preclinical models to test new drugs.

## Desarrollo de un vector de expresión para la sobreexpresión de MYC mediante CRISPR/SAM

### 1. Introducción

Los oncogenes y los genes supresores de tumores son los genes con mayor relevancia en el cáncer. Los protooncogenes son genes que regulan la división celular normal, y que al sufrir un daño genético pueden mutar dando lugar a un oncogén. El oncogén altera el crecimiento y la proliferación celular normal, propiciando que las células normales se conviertan en células cancerosas (Kifle *et al.*, 2021).

*MYC* es un protooncogén que codifica una fosfoproteína nuclear que cumple una función en la progresión del ciclo celular, la apoptosis y la transformación celular (NCBI, 2023). Los miembros de la familia de genes *MYC* son *c-MYC*, *L-MYC* y *N-MYC*, siendo *c-MYC* el que se sobreexpresa en mayor medida en cáncer (García-Gutiérrez *et al.*, 2019). Diversos estudios han demostrado la implicación de *MYC* como factor causal de la iniciación, progresión y mantenimiento de distintos tipos de cáncer (Duffy *et al.*, 2021). Esto es debido a la desregulación de la expresión de *MYC* y se estima que existe sobreexpresión de este oncogén en el 70% de los cánceres humanos (Llombart & Mansour, 2022).

La expresión de *MYC* está rigurosamente controlada en las células normales sanas. Los mecanismos que dan lugar a la alteración o sobreexpresión del gen comprenden la amplificación génica, la translocación cromosómica, la inserción de promotores retrovirales, la activación de superpotenciadores, el aumento de la señalización celular, la degradación alterada de proteínas y la mutación (Duffy *et al.*, 2021).

El sistema CRISPR-Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated) representa un mecanismo de defensa inmunitario adquirido en bacterias y arqueas, y presenta hoy en día una gran aplicación como técnica de edición genómica (Lander, 2016). Este sistema se basa en el diseño de un RNA guía (sgRNA), que reconoce una secuencia específica del DNA diana y es capaz de dirigir a la nucleasa Cas9 a esa región para su edición. De esta manera, se pueden generar cambios en el genoma de cualquier organismo, introduciendo inserciones, deleciones o insertando secuencias específicas (Ancos-Pintado *et al.*, 2022). Además, la mutación de residuos de Cas9 permite generar proteínas alternativas con capacidad de activar o reprimir genes de forma selectiva. Por ejemplo, en la proteína *deadCas9* (dCas9) los dominios catalíticos se encuentran inactivados, de manera que la proteína no es capaz de cortar el DNA, y la administración de esta proteína con un elemento activador o represor dará lugar a la sobreexpresión o infraexpresión de un determinado gen de manera selectiva (Moses *et al.*, 2018).

El sistema CRISPR/SAM (*synergistic activation mediators*) se basa en la fusión de la proteína dCas9 a un dominio de activación de la transcripción (VP64). Este complejo, guiado a la región específica del genoma por el sgRNA, va a permitir la sobreexpresión del gen de interés (Feser *et al.*, 2022). De esta manera, este sistema de ingeniería genómica podría permitir la sobreexpresión de un determinado oncogén en una línea celular, facilitando el estudio de su efecto y su caracterización.

El objetivo del trabajo consiste en generar un vector de expresión para sobreexpresar el oncogén *MYC* mediante CRISPR/SAM que permita generar modelos celulares con sobreexpresión de este gen. De esta manera, podremos caracterizar la implicación de esa sobreexpresión en diferentes líneas celulares de cáncer, así como testar nuevos fármacos.

## 2. Material y métodos

### 2.1. Diseño de las sgRNAs de sobreexpresión de *MYC*

El proceso de diseño de las sgRNAs se llevó a cabo en estudios previos a mi incorporación al grupo de investigación. Se utilizaron diferentes algoritmos bioinformáticos como el de *Broadinstitute* o *CRISPOR* y se consultó la bibliografía existente (Weltner *et al.*, 2018; Joung *et al.*, 2017). De entre todas las opciones se seleccionaron 5 sgRNAs con alta eficiencia a nivel de *on target* (nuestro gen de interés) y baja probabilidad de generar *off targets* a nivel *in silico*. Las sgRNAs seleccionadas se nombraron, cada una de ellas, con un número correspondiente a la posición de la sgRNA respecto al TSS (*transcription start site*): 173, 240, 369, 178 y 19.

### 2.2. Clonación de los sgRNAs de *MYC* en un vector de expresión

Este proceso consistió principalmente en la incorporación de los oligos, previamente diseñados, en un vector de expresión de interés mediante clonaje molecular, y en la posterior transformación bacteriana para comprobar si se habían incorporado dichos oligos correctamente mediante secuenciación.

#### 2.2.1. Anillamiento de los oligos

Se sintetizaron una pareja de oligos por cada sgRNAs que denominamos *low* y *up*, que eran complementarios entre sí y contenían los sitios de restricción para poder clonarlos en el vector de interés. Por tanto, la primera fase fue el anillamiento de los oligos. En esta fase, los oligos *low* hibridan con los oligos *up*, produciéndose una única molécula de RNA. Para ello, se añadieron las siguientes cantidades y reactivos en un *epENDORF*: oligo *up* (100  $\mu$ M) 1  $\mu$ l, oligo *low* (100  $\mu$ M) 1  $\mu$ l, 10X Buffer for T4 DNA ligase (NEB) 1  $\mu$ l, T4 Polynucleotide kinase (NEB) 0,5  $\mu$ l, ddH<sub>2</sub>O 6,5  $\mu$ l. Se llevó a cabo el anillamiento en un termociclador con las siguientes condiciones: 37°C durante 30 min, 95°C durante 5 min, y por último descenso de la temperatura en rampa hasta 25°C bajando la temperatura 5°C/min. Finalmente, los oligos anillados se diluyeron en una proporción 1:250 en agua libre de RNAsas y DNAsas.

#### 2.2.2. Digestión del vector de expresión y ligación de los oligos con el vector

El segundo paso fue la digestión del vector y la ligación que realizamos en un mismo procedimiento. En esta fase los oligos, ya en forma de doble cadena, se unen al vector LentiSamv2 (Addgene #75112), que es de doble cadena y circular. Para ello se digiere este vector con la enzima FastDigest Esp31 que va a cortar al vector lentiSAM en el sitio de reconocimiento de la enzima (se localiza posteriormente al promotor hU6). En ese punto se van a introducir los oligos por complementariedad gracias a los extremos cohesivos de los oligos y del vector. La unión se sella con T7 DNA ligase.

Para llevar a cabo este proceso, se añadieron en cada *epENDORF* los siguientes componentes en las siguientes cantidades: 2  $\mu$ l de los oligos fosforilados y anillados (diluidos 1:250), 2  $\mu$ l Fast digest Buffer 10X, 100 ng del vector lentiSAMv2, 1  $\mu$ l DTT 10mM, 1  $\mu$ l ATP 10mM, 1  $\mu$ l FastDigest Esp31, 0,5  $\mu$ l T7 DNA ligasa, y dH<sub>2</sub>O hasta completar un volumen final de 20  $\mu$ l. La reacción se incubó en el termociclador siguiendo el siguiente ciclo de temperaturas: 6 ciclos de 37°C durante 5 min y 23°C durante 5 min, y finalmente, se bajó la temperatura hasta 4°C.

#### 2.2.3. Eliminación de uniones no deseadas

La reacción se trató con la enzima PlasmidSafe exonuclease para prevenir posibles productos indeseados. Para ello mezclamos: 11ul del vector clonado (paso 2.2), 1,5  $\mu$ l del 10X PlasmidSafe Buffer, 1,5  $\mu$ l de 10mM ATP, y 1  $\mu$ l de PlasmidSafe exonuclease. A continuación, incubamos la reacción a 37°C durante 30 minutos en un termociclador.

#### 2.2.4. Transformación de células competentes

Finalmente se llevó a cabo la transformación de las células competentes mediante choque térmico. Para ello se añadieron 1-2  $\mu$ l del producto final del paso 2.3 sobre 25  $\mu$ l de las células competentes *Escherichia coli* (DH5 $\alpha$ ). Se incubaron 30 min en hielo. A continuación, se llevó a cabo el choque térmico incubando durante 45 segundos a 42°C y a continuación, 2 min en hielo. Después, se añadió 1ml de SOC médium y se incubaron las bacterias a 37°C y agitación durante 1 h. Finalmente se plaquearon las bacterias en placas LB Agar + Ampicilina (100  $\mu$ g/ml) y se incubaron toda la noche a 37°C.

#### 2.3. Extracción de DNA de bacterias mediante miniprep

Al día siguiente de la transformación, se aislaron tres colonias de cada vector clonado (a las cuales nombramos con las iniciales: A, B y C) y se incubaron toda la noche a 37°C en medio líquido (LB + Ampicilina (100  $\mu$ g/ml)). A partir de este cultivo bacteriano y siguiendo el protocolo especificado por la casa comercial del kit *quick-DNA Miniprep*, Zymo Research extrajimos el DNA.

Una vez extraído el DNA, comprobamos la calidad de la extracción mediante un nanodrop. Analizamos tanto la concentración de DNA extraída como la pureza de este mediante los índices 260/280 y 260/230, que representan la relación de absorbancia de la cantidad de DNA medida a 260 nm sobre la cantidad de proteína medida a 280, y sobre la cantidad de RNA medida a 230 nm, respectivamente.

#### 2.4. Secuenciación

Una vez extraído el DNA y calculado su pureza y concentración, quisimos comprobar que las sgRNAs se habían clonado correctamente con el vector de expresión. Para ello llevamos a cabo la secuenciación del DNA mediante secuenciación Sanger en la Unidad de Genómica de la Universidad Complutense de Madrid. La secuenciación se llevó a cabo empleando el primer hU6 ya que es complementario a la zona del promotor cercana donde se clonaron los oligos.

#### 2.5. Extracción de DNA por maxiprep

A continuación, para poder llevar a cabo la posterior producción de Lentivirus, extrajimos el DNA por maxiprep. Para ello, se realizaron cultivos bacterianos con mayores concentraciones de células que los realizados anteriormente para la miniprep. Se realizó la extracción de DNA por maxiprep, ya que no solo permite extraer mayores cantidades de DNA que la miniprep, sino que además el DNA obtenido mediante la maxiprep se encuentra libre de endotoxinas mientras que el obtenido en la miniprep no. Para la realización de la maxiprep se siguió el protocolo proporcionado por la casa comercial ("*Qiagen maxi plamid Kit*").

### 3. Resultados

#### 3.1. Eficacia de la integración de la guía

La secuenciación Sanger realizada permitió la evaluación de la eficacia de la integración del sgRNA en el vector lentiSAMv2. Las secuencias se analizaron empleando el programa *SnapGene* (Ilustración 1 y 2). Cada pico de fluorescencia medido se corresponde con un nucleótido que se indica en la parte superior.

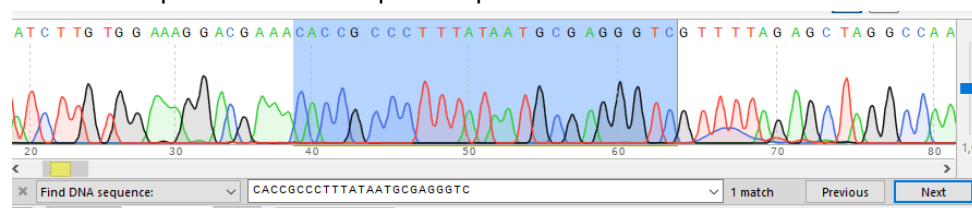


Ilustración 1. SgRNA 173 insertado en la secuencia de DNA obtenida para la colonia C de las células DH5 $\alpha$ .



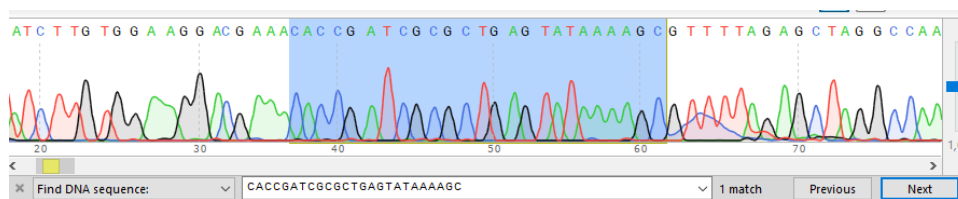


Ilustración 2. SgRNA 19 insertado en la secuencia de DNA obtenida para la colonia B de las células DH5α.

Los resultados de eficacia de integración de las guías, obtenidos mediante la secuenciación, se indican en la Tabla 1. La extracción de DNA por maxiprep se realizó únicamente en aquellas colonias que integraron eficazmente el sgRNA en el plásmido (al menos una colonia por cada sgRNA), mientras que aquellas colonias en las que la integración no tuvo lugar se descartaron.

Nombre del oligo	Nº de colonias con inserto	Nº de colonias analizadas	% integración
173	2	3	66,66
240	3	3	100
369	3	3	100
178	2	3	66,66
19	2	3	66,66

Tabla 1. Resultados de integración de los sgRNA en las secuencias

El DNA extraído, tanto por miniprep como por maxiprep, fue medido empleando un nanodrop. Los resultados de concentraciones de DNA se determinaron en ng/μl y se analizaron las proporciones 260/280 y 230/260 para determinar la pureza del DNA extraído. Todos estos resultados se encuentran resumidos en la Tabla 2.

Nombre oligo	[DNA] ng/μl Miniprep	260/280	260/230	[DNA] ng/μl Maxiprep	260/280	260/230
173 C	288,4	1,89	2,22	3013,2	1,89	2,27
240 C	336,7	1,86	1,92	3895,4	1,88	2,23
369 B	309,55	1,906	2,317	4016,1	1,89	2,24
178 B	271,45	1,907	2,292	2242,3	1,88	2,27
19 B	287,95	1,904	2,318	2833,0	1,90	2,27

Tabla 2. Tabla resumen de las concentraciones de DNA obtenidas por miniprep y maxiprep y de las proporciones 260/280 y 230/260 en 5 colonias de bacterias DH5α.

#### 4. Discusión de resultados

Las secuencias obtenidas mediante secuenciación Sanger muestran que las guías se integraron satisfactoriamente en la mayoría de las colonias, obteniendo al menos una colonia bacteriana con la sgRNA clonada en el vector de expresión de manera correcta (Tabla 1). Por ejemplo, en la Ilustración 1 se observa que el sgRNA 173 se integró eficazmente en el DNA de la colonia C de las bacterias DH5α. Asimismo, en la Ilustración 2 se observa que el sgRNA 19 se integró eficazmente en la colonia B de las bacterias DH5α. Estos resultados son similares a los de otros estudios donde han llevado a cabo un método de clonaje similar, aunque empleando vectores y sgRNAs diferentes (Quijada-Álamo *et al.*, 2020).

El DNA extraído por miniprep fue evaluado mediante un nanodrop. Se comprobó que la cantidad de DNA era, en todos los casos, suficientemente elevada para poder llevar a cabo el proceso de secuenciación, siendo 100 ng/μl la concentración mínima requerida por el servicio de Secuenciación. Además, los valores obtenidos para las proporciones 260/280 y 260/230 se encontraban dentro de los márgenes esperados para considerarse un DNA puro (tabla 2).

Por último, las concentraciones de DNA obtenidas por maxiprep fueron elevadas, lo que nos permitirá continuar con los siguientes pasos del proceso, para conseguir nuestro objetivo final de sobreexpresar *MYC* en la línea celular de cáncer.

## 5. Conclusiones

Los resultados obtenidos para la integración del sgRNA en el vector son satisfactorios, obteniéndose en conjunto una elevada eficacia de clonación; se llevó a cabo la secuenciación de 3 clones de cada condición, obteniéndose en al menos dos de cada tres casos la correcta integración del sgRNA. Esto, sumado a una correcta cantidad de DNA puro extraído por maxiprep, nos permite continuar en un futuro con los siguientes procesos, que incluyen la producción de lentivirus que expresen el vector generado y la posterior infección de la línea celular de interés.

La sobreexpresión del oncogén *MYC* en una línea celular permitirá caracterizar las implicaciones de la sobreexpresión del oncogén, así como testar nuevos fármacos.

## 6. Bibliografía

Ancos-Pintado, Raquel et al. "High-Throughput CRISPR Screening in Hematological Neoplasms." *Cancers* vol. 14,15 3612. 25 Jul. 2022, doi:10.3390/cancers14153612

Duffy, Michael J et al. "MYC as a target for cancer treatment." *Cancer treatment reviews* vol. 94 (2021): 102154. doi:10.1016/j.ctrv.2021.102154

García-Gutiérrez, Lucía et al. "MYC Oncogene Contributions to Release of Cell Cycle Brakes." *Genes* vol. 10,3 244. 22 Mar. 2019, doi:10.3390/genes10030244

Feser, Colby J et al. "Engineering CRISPR/Cas9 for Multiplexed Recombinant Coagulation Factor Production." *International journal of molecular sciences* vol. 23,9 5090. 3 May. 2022, doi:10.3390/ijms23095090

Joung, Julia et al. "Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout and transcriptional activation screening." *Nature protocols* vol. 12,4 (2017): 828-863. doi:10.1038/nprot.2017.016

Kifle, Zemene Demelash et al. "A recent development of new therapeutic agents and novel drug targets for cancer treatment." *SAGE open medicine* vol. 9 20503121211067083. 23 Dec. 2021, doi:10.1177/20503121211067083

Lander, Eric S. "The Heroes of CRISPR." *Cell* vol. 164,1-2 (2016): 18-28. doi:10.1016/j.cell.2015.12.041

Llombart, Victor, and Marc R Mansour. "Therapeutic targeting of "undruggable" MYC." *EBioMedicine* vol. 75 (2022): 103756. doi:10.1016/j.ebiom.2021.103756

Moses, Colette et al. "Hallmarks of cancer: The CRISPR generation." *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* vol. 93 (2018): 10-18. doi:10.1016/j.ejca.2018.01.002

NCBI. *MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor [Homo sapiens (human)]*. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information, 28 de Febrero de 2023. Fecha de acceso: 2 de Marzo de 2023. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4609>

Quijada-Álamo, Miguel et al. "CRISPR/Cas9-generated models uncover therapeutic vulnerabilities of del(11q) CLL cells to dual BCR and PARP inhibition." *Leukemia* vol. 34,6 (2020): 1599-1612. doi:10.1038/s41375-020-0714-3

Weltner, Jere et al. "Human pluripotent reprogramming with CRISPR activators." *Nature communications* vol. 9,1 2643. 6 Jul. 2018, doi:10.1038/s41467-018-05067-x



**76805: Prueba de expresión de proteínas amiloides en diferentes cepas de Escherichia coli.****Área de conocimiento:** FARMACIA**Autor(es):** Carlos Tomé Sainz**Tutor(es):** Humberto Martín Brieva**Universidad:** Universidad Complutense de Madrid**Facultad:** Facultad de Farmacia**Titulación:** Grado en Farmacia**Formato:** Comunicación Oral - Investigación básica**Palabras Clave:** Biotecnología, expresión bacteriana, amiloides, biología molecular y Escherichia coli. Biotechnology, bacterial expression, amyloids, molecular biology and Escherichia coli.

Nuestro objetivo en este trabajo ha sido evaluar la capacidad de diferentes cepas de Escherichia coli de producir un análogo mutante de RIPK1, una proteína amiloide humana implicada en procesos inflamatorios, incluida la señalización de la necroptosis. Para ello, hemos transformado muestras de las cepas BL21, C41 y TUNER con un plásmido de expresión bacteriana que porta la secuencia de nuestra proteína mutante, RIPK1mut2, controlado por el operón Lac. Tras la inducción de la expresión de la proteína, estudiamos la capacidad productiva de las distintas cepas mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida. Analizamos la fracción soluble y la insoluble de los extractos obtenidos de las diferentes cepas. Una vez revelados los geles y analizados los resultados, pudimos concluir que las cepas BL21 y TUNER producían la proteína de interés con un rendimiento similar, aunque la cepa TUNER producía, además, mayor cantidad de proteínas inespecíficas insolubles que dificultarían los procesos de purificación. Por esta razón se concluyó que la cepa óptima para la producción de RIPK1mut2 sería BL21.

Our aim in this work has been to evaluate the ability of different Escherichia coli strains to produce a mutant analog of RIPK1, a human amyloid protein involved in inflammatory processes, including necroptosis signaling. For this, we have transformed samples of the BL21, C41 and TUNER strains with a bacterial expression plasmid that carries the sequence of our mutant protein, RIPK1mut2, controlled by the Lac operon. After the induction of protein expression, we analyzed the productive capacity of the different strains using polyacrylamide gel electrophoresis. We analyzed the soluble and insoluble fraction of the extracts obtained from the different strains. Once the gels were developed and the results analyzed, we were able to conclude that the BL21 and TUNER strains produced the protein of interest with a similar yield, although the TUNER strain also produced a greater amount of insoluble non-specific proteins that would make purification processes difficult. For this reason it was concluded that the optimal strain for the production of RIPK1mut2 would be BL21.

## **Prueba de expresión de una proteína amiloide en diferentes cepas de *Escherichia coli*. / Amyloid protein expression test in different strains of *Escherichia coli*.**

Autor: 02746152K, Carlos Tomé Sainz, ctome01@ucm.es.

Tutor: Humberto Martín Brieva, humberto@ucm.es.

Afiliaciones: Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.

Resumen/Abstract:

Nuestro objetivo en este trabajo ha sido evaluar la capacidad de diferentes cepas de *Escherichia coli* de producir un análogo mutante de RIPK1, una proteína amiloide humana implicada en procesos inflamatorios, incluida la señalización de la necroptosis. Para ello, hemos transformado muestras de las cepas BL21, C41 y TUNER con un plásmido de expresión bacteriana que porta la secuencia de nuestra proteína mutante, RIPK1mut2, controlado por el operón Lac. Tras la inducción de la expresión de la proteína, estudiamos la capacidad productiva de las distintas cepas mediante una electroforesis en gel de poliácridamida. Analizamos la fracción soluble y la insoluble de los extractos obtenidos de las diferentes cepas. Una vez revelados los geles y analizados los resultados, pudimos concluir que las cepas BL21 y TUNER producían la proteína de interés con un rendimiento similar, aunque la cepa TUNER producía, además, mayor cantidad de proteínas inespecíficas insolubles que dificultarían los procesos de purificación. Por esta razón se concluyó que la cepa óptima para la producción de RIPK1mut2 sería BL21.

Our aim in this work has been to evaluate the ability of different *Escherichia coli* strains to produce a mutant analog of RIPK1, a human amyloid protein involved in inflammatory processes, including necroptosis signaling. For this, we have transformed samples of the BL21, C41 and TUNER strains with a bacterial expression plasmid that carries the sequence of our mutant protein, RIPK1mut2, controlled by the Lac operon. After the induction of protein expression, we analyzed the productive capacity of the different strains using polyacrylamide gel electrophoresis. We analyzed the soluble and insoluble fraction of the extracts obtained from the different strains. Once the gels were developed and the results analyzed, we were able to conclude that the BL21 and TUNER strains produced the protein of interest with a similar yield, although the TUNER strain also produced a greater amount of insoluble non-specific proteins that would make purification processes difficult. For this reason it was concluded that the optimal strain for the production of RIPK1mut2 would be BL21.

Palabras clave: Biotecnología, expresión bacteriana, amiloides, biología molecular y *Escherichia coli*.

Biotechnology, bacterial expression, amyloids, molecular biology and *Escherichia coli*.

\* N<sup>o</sup> Identificador del recibo en Eventos: 1505361

## Introducción

El estudio de las proteínas amiloides es un paso fundamental para avanzar en el conocimiento de diferentes enfermedades humanas. Dichos amiloides son proteínas plegadas de forma anómala, cuya conformación fomenta la interacción entre sí formando agregados proteicos muy estables.

Aunque los amiloides son principalmente conocidos por su vinculación a diferentes enfermedades, como la enfermedad de Alzheimer o las enfermedades priónicas, es cierto que la naturaleza utiliza estos amiloides en múltiples casos aprovechándose de sus características estructurales y de agregación (Otzen, 2019). Las formas de utilización más comunes son:

- Como reservorios, por ejemplo, los mamíferos almacenan diferentes hormonas peptídicas de forma intracelular gracias a dichos agregados con los cuales además pueden controlar su velocidad de liberación.
- Como señalizadores, como en el caso de las proteínas RIP1/RIP3 que participan en procesos de señalización de procesos apoptóticos y necroptóticos.
- O con fines estructurales, permitiendo por ejemplo la formación de biofilms en diferentes microorganismos como *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Salmonella*, *Pseudomonas*... Dichos biofilms son muy importantes ya que confieren a los microorganismos un aislamiento del medio e impiden la acción de los agentes antimicrobianos durante el tratamiento de las infecciones.

Sin embargo, el motivo principal del estudio de los amiloides es su presencia en múltiples enfermedades crónicas y de alta morbimortalidad (Eisenberg, 2012). Estos agregados proteicos se han encontrado en patologías que afectan a prácticamente a todos los tejidos, como el hígado, el riñón, el bazo o los vasos sanguíneos. Pero los más estudiados por sus características fisiopatológicas son los que afectan al sistema circulatorio y al sistema nervioso. En cuanto al sistema circulatorio, la enfermedad se conoce como amiloidosis cardiaca. La acumulación de proteínas amiloides en el corazón y los vasos sanguíneos produce un aumento de la rigidez que impide el correcto llenado del corazón durante la diástole y bombeado de la sangre hacia los tejidos, ocasionando cuadros de insuficiencia cardiaca y/o arritmias debidas al esfuerzo. En lo que respecta a las enfermedades relacionadas con el sistema nervioso, encontramos que hay múltiples proteínas amiloidogénicas relacionadas. Tenemos a las proteínas Tau y Amiloide  $\beta$  presentes de forma sistemática en la enfermedad de Alzheimer, a la  $\alpha$ -sinucleína en pacientes con Parkinson, y a la TDP-43 en pacientes con esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Todas ellas son enfermedades crónicas de mal pronóstico y, debido a eso y aunque aún no se pueden vincular directamente con el origen de estas, el desconocimiento que existe en este campo nos impulsa a estudiar su comportamiento y su fisiopatología.

Por estas razones el estudio de las proteínas amiloides es un objetivo fundamental en nuestros días y el primer paso para poder estudiarlas es disponer de ellas en cantidades significativas. En los laboratorios necesitamos esas proteínas para poder realizar los ensayos y experimentos pertinentes y, por ello, necesitamos métodos de producción y purificación eficaces, rápidos y del mayor rendimiento posible. Para conseguir nuestra materia prima de una manera que en la que se optimicen los recursos disponibles necesitamos realizar previamente

una prueba de expresión, en el que evaluamos la capacidad de producción de nuestra proteína de estudio por diferentes cepas de *Escherichia coli*, bacteria más utilizada en procesos biotecnológicos y particularmente con fines de expresión proteica.

Nuestro objetivo en este trabajo ha sido evaluar la capacidad de diferentes cepas de *Escherichia coli* de producir un análogo mutante de RIPK1, una proteína amiloide humana implicada en procesos inflamatorios, incluida la señalización de la necroptosis.

#### Material y métodos.

Nuestra prueba de expresión consta de tres partes. La primera está formada por la transformación de las cepas a estudiar, seguidamente hay una fase de cultivo e inducción de la producción y finalmente una evaluación de los resultados, que en este caso se ha realizado mediante una electroforesis en gel. Para nuestra prueba de expresión hemos utilizado una variante de la proteína antes mencionada, RIPK1, pero con dos mutaciones puntuales de interés (RIPK1mut2) y probaremos la capacidad de expresión de esta proteína en tres cepas de *Escherichia coli*, BL21, C41 y TUNER. Todas ellas se conservan a -80°C y han sufrido un tratamiento previo con CaCl<sub>2</sub> para convertir las células en células competentes, es decir, que tengan una mayor permeabilidad de membrana y haya un mejor ingreso del plásmido al interior celular.

En la primera fase, la de transformación, buscamos que los microorganismos capturen el plásmido con la información para la producción de RIPK1mut2. Para ello, utilizamos la técnica de choque térmico, la cual se ha realizado en condiciones de esterilidad. Primero, tomamos dos muestras de cada una de las tres cepas del frigorífico de -80°C y las pasamos a un recipiente con hielo. Una muestra de cada cepa ha sido utilizada como control y a la otra le añadimos, tras su descongelación, 0.65 µL de la disolución del plásmido pEt11a (adquirido comercialmente de GenScript) que contiene la secuencia codificante de nuestra proteína bajo el control del operón Lac, y que tenemos preparado previamente a una concentración de 0.2µg/µL. Dejamos las 6 muestras en hielo durante 25 minutos y, cumplido este tiempo, las introducimos en un baño de agua termostaticada a 42°C durante 45 segundos, sujetando las muestras con un flotador para que no se sumerjan en su totalidad. Seguidamente las sacamos del baño termostaticado y las pusimos en agua hielo durante 2-3 minutos. Con este proceso el pulso de calor disminuye el potencial de membrana de las células competentes, por lo que disminuye la resistencia al paso del ADN, cargado negativamente, al citoplasma (Chung, 1993). Una vez pasados los 2-3 minutos en agua-hielo añadimos en campana de flujo laminar 300µL de medio LB, medio para mantener y cultivar cepas recombinantes de *E. coli*. Dejamos las seis muestras en incubación a 37°C durante 1 hora. Pasado el tiempo de incubación hemos sembrado cada una de las seis muestras en una placa de cultivo que contiene ampicilina; al añadir ese antibiótico conseguimos que solo crezcan en la placa los microorganismos que hayan captado el plásmido debido a que este contiene un gen que proporciona resistencia a la ampicilina. Para cada muestra pipeteamos, en campana, 100µL y los sembramos en una placa distinta para cada muestra. Posteriormente hemos esparcido esos 100µL por la placa utilizando una espátula de Drigalsky, todo ello alrededor de un mechero Bunsen para mantener la esterilidad. La espátula será sumergida en etanol y flameada antes de entrar en contacto con las placas. Una vez sembrado dejamos las seis placas en incubación a 37°C y agitación durante toda la noche.

Al día siguiente continuamos con la siguiente parte de la prueba de expresión, que consta de un escalado del cultivo y una inducción de la producción de nuestra proteína de interés, RIPK1mut2. Para ello realizamos un precultivo en un medio compuesto por 3 ml de medio LB, 3  $\mu$ L de ampicilina a una concentración de 100 mg/ml y 15 mg de glucosa. Realizamos un precultivo por cada cepa transformada y uno extra como control negativo. Para cada cepa, tocamos con una punta de pipeta en una colonia aislada en las placas previamente incubadas y dejamos dicha punta de pipeta dentro del tubo de ensayo con el medio para el precultivo. Dejamos en incubación toda la noche a 37°C y al día siguiente escalamos el cultivo. Pasado el tiempo de incubación crearemos, en diferentes tubos Falcon, un medio de cultivo compuesto por 15 ml de medio LB, 45 mg de glucosa y 15  $\mu$ L de ampicilina. A este medio le añadimos la cantidad suficiente de células en disolución para obtener una densidad óptica (DO) de 0.05. Una vez obtenido todo incubamos los Falcon en agitación y a 37°C midiendo su absorbancia cada 30 minutos hasta alcanzar una DO de 0.6. Este monitoreo del crecimiento nos permitirá inducir la producción de nuestra proteína una vez alcanzado la velocidad de crecimiento máximo que se identifica con el punto medio del crecimiento total posible. Una vez alcanzado el valor de DO necesario, tomamos una muestra (T<sub>0</sub>) de 1 mL de cada cepa para su posterior análisis y añadimos, a nuestros Falcon con los cultivos, 15  $\mu$ L de isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración de 0.5 M, que es un análogo no hidrolizable de la alolactosa y que se utiliza para inducir el operón lactosa, que es el que en este plásmido regula la expresión del gen que queremos expresar. Cuando no hay lactosa o alguno de sus derivados (como el IPTG) el represor bloquea la expresión de la proteína. La lactosa y sus derivados se unen a dicho represor para impedir el bloqueo y con ello inducir la expresión del gen y la producción de la proteína, en este caso RIPK1mut2.

Posteriormente, tomamos una muestra a las 3 horas post-inducción (T<sub>3</sub>) y dejamos el cultivo en incubación a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente, tomamos una muestra final (T<sub>f</sub>) y pasamos a la siguiente y última fase, la de análisis de la producción por electroforesis en gel de poliacrilamida con gradiente de concentración. Con esta técnica conseguimos separar las proteínas de las muestras tomadas según su tamaño y compararlas entre ellas de forma cualitativa y pseudocuantitativa, ya que en los pocillos del gel pusimos la misma cantidad de cada muestra y con ello pusimos comparar las concentraciones de forma aproximada. Para ello tuvimos que procesar las muestras tomadas de cada cepa a diferentes tiempos. En total tuvimos tres muestras de 1 mL por cada cepa: una muestra pre-inducción (T<sub>0</sub>), una muestra a las 3 horas (T<sub>3</sub>) y una muestra final (T<sub>f</sub>). Estas muestras fueron centrifugadas a 7000 rpm durante 8 minutos y, después, se separó el sobrenadante del pellet. Eliminamos el sobrenadante y resuspendimos el pellet en 250  $\mu$ L de buffer de lisis. Para resuspenderlo totalmente y lisar las células hubo que sonificarlo en un sonicador de punta fina con tres pulsos de 5 segundos seguidos de 15 de reposo y en hielo para evitar el calentamiento excesivo. Una vez sonificado y resuspendido totalmente centrifugamos a 15000rpm durante 20 minutos. Del sobrenadante o fase soluble pipeteamos 30  $\mu$ L y lo añadimos a un tubo de PCR con capacidad para 0.2 mL que previamente contiene 10  $\mu$ L de loading buffer. Después, eliminamos el sobrenadante y añadimos al pellet 25  $\mu$ L de loading buffer y 80  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O Milli-ro. Una vez centrifugadas tendremos 9 muestras de la fase soluble y 9 de la fase insoluble por lo que realizaremos dos geles de 10 pocillos, un gel para la fase soluble y otra para la insoluble. En ambos geles añadiremos un marcador de pesos moleculares (MW).

## Resultados

En la transformación obtuvimos colonias aisladas y viables de 3 cepas: BL21, C41 y TUNER. También transformamos otra cepa de Rosetta, pero no obtuvimos crecimiento en placa por lo que no continuamos la prueba en dicha cepa.

En cuanto a la producción, en los geles deberíamos encontrar una banda en la parte inferior del gel ya que nuestra proteína tiene un peso molecular de 11 kDa. Para contrastar, comparamos las bandas con el marcador de pesos moleculares cuya última banda visible inferior corresponde también a moléculas de 11kDa. Para determinar la presencia de nuestra proteína utilizamos dos técnicas distintas para la visualización de los geles. Primero utilizamos el transiluminador, un aparato que irradia al gel con luz ultravioleta a distintas longitudes de onda y en donde podremos ver todas las proteínas que tengan triptófanos en su secuencia. Después, teñimos el gel con el colorante azul de Coomassie para revelar todas las proteínas independientemente de su secuencia. Como nuestra proteína de interés, RIPK1mut2, no contiene triptófanos, podemos diferenciar por contraste donde se encuentra nuestra proteína. Por ello, analizando el gel que contiene las muestras de la fase soluble (Figuras 1 y 2), no observamos ninguna banda en la parte inferior que no aparezca con el transiluminador pero sí con Coomassie, por lo que podemos determinar que nuestra proteína de interés se encuentra en la parte insoluble tras la centrifugación, seguramente por su capacidad de formación de agregados proteicos denominados cuerpos de inclusión (IB). También podemos visualizar que la cepa C41 es la que más proteínas solubles produce. En cuanto al gel de las fases insolubles (Figuras 3 y 4) podemos observar como en la parte inferior del gel aparece una banda del tamaño esperado para nuestra proteína con intensidad elevada al teñir con Coomassie, banda que no aparece en el transiluminador. Esto nos determina que las cepas que han producido la proteína RIPK1mut2 correctamente son BL21 y TUNER, y que la cepa C41 no ha producido la proteína. Mientras que a las 3 horas post-inducción la producción de nuestra proteína es escasa, tras un periodo de incubación prolongado la cantidad de proteína es significativamente más elevada. Y, además, podemos distinguir que la columna de la cepa TUNER a Tf tiene más cantidad de proteínas inespecíficas insolubles que la cepa BL21.

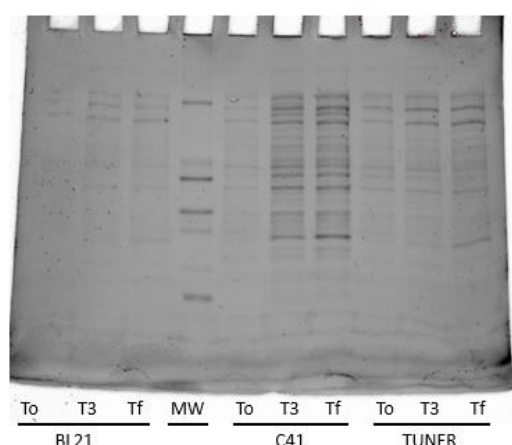


Figura 1: Gel de poliacrilamida de las fases solubles vistas al transiluminador.

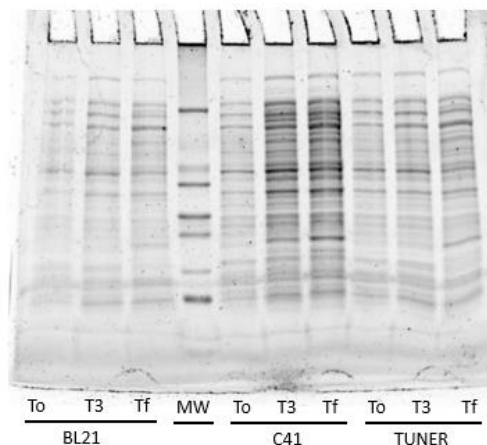


Figura 2: Gel de poliacrilamida de las fases solubles vistas por tinción de Coomassie.

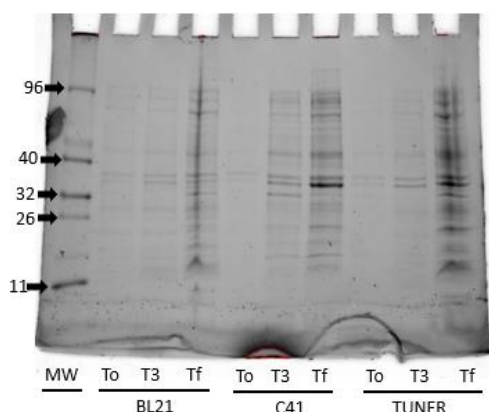


Figura 3: Gel de poliacrilamida de las fases insolubles vistas al transiluminador.

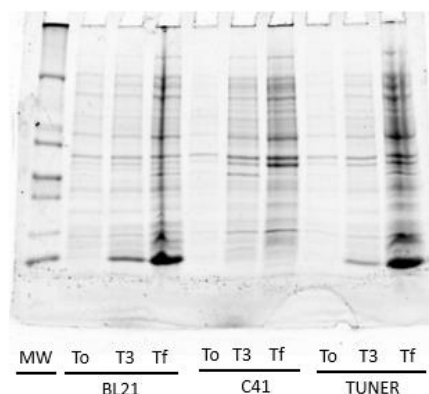


Figura 4: Gel de poliacrilamida de las fases insolubles vistas por tinción de Coomassie.

### Discusión

Con estos resultados podemos elucidar que C41 no es un candidato viable para la producción de RIPK1mut2, ya que no produce nuestra proteína. Esto seguramente se vea ligado a la gran producción de proteínas hidrosolubles, con lo que se podría hipotetizar que igual existe alguna proteasa que corte a RIPK1mut2 en péptidos pequeños y solubles. Con C41 descartado, nos queda evaluar el perfil de BL21 y TUNER. No se aprecian diferencias a grandes rasgos en cuanto a la cantidad de producción de proteína entre las dos cepas y en ambas la producción a las 3 horas post-inducción es pobre, por lo que no hay ventajas con respecto al tiempo de producción. La principal diferencia entre BL21 y TUNER es que en TUNER obtenemos mayor cantidad de proteínas que no son de interés.

### Conclusiones

- La proteína RIPK1mut2 se puede expresar en *Escherichia coli*.
- De las tres cepas estudiadas, solo BL21 y TUNER fueron capaces de producirla.
- Como TUNER expresa más proteínas insolubles inespecíficas, elegimos BL21 como cepa óptima para facilitar futuros procesos de purificación.

### Referencias bibliográficas

- Aune, T. E. V., & Aachmann, F. L. (2009). Methodologies to increase the transformation efficiencies and the range of bacteria that can be transformed. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(5), 1301–1313. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2349-1>.
- Chung, C. T., & Miller, R. E. (1993). [43] Preparation and storage of competent *Escherichia coli* cells. Elsevier eBooks, 621-627. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(93\)18045-e](https://doi.org/10.1016/0076-6879(93)18045-e).
- Eisenberg, D., & Jucker, M. (2012). The Amyloid State of Proteins in Human Diseases. *Cell*, 148(6), 1188-1203. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.022>.
- García-Fruitós, E. (2014). *Insoluble Proteins: Methods and Protocols*; Methods in Molecular Biology: 1258 (2015 ed.). Humana.
- Hofmann, A., & Clokie, S. (2018). *Wilson and Walker's Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology* (8th Revised ed.). Cambridge University Press.
- Otzen, D. E., & Riek, R. (2019). Functional Amyloids. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 11(12), a033860. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033860>.

**76782: Actividad antimicrobiana y antibiopelículas de compuestos nitrogenados aislados de *Rubus boliviensis* Focke (Khari Khari). Antimicrobial and antibiofilm activities of nitrogenous compounds isolated from *Rubus boliviensis* Focke (Khari Khari).****Área de conocimiento:** FARMACIA**Autor(es):** Carmen Hernán Vieco**Tutor(es):** Luis Apaza Ticona, Karla Slowing Barillas**Universidad:** Universidad Complutense de Madrid**Facultad:** Facultad de Farmacia**Titulación:** Grado en Farmacia**Formato:** Póster - Investigación básica**Palabras Clave:** Rubus, antimicrobianos, biopelículas, quorum sensing. Rubus, antimicrobials, biofilms, quorum sensing

La resistencia antibiótica es uno de los mayores problemas actuales, especialmente en infecciones del tracto superior respiratorio, con un alto riesgo de infección. Dentro de las distintas teorías que intentan explicar esta resistencia patológica está la comunicación intercelular (quorum sensing), mediante la creación de biofilms responsables de estas resistencias. Los productos naturales, han mostrado ser una herramienta en el tratamiento de estos biofilms. En el siguiente trabajo se llevó a cabo la extracción y caracterización de compuestos de la especie *Rubus boliviensis* con actividad antimicrobiana y antibiofilm. Nuestros resultados reportan aislamiento del compuesto ácido (2E)-2-ciano-3-(4-hidroxifenil) acrílico por primera vez en esta especie que presentó una actividad antimicrobiana (0,86  $\mu\text{M}$ ) sobre bacterias Gram negativas. Adicionalmente, este compuesto mostró una actividad anti-biofilm (1,01  $\mu\text{M}$ ) y anti-quorum sensing (82,08% de inhibición de violaceína) sobre las mismas bacterias.

Antibiotic resistance is one of the biggest current problems, especially in upper respiratory tract infections with a high risk of infection. Among the different theories that try to explain this pathological resistance is intercellular communication (quorum sensing), through the creation of biofilms responsible for this resistance. Natural products have been shown to be a tool in the treatment of these biofilms. In the following work, the extraction and characterization of compounds from the *Rubus boliviensis* species with antimicrobial and antibiofilm activity were carried out. Our results report the isolation of the acid compound (2E)-2-cyano-3-(4-hydroxyphenyl) acrylic for the first time in this species that showed antimicrobial activity (0.86  $\mu\text{M}$ ) against Gram-negative bacteria. Additionally, this compound showed antibiofilm (1.01  $\mu\text{M}$ ) and anti-quorum sensing (82.08% violacein inhibition) activity on these bacteria.



## **Actividades antimicrobianas y antibiopelículas de compuestos nitrogenados aislados de *Rubus boliviensis* Focke (Khari Khari)**

### **Antimicrobial and antibiofilm activities of nitrogenous compounds isolated from *Rubus boliviensis* Focke (Khari Khari)**

1513981, Carmen Hernán Vieco, [cahern08@ucm.es](mailto:cahern08@ucm.es)

Luis Apaza Ticona, [lnapaza@ucm.es](mailto:lnapaza@ucm.es)

Karla Slowing Barillas, [karlas@ucm.es](mailto:karlas@ucm.es)

Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid

#### **Resumen**

La resistencia antibiótica es uno de los mayores problemas actuales, especialmente en infecciones del tracto superior respiratorio, con un alto riesgo de infección. Dentro de las distintas teorías que intentan explicar esta resistencia patológica está la comunicación intercelular (quorum sensing), mediante la creación de biofilms responsables de estas resistencias. Los productos naturales, han mostrado ser una herramienta en el tratamiento de estos biofilms. En el siguiente trabajo se llevó a cabo la extracción y caracterización de compuestos de la especie *Rubus boliviensis* con actividad antimicrobiana y antibiofilm. Nuestros resultados reportan aislamiento del compuesto ácido (2E)-2-ciano-3-(4-hidroxifenil) acrílico por primera vez en esta especie que presentó una actividad antimicrobiana (0,86  $\mu\text{M}$ ) sobre bacterias Gram negativas. Adicionalmente, este compuesto mostró una actividad anti-biofilm (1,01  $\mu\text{M}$ ) y anti-quorum sensing (82,08% de inhibición de violaceína) sobre las mismas bacterias.

**Palabras clave:** *Rubus*, antimicrobianos, biopelículas, quorum sensing

#### **Abstract**

Antibiotic resistance is one of the biggest current problems, especially in upper respiratory tract infections with a high risk of infection. Among the different theories that try to explain this pathological resistance is intercellular communication (quorum sensing), through the creation of biofilms responsible for this resistance. Natural products have been shown to be a tool in the treatment of these biofilms. In the following work, the extraction and characterization of compounds from the *Rubus boliviensis* species with antimicrobial and antibiofilm activity were carried out. Our results report the isolation of the acid compound (2E)-2-cyano-3-(4-hydroxyphenyl) acrylic for the first time in this species that showed antimicrobial activity (0.86  $\mu\text{M}$ ) against Gram-negative bacteria. Additionally, this compound showed antibiofilm (1.01  $\mu\text{M}$ ) and anti-quorum sensing (82.08% violacein inhibition) activity on these bacteria.

**Key words:** *Rubus*, antimicrobials, biofilms, quorum sensing

## Introducción

Los microorganismos bacterianos forman parte de nuestro ecosistema y tienen una relación tanto positiva como negativa, pudiendo ser beneficiosos, inocuos o patógenos. Con relación a su patogenicidad, algunas bacterias han logrado evadir los distintos tratamientos empleados en una serie de enfermedades, a través de diversos mecanismos como la mutación o alteración de membranas que impiden o disminuyen el transporte activo de los principios activos (Lazar y col., 2013). Por otra parte, la resistencia a los antibióticos es una problemática para la sanidad actual, siendo España uno de los países europeos que mayores tasas de resistencia presenta (Sánchez-García y col., 2018). Dentro de las enfermedades bacterianas, las infecciones del tracto superior del aparato respiratorio son unas de las más comunes entre la población. Estas pueden darse en distintas partes del aparato respiratorio como boca, nariz, nasofaringe, laringe (Plan Nacional frente a la resistencia de antibióticos), siendo bacterias como *Streptococcus pneumoniae* o *Haemophilus influenzae* las responsables de un gran número de procesos infecciosos.

En este sentido, las líneas actuales de estudio se basan en el mecanismo patogénico por la interrelación entre organismos, denominada quorum sensing, así como la formación de biofilm, interrelacionados ahondado en el conocimiento de la comunicación bacteriana. Este proceso de comunicación química célula-célula se basa en la producción, detección y respuesta a moléculas señalizadoras extracelulares denominadas autoinductores (Mukherjee y Bassler, 2019). El quorum sensing bacteriano y la formación de biofilms es especialmente interesante, dado que puede ser una diana de acción para la resistencia a determinados principios activos.

Asimismo, las infecciones microbianas que conllevan la formación de un biofilm pueden ser tratados por productos naturales con propiedades medicinales (Fazil y Nikhat, 2020), atribuidas a los metabolitos como alcaloides, aceites esenciales, flavonoides, taninos, terpenoides, y compuestos fenólicos (Georgescu y col., 2016). Entre las plantas medicinales con esta actividad se encuentra la especie *Rubus boliviensis* Focke (Rosaceae) denominada como “Khari Khari”, empleada tradicionalmente en el tratamiento de infecciones del tracto respiratorio superior (Oblitas, 1993).

El propósito de este trabajo es el aislamiento de compuestos de *Rubus boliviensis* con actividad antibacteriana y anti-biofilm.

## 2. Material y Métodos

### 2.1. Material vegetal

Las hojas de la especie vegetal *Rubus boliviensis* fueron recolectadas en el departamento de La Paz, Bolivia a una altitud de 3918 m (16°35'15.1"S 68°58'21.2"W). La identificación botánica fue confirmada por el Herbario Nacional de Bolivia por la Dra. Carla Maldonado (Nº 48393).

### 2.2. Proceso de extracción

La especie vegetal (131 g) se sometió a una maceración repetida a temperatura ambiente (25±5°C) y durante 24 h con hexano (Hex) (3x500 mL), diclorometano/metanol (DCM/MeOH) (1:1, 3x500 mL) y agua destilada (H<sub>2</sub>O) (3x500 mL). A continuación, se realizaron ensayos de actividad antibacteriana de cada uno de los extractos obtenidos.

Posteriormente se realizó el fraccionamiento del extracto más activo (DCM/MeOH) mediante cromatografía en columna (12x60 cm; gel de sílice 60 µm) y un gradiente de polaridad (Hex/Acetato de etilo (5:1→1:1)). A continuación, se agruparon las fracciones obtenidas

utilizando cromatografías en capa fina (CCFs, cromatoplasmas de gel de sílice 60 F254). Para el revelado se emplearon reveladores químicos (*p*-Anisaldehído/EtOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y Vainillina/EtOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) o físicos (luz UV a 254 y 365 nm). Finalmente, se procedió a realizar la caracterización y los ensayos biológicos de los compuestos aislados.

### 2.3. Método de análisis y determinación estructural.

Para la elucidación estructural de los compuestos se utilizó un espectrómetro Bruker Advance DRX de 500 MHz (<sup>1</sup>H-RMN) y de 125 MHz (<sup>13</sup>C-RMN). Las muestras se solubilizaron en 0,4 mL de CDCl<sub>3</sub>-d<sub>1</sub>. También se realizaron análisis de espectrometría de masas con un espectrómetro acoplado a un analizador QTOF híbrido modelo MAXIS II mediante una técnica de ionización por electrospray.

### 2.5. Microorganismos

Se utilizaron las cepas de *Haemophilus influenzae* (Gram negativa), *Legionella pneumophila* (Gram negativa), *Chromobacterium violaceum* (Gram negativa), *Streptococcus pneumoniae* (Gram positiva) y *Mycobacterium tuberculosis* (Gram positiva).

### 2.6. Medición de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Se utilizó el método de dilución doble en serie para medir la CMI. Se llenaron diez tubos de ensayo estériles con 1 mL de medio de cultivo (caldo Mueller Hinton, CMH). A continuación, se añadió a cada tubo 1 mL de las muestras preparadas a diferentes concentraciones. Posteriormente, se añadió a cada tubo 0,1 mL de cultivo bacteriano (1×10<sup>8</sup> UFC/mL) y se mezcló fuertemente. Las bacterias se cultivaron a 30°C durante 48 h. Se determinó las concentraciones más bajas de los compuestos que suprimieron el crecimiento de los microorganismos como valores de CMI. Se utilizó Ofloxacin como control positivo.

### 2.7. Inhibición de la formación de biopelículas

El ensayo de formación de biopelículas se evaluó utilizando placas de poliestireno de 12 pocillos. Los cultivos bacterianos se inocularon en medio de caldo Tryptic Soy (TSB, 280 µL) con una turbidez inicial de 0,5 OD a 600 nm (0,5 McFarland) y se dejaron incubar durante 24 h para generar una biopelícula. Luego, se agregaron diferentes concentraciones de los compuestos al cultivo bacteriano y se incubaron a 30 °C durante 48 h. Para medir la cuantificación del biofilm, las placas de 12 pocillos se tiñeron con cristal violeta. Posteriormente, se añadió 95% de etanol a las células teñidas y se midió la absorbancia a 585 nm para cuantificar la formación total de biopelícula. Se usó Digluconato de Clorhexidina como control positivo. El %Inh = (control de crecimiento de OD – muestra de OD) / control de crecimiento de OD × 100

### 2.8. Ensayo de inhibición de violaceína

Se preparó un cultivo de 24 h (200 µL de *C. violaceum* (0,5 OD a 600 nm) en placas de microtitulación esterilizadas que contenían diferentes concentraciones de compuestos. Las placas se incubaron a 30°C durante 48 h. La observación de una disminución en la producción de pigmento de violaceína midiendo su absorbancia a 585 nm, nos indica su actividad anti-quorum sensing. Se utilizó ciprofloxacina como control positivo. El %Inh Violaceína = (1– Absorbancia del control) / Absorbancia de la muestra × 100

### 2.9. Análisis estadístico

Cada experimento se llevó a cabo por triplicado. Se utilizó ANOVA de dos vías para comparar los efectos de múltiples tratamientos (concentración y tiempo) sobre la variable dependiente (densidad óptica). Esto se midió a un nivel de significación de 0,001. Todos los análisis se realizaron con la versión 9.0.0 de GraphPad Prism Software.

### 3. Resultados y Discusiones

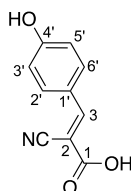
Analizando los espectros UV de los extractos podemos encontrar compuestos fenólicos y alifáticos, al igual que enlaces C-O/N. Así mismo, los extractos Hex y DCM/MeOH presentaron señales a mayores  $\lambda$  (compuestos heteroaromáticos), mostrando un patrón similar al reportado por Santacruz Cifuentes (2011), que determinó la presencia de antocianinas en extractos de *R. melagococcus*. En los espectros IR, las señales más identificativas fueron heteroatómicas aromáticas y olefínicas, especialmente en el extracto DCM/MeOH. Finalmente, en el espectro de  $^1\text{H}$  NMR se pudo apreciar señales correspondientes a ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas, terpenos, y alcaloides.

Con respecto a la actividad antimicrobiana en la Tabla 1 se observa que el extracto DCM/MeOH mostró una mayor actividad antimicrobiana, siendo más potentes sobre las cepas Gram negativas. En base a estos resultados se procedió a fraccionar el extracto DCM/MeOH por medio de columnas de sílice utilizando como fase móvil Hex:Acetato de Etilo (3:1). El resultado del fraccionamiento de este extracto dio como resultado el aislamiento tres compuestos.

**Tabla 1.** Actividad antimicrobiana en  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a las 48 h de los extractos de *R. boliviensis*.

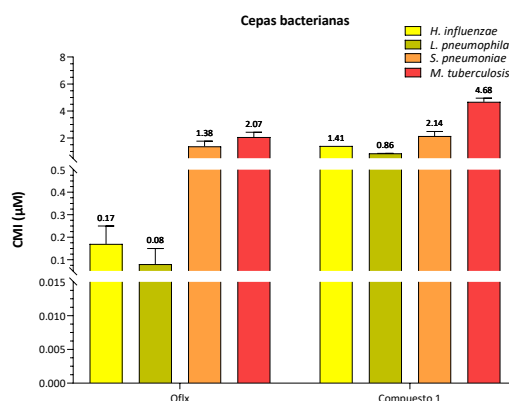
Extractos	Concentración mínima inhibitoria (CMI) $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 48 h			
	<i>H. influenzae</i>	<i>L. pneumophila</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>M. tuberculosis</i>
Ofloxacina	0,06 $\pm$ 0,002	0,03 $\pm$ 0,001	0,56 $\pm$ 0,03	2,18 $\pm$ 0,22
Extracto HEX	52,35 $\pm$ 1,71	45,22 $\pm$ 1,51	75,00 $\pm$ 1,18	96,23 $\pm$ 1,65
Extracto DCM/MeOH	22,34 $\pm$ 1,51	14,66 $\pm$ 1,05	43,83 $\pm$ 1,40	56,01 $\pm$ 1,62
Extracto H2OD	72,34 $\pm$ 1,98	61,12 $\pm$ 1,23	91,83 $\pm$ 1,57	96,58 $\pm$ 1,79

Analizando los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN y EM podemos indicar que uno de los compuestos corresponde al ácido (2*E*)-2-ciano-3-(4-hidroxifenil) acrílico (Figura 1). Dado que se observa en el espectro  $^1\text{H}$ -RMN un grupo de señales formado por dos pares de dobletes a 7,94-7,92 ppm y 6,91-6,89 ppm correspondientes a los pares de hidrógenos H-2'/H-6' y H-3'/H-5', respectivamente. Este cambio de patrón es típico de los sistemas bencílicos sustituidos en la posición *p*- del anillo (Armstrong y col., 2011). Además, en el espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY se observa el acoplamiento entre los átomos H-3'/H-5' y H-2'/H-6' del sistema aromático. Así mismo se observa un acoplamiento entre los átomos H-2'/H-6' y el átomo H-3. Mediante los espectros  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC y DEPT se asignan los carbonos C-5 ( $\delta_{\text{C}}$ : 155,8 ppm), C-2'/C-6' ( $\delta_{\text{C}}$ : 134,9 ppm) y C-3'/C-5' ( $\delta_{\text{C}}$ : 117,2 ppm) que corresponden a las señales de protones explicadas anteriormente. Finalmente, con el espectro HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , se establecen las correlaciones  $^{2,3}J_{\text{CH}}$  entre los carbonos C-1 ( $\delta_{\text{C}}$ : 165,9 ppm), C-4' ( $\delta_{\text{C}}$ : 164,0 ppm), C-1' ( $\delta_{\text{C}}$ : 124,5 ppm) y C-2 ( $\delta_{\text{C}}$ : 99,5 ppm) y sus respectivos hidrógenos.



**Figura 1.** Compuesto 1 (Ácido (2E)-2-ciano-3-(4-hidroxifenil) acrílico).

En relación con la actividad antimicrobiana podemos indicar que el compuesto **1** mostró un efecto antibacteriano a un CMI entre 0,86 y 1,41  $\mu\text{M}$  para bacterias Gram negativas y 2,14-4,68  $\mu\text{M}$  para bacterias Gram positivas (Figura 2).



**Figura 2.** Actividad antimicrobiana en  $\mu\text{M}$  a las 48 h de los compuestos aislados de *R. boliviensis*.

Asimismo, el compuesto **1** mostró un efecto anti-biofilm para bacterias Gram negativas (1.01-1.97  $\mu\text{M}$ ) y para bacterias Gram positivas (4,01-6,60  $\mu\text{M}$ ) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Actividad anti-biofilm en  $\mu\text{M}$  a las 48 h de los compuestos aislados de *R. boliviensis*.

Compuestos	Actividad antibiofilm (CMIB50 $\mu\text{M}$ ) a las 48 h			
	<i>H. influenzae</i>	<i>L. pneumophila</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>M. tuberculosis</i>
Clorhexidina digluconato	1,95±0,49	1,73±0,03	2,98±0,30	6,03±0,63
Compuesto 1	1,97±0,09	1,01±0,06	4,01±0,32	6,60±0,44

Finalmente, el compuesto **1** mostró una actividad anti-quorum sensing a una concentración de 0,09  $\mu\text{M}$ . Siendo más potente que el control positivo Ciprofloxacina (0,17  $\mu\text{M}$ ).

**Table 3.** Actividades anti-biofilm y anti-quorum de compuestos de *R. boliviensis* en *C. violaceum*.

Muestras	<i>Chromobacterium violaceum</i>				
	Conc. ( $\mu\text{M}$ )	Anti-biofilm (% inhibición)	Conc. ( $\mu\text{M}$ )	Anti-quorum sensing (mm)	% inhibición de violaceina
Ciprofloxacina	0,24±0,02	63,14	0,17±0,02	11,36±2,80	77,27
Compuesto 1	0,16±0,01	70,95	0,09±0,01	7,13±1,02	82,08

Analizando los resultados se puede indicar que la actividad del compuesto **1** presenta una mayor actividad sobre las bacterias Gram negativas. Esto se debe que a su estructura química interacciona con unas moléculas señalizadoras presentes en la membrana de las bacterias Gram negativas llamadas lactonas de acil-homoserina (AHL) que actúan como reguladores genéticos

en procesos Quorum. Esta interacción sucede debido a la activación de unas enzimas llamadas acil-homoserina lactonasas, por compuestos con fragmentos que presentan un grupo 2-ciano acrílico, que son capaces de inhibir la activación de AHLs evitando la expresión genética bacteriana y, por consiguiente, su propagación (Fang y col., 2013).

#### 4. Conclusiones

Nuestros resultados respaldan las propiedades de la planta *Rubus boliviensis* en el tratamiento de enfermedades respiratorias causadas por microorganismos. Asimismo, es la primera vez que se reporta el compuesto ácido (2E)-2-ciano-3-(4-hidroxifenil) acrílico en esta especie. Finalmente, debemos indicar que este compuesto mostró efectos antibacteriano y antibiofilm prometedoros, pudiendo ser considerado como compuesto de partida para la síntesis de una serie de análogos con mayor actividad.

#### Referencias bibliográficas

- Armstrong, David & Balloch, Liam & Hevia, Eva & Kennedy, Alan & Mulvey, Robert & O'Hara, Charles & Robertson, Stuart. (2011). Meta -metallation of *N, N*-dimethylaniline: Contrasting direct sodium-mediated zincation with indirect sodiation-dialkylzinc co-complexation. *Beilstein journal of organic chemistry*, 7.
- Fang C, Yuxin G, Xiaoyi C, Zhimin Y, Xianzhen L. Quorum Quenching Enzymes and Their Application in Degrading Signal Molecules to Block Quorum Sensing-Dependent Infection. *Int J Mol Sci*. 2013; 14: 17477-17500. <https://doi.org/10.3390/ijms140917477>.
- Fazil, M., Nikhat, S. 2020. Topical medicines for wound healing: A systematic review of Unani literature with recent advances. *J Ethnopharmacol* 257, 112878. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112878>
- Georgescu, M., Marinas, O., Popa, M., Stan, T., Lazar, V., Bertesteanu, S.V., and Chifiriuc, M.C. 2016. Natural Compounds for Wound Healing. In: Fonseca C. Worldwide Wound Healing. <https://doi.org/10.5772/65652>
- Lázár V., Pal Singh G., Spohn R., Nagy I., Horváth B., Hrtyan M., Busa-Fekete R, Bogos B, Méhi O, Csörgő B, Pósfai G, Fekete G, Szappanos B, Kégl B, Papp B, Pál C (2013). Bacterial evolution of antibiotic hypersensitivity. *Mol Syst Biol* 9, 700. <https://doi.org/10.1038/msb.2013.57>.
- Mukherjee, S. & Bassler, B.L. (2019). Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. *Nat Rev Microbiol*, 17, 371-382. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0186-5>.
- Oblitas, E.P. 1993. Plantas medicinales de Bolivia. Los amigos del libro. Cochabamba, Bolivia, pp. 133-135.
- Plan Nacional frente a la resistencia de antibióticos. Mapas de consumo en salud humana. <https://www.resistenciaantibioticos.es/es/profesionales/vigilancia/mapas-de-consumo/consumo-antibioticos-humana>. (Consultado el 11 de marzo de 2023).
- Sánchez-García J.M., Sorlózano-Puerto A., Navarro-Marí J.M., Gutiérrez Fernández J. (2018). Evolución de la resistencia a antibióticos de microorganismos causantes de infecciones del tracto urinario: un estudio de vigilancia epidemiológica de 4 años en población hospitalaria. *Rev Clin Esp*. <https://doi.org/10.1016/j.rce.2018.07.005>.
- Santacruz Cifuentes, L.A. (2011). *Análisis químico de antocianinas en frutos silvestres colombianos* [Resumen extendido de Trabajo de Fin de Máster no publicado]. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de química.

**76986: Identification and analysis of ALS9 allelic variation in C. albicans clinical and commensal strains****Área de conocimiento:** FARMACIA**Autor(es):** GABRIELA FERNÁNDEZ RUZ, ALEJANDRA FERNÁNDEZ TORREGO**Tutor(es):** Rebeca Maria del Mar Alonso Monge**Universidad:** Universidad Complutense de Madrid**Facultad:** Facultad de Farmacia**Titulación:** Grado en Farmacia**Formato:** Póster - Investigación básica**Palabras Clave:** C. albicans, adhesins, ALS9 / C. albicans, adhesinas, ALS9

Candida albicans is a polymorphic fungus that can cause a range of infections from superficial candidiasis, such as vaginal candidiasis, being of particular importance due to its prevalence, to potentially lethal systemic infections. The presence of adhesins on cell surfaces, such as Agglutinin-Like Sequence (ALS) proteins, is important since these mediate adhesion and invasion of host cells and abiotic surfaces, and could potentially be used as an antigen for a vaccine against C. albicans. The fungus has 8 ALS loci, including ALS1-7 and ALS9 which has two allelic variants. In this study, we aimed to analyze the distribution of ALS9-1 and ALS9-2 alleles in clinical and commensal C. albicans strains. We performed the genomic DNA extraction of 29 C. albicans strains using two different protocols, and then Polymerase Chain Reactions (PCR) to amplify each allele. Interestingly, we found two sizes of the allele 1, which have not yet been sequenced. The results show a higher prevalence of heterozygotes in clinical strains (66,6%), while ALS9-2 homozygotes were more common in commensal strains (57,1%). Overall, these findings suggest that there may be differences in the distribution of ALS alleles between clinical and commensal C. albicans strains. Further research is needed to explore the potential implications of these differences for understanding the pathogenesis and virulence of this fungus.

Candida albicans es un hongo polimórfico que puede causar una variedad de infecciones, desde candidiasis superficiales, como la candidiasis vaginal, de gran importancia debido a su prevalencia, hasta infecciones sistémicas potencialmente letales. La presencia de adhesinas en la superficie celular, como las proteínas de secuencia similar a aglutinina (ALS), median la adhesión e invasión de células huésped y a superficies abióticas, y podrían potencialmente utilizarse como antígeno para una vacuna contra C. albicans. El hongo tiene 8 loci de ALS, incluyendo ALS1-7 y ALS9, que tiene dos variantes alélicas. En este estudio, se analizó la distribución de los alelos ALS9-1 y ALS9-2 en cepas clínicas y comensales de C. albicans. Se realizó la extracción de ADN genómico de 29 cepas de C. albicans utilizando dos protocolos diferentes, y luego se realizaron reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar cada alelo. Curiosamente, se encontraron dos tamaños del alelo 1, que aún no han sido secuenciados. Los resultados muestran una mayor prevalencia de heterocigotos en cepas clínicas (66,6%), mientras que los homocigotos ALS9-2 fueron más comunes en cepas comensales (57,1%). En general, estos hallazgos sugieren que puede haber diferencias en la distribución de los alelos ALS entre cepas clínicas y comensales de C. albicans, pero se necesitan más investigación para explorar las posibles implicaciones de estas diferencias en la comprensión de la patogénesis y virulencia de este hongo.

## Identification and analysis of *ALS9* allelic variation in *C. albicans* clinical and commensal strains / Identificación y análisis de las variantes alélicas de *ALS9* en cepas clínicas y comensales de *C. albicans*

- 1467776, Gabriela Fernández Ruz, [gabrif02@ucm.es](mailto:gabrif02@ucm.es).
- 1517122, Alejandra Fernández Torrego, [alfern22@ucm.es](mailto:alfern22@ucm.es).
- Tutor 1: Rebeca Maria del Mar Alonso Monge, [realonso@ucm.es](mailto:realonso@ucm.es)
- Afiliaciones: Facultad de Farmacia, UCM

### Abstract

*Candida albicans* is a polymorphic fungus that can cause a range of infections from superficial candidiasis, such as vaginal candidiasis, being of particular importance due to its prevalence, to potentially lethal systemic infections. The presence of adhesins on cell surfaces, such as Agglutinin-Like Sequence (*ALS*) proteins, is important since these mediate adhesion and invasion of host cells and abiotic surfaces, and could potentially be used as an antigen for a vaccine against *C. albicans*. The fungus has 8 *ALS* loci, including *ALS1-7* and *ALS9* which has two allelic variants. In this study, we aimed to analyze the distribution of *ALS9-1* and *ALS9-2* alleles in clinical and commensal *C. albicans* strains. We performed the genomic DNA extraction of 29 *C. albicans* strains using two different protocols, and then Polymerase Chain Reactions (PCR) to amplify each allele. Interestingly, we found two sizes of the allele 1, which have not yet been sequenced. The results show a higher prevalence of heterozygotes in clinical strains (66,6%), while *ALS9-2* homozygotes were more common in commensal strains (57.1%). Overall, these findings suggest that there may be differences in the distribution of *ALS* alleles between clinical and commensal *C. albicans* strains. Further research is needed to explore the potential implications of these differences for understanding the pathogenesis and virulence of this fungus.

*Candida albicans* es un hongo polimórfico que puede causar una variedad de infecciones, desde candidiasis superficiales, como la candidiasis vaginal, de gran importancia debido a su prevalencia, hasta infecciones sistémicas potencialmente letales. La presencia de adhesinas en la superficie celular, como las proteínas de secuencia similar a aglutinina (*ALS*), median la adhesión e invasión de células huésped y a superficies abióticas, y podrían potencialmente utilizarse como antígeno para una vacuna contra *C. albicans*. El hongo tiene 8 loci de *ALS*, incluyendo *ALS1-7* y *ALS9*, que tiene dos variantes alélicas. En este estudio, se analizó la distribución de los alelos *ALS9-1* y *ALS9-2* en cepas clínicas y comensales de *C. albicans*. Se realizó la extracción de ADN genómico de 29 cepas de *C. albicans* utilizando dos protocolos diferentes, y luego se realizaron reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar cada alelo. Curiosamente, se encontraron dos tamaños del alelo 1, que aún no han sido secuenciados. Los resultados muestran una mayor prevalencia de heterocigotos en cepas clínicas (66,6%), mientras que los homocigotos *ALS9-2* fueron más comunes en cepas comensales (57,1%). En general, estos hallazgos sugieren que puede haber diferencias en la distribución de los alelos *ALS* entre cepas clínicas y comensales de *C. albicans*, pero se necesitan más investigación para explorar las posibles implicaciones de estas diferencias en la comprensión de la patogénesis y virulencia de este hongo.

**Key words / Palabras clave:** *C. albicans*, adhesins, *ALS9* / *C. albicans*, adhesinas, *ALS9*



## Introduction

*Candida albicans* is a polymorphic fungus, naturally present as a human commensal in oral, respiratory, genital and gastrointestinal mucosae. As many other microorganisms, it can become an opportunistic pathogen in certain situations where the immune system is compromised, causing an infection known as candidiasis.

*C. albicans* is the principal cause of opportunistic mycoses worldwide. These can range from superficial infections on skin and mucosae to potentially lethal systemic candidiasis. Superficial candidiasis are somewhat frequent but relatively easy to treat with oral and local antifungal drugs. On the contrary, systemic infections by this pathogen are associated with a high mortality rate even when treated with first line antifungal therapy. Statistically, 75% of the female population develops vulvovaginal candidiasis (VVC) at least once in their life, 40-50% will suffer from a second episode of VVC and 5-8% are diagnosed with recurrent VVC (at least 4 episodes in one year) (Mayer, 2013), which is not effectively treated with fluconazole, the usual drug of choice for oral candidiasis.

A well known characteristic of this pathogen is its variety of pathogenicity mechanisms. One that particularly stands out is the expression of molecules that mediate adhesion and invasion of host cells, as well as adherence to other microorganisms and to abiotic surfaces, allowing for colonization and biofilm formation, called adhesins. This work will focus on the ALS family (Agglutinin-Like Sequences) and specifically on *ALS9*. ALS is a family of genes that encode for glycosylphosphatidylinositol-dependent cell wall proteins (GPI-CWP). There are 8 ALS loci: *ALS1-ALS7* and *ALS9*. Each Als protein is transcribed at a different rate and participates in adhesion to host surfaces to a different degree, as it's shown in experiments using a collection of mutants in ALS genes (Muriciano, 2012). Deletion of the *ALS3* gene has the greatest effect on loss of adhesive function, further studies have reported that Als3 is a potent immunogen in gastro-intestinal colonization models in mice. Vaccines based on this protein are being developed for VVC prophylaxis .

Among the ALS family, Als9 has not been deeply analyzed. Deletion of *ALS9* results in a significant reduction of adhesion to human vascular endothelial cells but has no effect on adhesion to buccal epithelial cells or to laminin. It also does not affect the cell wall structure, the cell's growth or its ability to respond to stressing agents. Lastly, deletion of *ALS9* does not induce compensatory changes in the expression of other ALS genes. To simplify, it appears the *ALS9* protein's function is limited to mediating the adhesion of *C. albicans* to human endothelial cells.

In the course of investigating *ALS9* two alleles were found: *ALS9-1* and *ALS9-2*, each one showing extensive differences in their sequence mainly within the 5' domain. Within the 3' domain two extra regions were identified in the *ALS9-2* sequence named Variable Block 1 (VB1) and VB2 . These differences result in the generation of two proteins with functional differences: initial studies suggest the Als9-2 protein provides a greater contribution to ligand binding. Accordingly, allelic frequency analyses indicate a remarkable preference for the *ALS9-2* allele (Zhao, 2007).

Previous studies in the group where this research was performed indicate that *als9* overexpressing mutant colonizes the intestine of mice to a higher load than the wild type suggesting its relevance during *C. albicans* colonization. Overexpression of *ALS9* in a strain lock

in the yeast morphology revealed that *ALS9* acts as immunogen being recognized by IgAs from mice colonized with wild type *C. albicans* strain. In this work we aimed to investigate the prevalence of the different alleles of *ALS9* in a collection of *C. albicans* isolates and the possible relationship with the virulence or isolation place.

## Materials and Methods

### Strains and growth conditions

29 *Candida albicans* strains were grown overnight at 37 °C in a YPD (1% Yeast extract, 2% Peptone and 2% Dextrose) medium before proceeding with any protocol. The origin of the 29 samples is detailed in **Table 1**.

**Table 1. Origin of strains**

Number of strains	Origin
12	Stool culture
1	Oral cavity
5	Pharyngeal exudate
7	Vaginal discharge
4	Urinary tract
1	Bronchoalveolar lavage

### Quick Protocol for Genomic DNA Extraction from Yeast

To digest the cell walls of *C. albicans* strains, we first created a diluted Zymolyase 1T solution using Zymolyase 100T (2000 u/mL) and purified water. Next, we resuspended a yeast colony from each strain in 20 µL of the Zymolyase 1T solution and incubated the mixture for one hour at 37°C with gentle shaking, followed by a 10-minute incubation at 99°C. After incubation, we centrifuged the mixture at 13,000 rpm for 1 minute and supernatant was used as a template for DNA amplification by PCR.

### Alternative Protocol for Extraction and Purification of Yeast Genomic DNA

We grew each *C. albicans* strain overnight in liquid YPD at 37°C. The following day, we collected 1000 mL of each culture and centrifuged it at 10,000 rpm for 1 minute, discarding the supernatant. Next, we added 128 µL of EDTA (0.5 M, pH 7.4), 0.9 µL of β-mercaptoethanol, 511 µL of sorbitol (1 M), and 5 µL of Zymolyase 10T to each sample. We gently rotated the mixture for 1 hour to break down the cell walls.

After incubating the samples, we centrifuged the mixture at 5,000 rpm for 5 minutes, discarded the supernatant, and resuspended the pellets in a TRIS-EDTA solution. This solution was prepared beforehand using 30 µL of TRIS (1M, pH 7.4), 30 µL of EDTA (0.5 M, pH 8), and 320 mL of purified water. Once the pellet was carefully resuspended, we added 32 µL of 10% SDS and incubated the mixture for 30 minutes at 65°C and 750 rpm in the thermomixer to denature proteins and break the remaining cell membranes.

To precipitate the proteins, we added 160 µL of 5M potassium acetate to each sample and gently inverted them twice before placing them on ice for one hour. After this, we centrifuged the samples at 13,000 rpm for 45 minutes at a low temperature, and then carefully transferred the supernatant, leaving behind the protein precipitate.

To precipitate the genomic DNA, we added cold isopropanol to the sample, and incubated it at -20°C for at least 15 minutes. This allowed the DNA to precipitate out of

solution. After incubation, we centrifuged the mixture at a low temperature for 15 minutes at 13000 rpm and carefully removed the supernatant, leaving the genomic DNA pellet.

To purify the samples, we added cold 70% ethanol to each sample, then centrifuged them for 1 minute before carefully removing the supernatant. We repeated this process three times to ensure thorough purification, discarding the supernatant each time until there was no residual ethanol left in the sample. Finally, we let the samples dry before proceeding with the last step, the RNA degradation.

To prepare the RNase solution, we mixed 10 mg of pure lyophilized RNase in 1 mL of purified water and heated the mixture at 100°C for 10 minutes. We then added 10 µL of this solution to each sample and allowed it to react in the thermomixer at 37°C for 30 minutes. To precipitate the genomic DNA, we added 10 µL of 3M sodium acetate per sample and stored them in 100% ethanol. After storing them in the freezer for at least 20 minutes, we washed the samples with 70% ethanol and centrifuged them, discarding the supernatant until there was no more ethanol left. Then samples were dried and rehydrated in purified water.

### Polymerase Chain Reaction Protocol

We started by preparing a 1:100 dilution of our genomic DNA samples. For the PCR reaction, we used a mix of 2 µL of the diluted DNA, 0.5 µL of each 0.3 µM oligo, 0.2 µL of 10mM dNTPs, 1 µL of 1x buffer, 0.2 µL of MgCl<sub>2</sub>, 0.2 µL of 1U/µL Biotools Polymerase, and 6.2 µL of purified water. The oligo design was carefully optimized using Primer 3 plus and Vector NTI softwares and the *ALS9* sequences consulted in the *Candida* Genome Database.

Because the fragments of amplification and the sizes of the oligos differed for each allele, we used different PCR conditions, presented in **Table 2**. In particular, allele 1 required a longer elongation time due to its larger size, and the oligos had different lengths, so we used a two-temperature PCR protocol to achieve optimal amplification.

**Table 2. Biotools Polymerase PCR Programs for alleles 1 and 2**

	Allele 1			Allele 2		
	Nº cycles	Temperature	Time	Nº cycles	Temperature	Time
<b>Initial Denaturation</b>	1	94°C	5'	1	94°C	5'
<b>Denaturation</b>	5	94°C	1'	30	94°C	1'
		53°C	40''		53°C	45''
<b>Annealing</b>	25	72°C	2'30''		72°C	1'
<b>Extension</b>		94°C	1'		72°C	1'
		58°C	40''			
		72°C	2'30''			
<b>Final Extension</b>	1	72°C	10'	1	72°C	10'
<b>Cooling</b>	∞	4°C	∞	∞	4°C	∞

To prepare the agarose gel for electrophoresis, we mixed 0.2% agarose with TAE buffer (TRIS-HCl, acetic acid, NaEDTA, and purified water). We added 2 µL of loading buffer to the DNA samples before loading them onto the gel. The gel was stained with GelRed®, and we visualized the DNA fragments using UV light.

## Results

### Design of two sets of primers to amplify specifically each *ALS9* allele

The sequence of *ALS9-1* and *ALS9-2* align quite well, both alleles share several domains so to amplify specifically each allele the design of the primers is important. To distinguish between both alleles, the amplification sequence for allele 2 was selected from its variable domain (VB1), which differs from allele 1. Additionally, the C-terminal sequence of the alleles also differs, and therefore, the oligos for allele 1 were designed based on its C-terminal sequence. The designed primers were analyzed to check that they just hybridate and amplify the desired DNA fragment. Their sequences and melting temperatures are shown in **Table 3**.

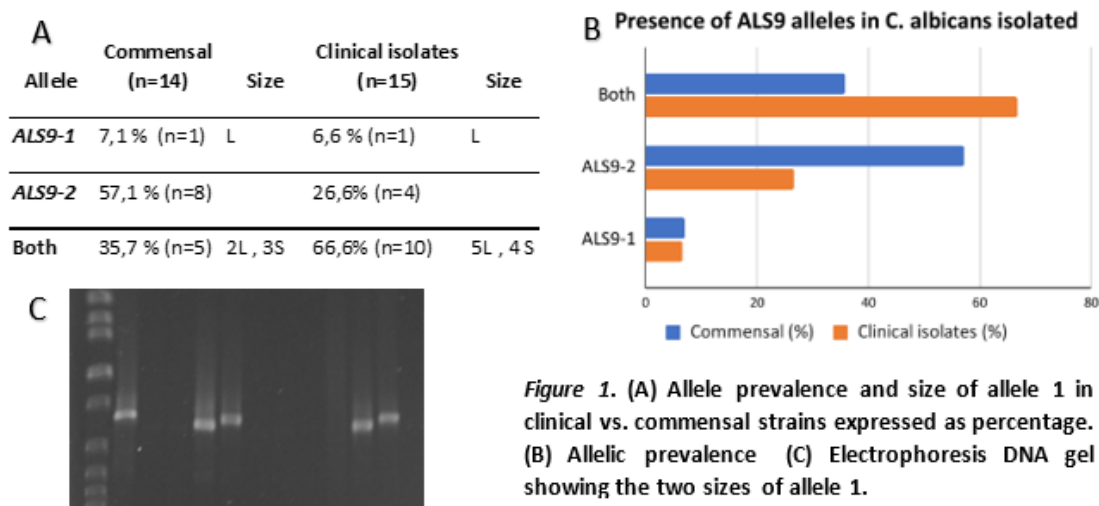
**Table 3. Oligo sequences, application and melting temperatures.**

Name	Sequence 5'-3'	Application	Tm
o-fwALS9-2 VB1	CGTCAGAACCACATTATAGC	Verification of the VB1 region of ALS9 allele 2	53,9
o-revALS9-2 VB1	TGTCGTCTGATACTGTAGTG	Verification of the VB1 region of ALS9 allele 2	54,2
o-ALS9-int-up	GCACCGCATCATCATATGACG	Verification of the C-terminal end of ALS9 allele 1.	56,1
o-ALS9-SN-rev	AGCTGCGGCCGCGAATAAACAAAA AGAATATTGTGACCAATC	Verification of the C-terminal end of ALS9 allele 1.	54,1

### Analyses of the prevalence of *ALS9* allele in *Candida albicans* isolates

29 *C. albicans* isolates were analyzed, 14 isolates were obtained from healthy individuals then they were considered as commensal strains while 15 isolates came from hospitalized patients considering these strains as clinical isolates. *C. albicans* genomic DNA was obtained following the protocols described above, then this DNA was visualized after electrophoresis and stained with gelRed®.

After confirmation that the genomic DNA extraction was successful on all samples, PCR analyses were performed using the CAF2 strain as control, since this strain carries both *ALS9* alleles. The amplification of each allele is listed in table 3. Remarkably, the fragment amplified to the *ALS9-1* allele displayed two different sizes, named as large (L) or small (S) showing the variability of this gene in the population.



**Figure 1. (A)** Allele prevalence and size of allele 1 in clinical vs. commensal strains expressed as percentage. **(B)** Allelic prevalence **(C)** Electrophoresis DNA gel showing the two sizes of allele 1.

The unique commensal strain that displays only these *ALS9-1* allele proceeds from vaginal mucosa, while the rest of commensal strains come from stool or oral cultures and display both or allele *ALS9-2*. Regarding clinical isolates, the origin of the isolates does not correlate with the presence or not of any of both alleles. These data indicate that there is not a correlation between the presence of any of the alleles and the origin of the isolate. The prevalence of each allele listed in **Figure 1.A**.

### Discussion

The first extraction protocol allows for rapid extraction of yeast genomic DNA and initially we found it to be very effective for allele 2 PCR amplification, due to its superior performance. However, we encountered limitations when attempting to amplify allele 1, due to the longer amplification fragment and the requirement for a more purified sample of genomic DNA.

Furthermore, while the alternative extraction protocol usually doesn't involve an RNase step, our analysis of the genomic samples on an agarose gel electrophoresis revealed RNA interference, which suggested insufficient purified genomic DNA. To address this issue, we performed an RNA degradation step to eliminate any interfering RNA molecules.

The study results indicate a higher prevalence of heterozygotes in clinical strains, and *ALS9-2* homozygotes in commensal strains. However, it's important to consider potential methodological issues that may have affected the findings, which could introduce some margin of error.

Additionally, our analysis revealed the presence of two distinct sizes of the allele 1. This observation suggests that there may be repetitive sequences present and further investigation is needed to explore this topic. Specifically, it would be valuable to sequence both types of alleles and assess their functional implications.

### Conclusion

Once we amplified the different *ALS9* alleles from all specimens, we found that 51.7% of the studied strains possess both alleles, 41.4% possess allele 2, and only 6.9% possess allele 1. These data are consistent with previous studies suggesting greater selective pressure to maintain allele 2.

### Bibliography

- Hoyer, L. L., & Cota, E. (2016). *Candida albicans* Agglutinin-Like Sequence (Als) Family Vignettes: A Review of Als Protein Structure and Function. *Frontiers in microbiology*, 7, 280. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00280>
- Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4(2), 119–128. <https://doi.org/10.4161/viru.22913>
- Murciano, C., Moyes, D. L., Runglall, M., Tobouti, P., Islam, A., Hoyer, L. L., & Naglik, J. R. (2012). Evaluation of the role of *Candida albicans* agglutinin-like sequence (Als) proteins in human oral epithelial cell interactions. *PloS one*, 7(3), e33362. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033362>
- Sundstrom P. (2002). Adhesion in *Candida* spp. *Cellular microbiology*, 4(8), 461–469. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2002.00206.x>
- Zhao, X., Oh, S. H., & Hoyer, L. L. (2007). Unequal contribution of *ALS9* alleles to adhesion between *Candida albicans* and human vascular endothelial cells. *Microbiology (Reading, England)*, 153(Pt 7), 2342–2350. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/005017-0>

**77022: Síntesis y caracterización de glicopolímeros de hidroxipropilmetilcelulosa funcionalizados con ácido glucurónico mediante Click-Chemistry / Synthesis and characterization of hydroxypropylmethylcellulose glyccopolymers functionalized with glucuronic acid by Click-Chemistry****Área de conocimiento:** FARMACIA**Autor(es):** Irene Jiménez Gil, Daniel Cañamares Martín**Tutor(es):** Dra. Aida Flores Aguilar-Amat, Dra. María José Hernaiz Gómez-Dégano**Universidad:** Universidad Complutense de Madrid**Facultad:** Facultad de Farmacia**Titulación:** Grado en Farmacia**Formato:** Póster - Investigación básica**Palabras Clave:** Carbohidratos, Glicopolímeros, Ácido glucurónico, Química Click

Resumen: Los avances realizados en los últimos años en el estudio de los carbohidratos han permitido comprender la enorme relevancia de estos compuestos a nivel fisiológico y patológico en el ser humano. Esto ha conllevado un considerable desarrollo de los neoglicoconjugados, materiales funcionalizados con carbohidratos, con el objetivo de poder ser utilizados como nuevos agente terapéuticos. Para ello, se está haciendo uso de los glicopolímeros, un tipo de biomateriales que cada vez está tomado mayor relevancia en biomedicina por sus propiedades únicas derivadas de sus complejas estructuras y características químicas y físicas. Este trabajo tiene como objetivo general la obtención y caracterización de un glicopolímero de hidroxipropilmetilcelulosa funcionalizado con ácido glucurónico (GlcA), un monosacárido de gran importancia fisiológica y patológica, lo que le confiere una gran aplicabilidad en biomedicina. Para llevar a cabo esta funcionalización hemos utilizado una estrategia sostenible basada en la química click, una reacción de cicloadición 1-4 regioselectiva.

Abstract: The advances made in recent years in the study of carbohydrates have allowed us to understand the enormous relevance of these compounds at the physiological and pathological level in the human being. This has led to a considerable development of neoglycoconjugates, materials functionalized with carbohydrates, in order to be used as new therapeutic agents. To do this, glyccopolymers are being used, a type of biomaterials that is becoming increasingly important in biomedicine for its unique properties derived from its complex structures and chemical and physical characteristics. This work has as a general objective the obtaining and characterization of a glyccopolymer of hydroxypropylmethylcellulose functionalized with glucuronic acid (GlcA), a monosaccharide of great physiological and pathological relevance, which gives it a great applicability in biomedicine. To carry out this functionalization we have used a sustainable strategy based on chemistry click, a regioselective cycloaddition reaction 1-4.

## Síntesis y caracterización de glicopolímeros de hidroxipropilmetilcelulosa funcionalizados con ácido glucurónico mediante Click-Chemistry / Synthesis and characterization of hydroxypropylmethylcellulose glyccopolymers functionalized with glucuronic acid by Click-Chemistry

- **Primer autor:** 1524193, Irene Jiménez Gil, irenej04@ucm.es
- **Autor 2:** 1524249, Daniel Cañamares Martín, dancanam@ucm.es
- **Tutor 1:** Dra. Aida Flores Aguilar-Amat, aiflores@ucm.es
- **Tutor 2:** Dra. María José Hernaiz Gómez-Dégano, mjhernai@ucm.es
- **Afiliaciones:** Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid
- **Resumen:**

Los avances realizados en los últimos años en el estudio de los carbohidratos han permitido comprender la enorme relevancia de estos compuestos a nivel fisiológico y patológico en el ser humano. Esto ha conllevado un considerable desarrollo de los neoglicoconjugados, materiales funcionalizados con carbohidratos, con el objetivo de poder ser utilizados como nuevos agente terapéuticos. Para ello, se está haciendo uso de los glicopolímeros, un tipo de biomateriales que cada vez está tomado mayor relevancia en biomedicina por sus propiedades únicas derivadas de sus complejas estructuras y características químicas y físicas. Este trabajo tiene como objetivo general la obtención y caracterización de un glicopolímero de hidroxipropilmetilcelulosa funcionalizado con ácido glucurónico (GlcA), un monosacárido de gran importancia fisiológica y patológica, lo que le confiere una gran aplicabilidad en biomedicina. Para llevar a cabo esta funcionalización hemos utilizado una estrategia sostenible basada en la química click, una reacción de cicloadición 1-4 regioselectiva.
- **Palabras clave:** Carbohidratos, Glicopolímeros, Ácido Glucurónico, Química Click.
- **Abstract:**

The advances made in recent years in the study of carbohydrates have allowed us to understand the enormous relevance of these compounds at the physiological and pathological level in the human being. This has led to a considerable development of neoglycoconjugates, materials functionalized with carbohydrates, in order to be used as new therapeutic agents. To do this, glyccopolymers are being used, a type of biomaterials that is becoming increasingly important in biomedicine for its unique properties derived from its complex structures and chemical and physical characteristics. This work has as a general objective the obtaining and characterization of a glycogenomer of hydroxypropylmethylcellulose functionalized with glucuronic acid (GlcA), a monosaccharide of great physiological and pathological relevance, which gives it a great applicability in biomedicine. To carry out this functionalization we have used a sustainable strategy based on chemistry click, a regioselective cycloaddition reaction 1-4.
- **Key words:** Carbohydrates, Glyccopolymers, Glucuronic Acid, Click-Chemistry.

## **INTRODUCCIÓN**

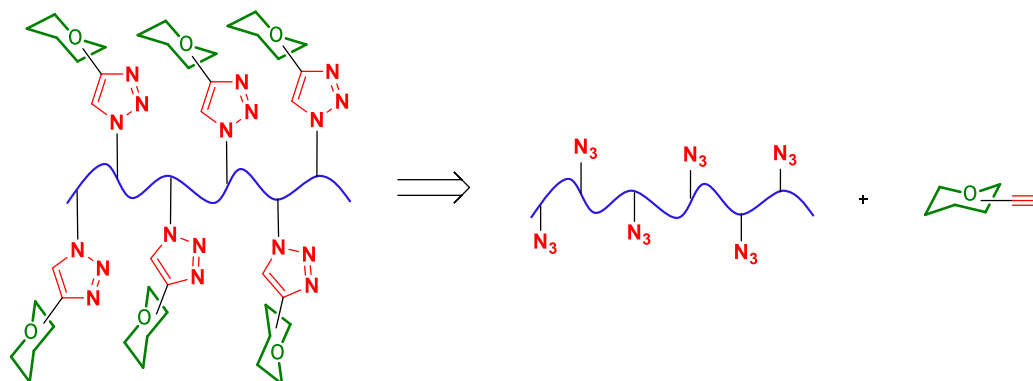
En los últimos años, la glicobiología ha cobrado gran importancia a raíz de numerosos estudios que han demostrado el papel fundamental de los glicoconjugados (glicolípidos, glicoproteínas y glicosaminoglicanos (GAG)) en multitud de procesos de comunicación celular a nivel fisiológico [1,2], así como en múltiples procesos patológicos, entre los que destacan procesos oncológicos, e infecciones bacterianas y víricas [3]. Con el objetivo de utilizar estos carbohidratos en la síntesis de glicoestructuras con aplicaciones en biomedicina, es necesario llevar a cabo su modificación principalmente química [4]. En este sentido, se han sintetizado diferentes glicoestructuras con el objetivo de mimetizar los carbohidratos presentes en las superficies celulares. El heparán sulfato es un polisacárido lineal que se encuentra en las superficies celulares de los tejidos animales y permite la interacción celular entre las células del organismo y agentes patógenos como son las bacterias y virus [5]. Con la utilización del ácido glucurónico (GlcA) para la elaboración de estas glicoestructuras, queremos mimetizar la acción del heparán sulfato en la superficie celular bloqueando la acción invasora de los agentes patógenos mencionados anteriormente. El grupo carboxílico del ácido glucurónico sustituye la carga negativa que aporta el grupo sulfato del heparán sulfato, que permite interacciones iónicas durante las infecciones bacterianas y víricas. Además, la interacción se ve reforzada gracias a los puentes de hidrógeno que también se dan en la interacción [6]. En general, las interacciones entre proteína y carbohidrato son débiles, pero a través del uso de ligandos multivalentes se puede compensar la deficiencia ya que permite unir el carbohidrato a numerosos sitios de unión al mismo tiempo [7]. De este modo, aumentando el número de restos de monosacárido, se pretende incrementar las interacciones con el receptor y aumentar su actividad biológica.

Los polímeros son macromoléculas que se forman por la unión de un gran número de moléculas más simples y de menor tamaño llamadas monómeros [8]. Son un tipo de biomateriales ampliamente empleados en biomedicina dadas sus propiedades únicas derivadas de sus complejas estructuras y sus características químicas y físicas. Esto les ha permitido ser muy útiles en la ingeniería de tejidos, como sistemas de liberación controlada de fármacos o como parte de dispositivos médicos. Uno de los factores más importantes a la hora de seleccionar un material para su uso en la práctica clínica, es su biocompatibilidad en el organismo [9]. Además, en los últimos años se ha producido una creciente tendencia en preparar estos biomateriales a partir de los residuos generados en numerosas industrias, existiendo una tendencia a seguir los principios de la química sostenible, economía circular y valorización de los residuos [10]. La celulosa es un polímero natural formado por la unión de moléculas de  $\beta$ -glucosa mediante enlaces  $\beta$ -1,4-O-glucosídico, es un residuo aprovechable procedente de la industria a partir del cual se han podido sintetizar derivados como la metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa o carboximetilcelulosa [8]. Uno de los polímeros más interesantes actualmente es la hidroxipropilcelulosa (HPC) que se está estudiando como base para la formación de fármacos por tratarse de un compuesto natural de fácil acceso, biodegradable y no dañino para el organismo.

El objetivo principal del presente trabajo consiste en la funcionalización de la HPC con derivados del GlcA para obtener un nuevo glicopolímero con potencial actividad terapéutica. La estructura principal del glicopolímero que se propone consta de un núcleo de HPC unido a los



anillos del ácido glucurónico a través de un “linker” de triazol mediante una reacción de Click-Chemistry catalizada por cobre (I). Esta reacción es rápida, sencilla y muy eficiente que permite la obtención de productos de forma selectiva y regioespecífica por reacción de un grupo alquino y un grupo azida en las moléculas que van a ser unidas [11].



**Figura 1.** Retrosíntesis general de la cicloadición 1,4 alquino-azida

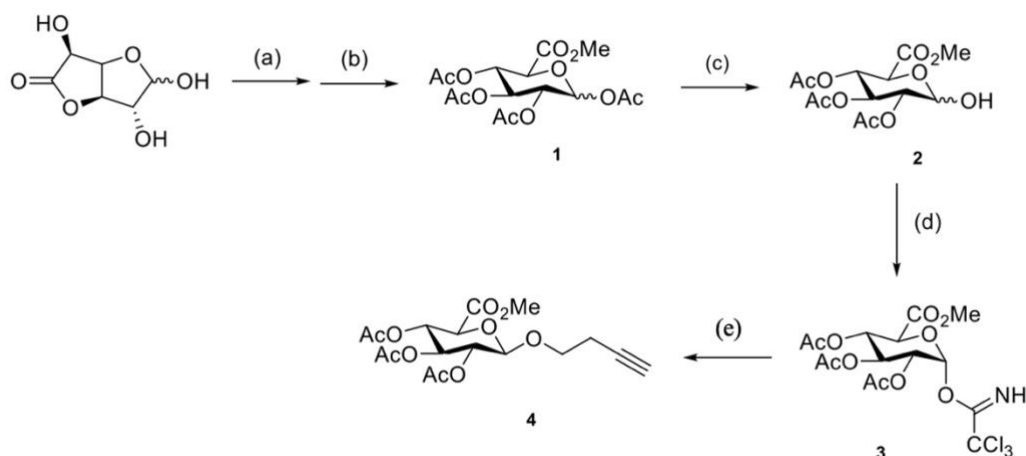
## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Para este trabajo se han llevado a cabo procedimientos experimentales en el laboratorio de la Unidad de Química Orgánica y Farmacéutica del Departamento de Química Farmacéutica de la Facultad de Farmacia, en la Universidad Complutense de Madrid. Algunos de los reactivos empleados en los procedimientos han sido hidroxipropilcelulosa de 80.000 g/mol (HPC-80, Sigma-Aldrich, 99%),  $\gamma$ -lactona D-(+)- ácido glucurónico (lactona comercial, Sigma-Aldrich, 99% de pureza), sulfato de cobre (II) pentahidratado ( $\text{CuSO}_4$ , Merck, 99%), L-ascorbato sódico (NaAsc, Sigma-Aldrich, 99%), ácido 5-hexinoico (TCI, 99% de pureza), 3-butinol (ThermoScientific, 98% de pureza), entre otros.

Además, se ha llevado a cabo una búsqueda bibliográfica en bases de datos como Pubmed, Google Scholar, PubChem, SciFinder y Biblioteca Complutense.

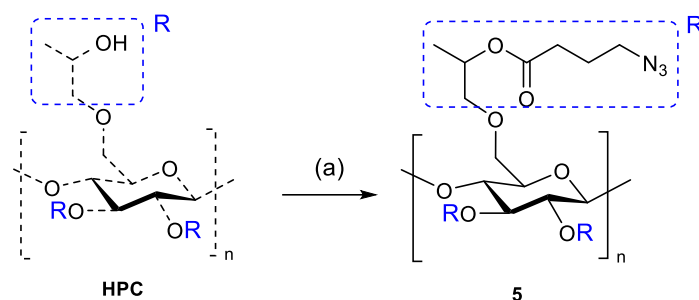
## **RESULTADOS**

La síntesis del derivado glucurónico se muestra en el esquema 1. La  $\gamma$ -lactona del ácido D-glucurónico comercial se trató con NaOMe y posteriormente con anhídrido acético en piridina para dar lugar al glucurónido peracetilado (**1**). A continuación, se produjo la desprotección selectiva de OH anomérico en presencia de bencilamina con un rendimiento del 88%. El compuesto **2** se hizo reaccionar con tricloroacetitrilo para dar lugar al correspondiente tricloroacetimidato (**3**) con un rendimiento del 97%, que posteriormente se trató con 3-butinol-1-ol en presencia de tamiz molecular de 4Å y  $\text{BF}_3\text{OEt}_2$ , para aislar el GlcA-alquino (**4**) con rendimiento moderado (44%).



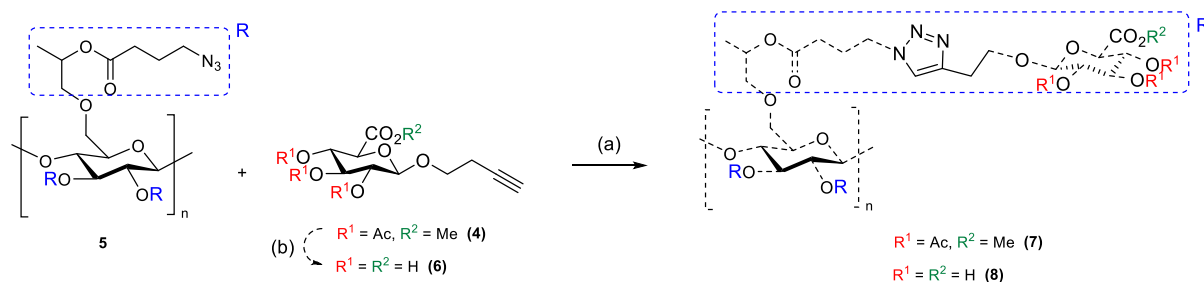
**Esquema 1.** Síntesis química GlucA-alkino. (a) NaOMe, MeOH; (b) Ac<sub>2</sub>O anhídrido, piridina; (c) Bencilamina, THF a t. a.; (d) DBU, Cl<sub>3</sub>CCN, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a t. a.; (e) 3-butinol, BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub>, TM 4Å.

La síntesis del HPC funcionalizado con un resto azida se realizó por reacción de cloruro de 4-azidobutanoilo y HPC comercial para obtener la el correspondiente éster de la HPC (**5**) con 68% de rendimiento, tal y como se muestra en el esquema 2.



**Esquema 2.** Síntesis química de HPC-N<sub>3</sub>. (a) cloruro de 4-azidobutanoilo a t.a.

Una vez sintetizados la hidroxipropil celulosa con un resto azida (**5**) y el glucurónido con un resto alquino (**4**), se produjo su unión mediante Click-Chemistry en presencia de CuSO<sub>4</sub> y ascorbato sódico en una mezcla de DMF/H<sub>2</sub>O para obtener el producto deseado (**7**) con un rendimiento del 65%. Esta reacción se produjo adicionalmente en microondas, aunque con un rendimiento menor (20%). La unión de la HPC (**5**) y el GlcA-alkino desprotegido (**6**) se llevó a cabo en condiciones análogas con y sin microondas, para obtener el compuesto **8** con un rendimiento del 76 y 53% respectivamente.



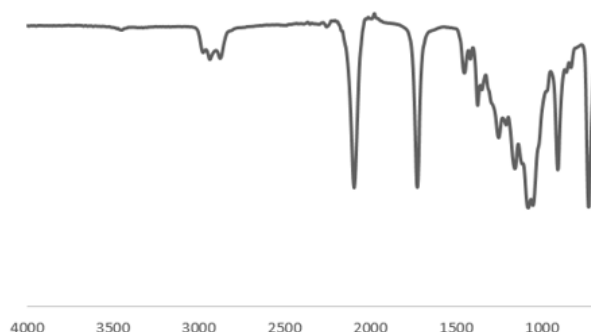
**Esquema 3.** Síntesis de HPC-GlcA por Click-Chemistry. (a) CuSO<sub>4</sub>, Ascorbato sódico, DMF/H<sub>2</sub>O. (b) i. NaOMe, ii. NaOH.

## DISCUSIÓN

Partiendo de la  $\gamma$ -lactona comercial y siguiendo la metodología descrita en la bibliografía [12], se obtuvo el imidato del ácido glucurónico (**3**) en cuatro pasos de reacción, el cual es el producto de partida para la síntesis del glicósido funcionalizado con un grupo alquino. Así, el GlcA-alquino (**4**) se preparó mediante O-glicosidación del imidato en presencia de 3-butin-1-ol comercial a través de un mecanismo SN2, conduciendo a una inversión completa de la configuración  $\alpha$  a la  $\beta$ , consiguiéndose un rendimiento moderado en el proceso.

La incorporación del grupo azida sobre el núcleo de hidroxipropil celulosa se abordó a través de un grupo éster, empleando una reacción de acilación con un cloruro de ácido. Así, se hizo reaccionar el HPC comercial con el cloruro de 4-azidobutanoilo previamente sintetizado a partir del correspondiente ácido.

Se pudo determinar mediante el empleo de espectroscopia FT-IR la completa sustitución de todos los restos OH presentes en cada unidad de glucosa que constituye la HPC, concluyendo que el grado de sustitución en la reacción de esterificación es 3. La existencia de una banda definida y fina en torno a  $1700\text{ cm}^{-1}$  junto con otra señal entorno a  $2.100\text{ cm}^{-1}$  permitió confirmar la formación de un enlace éster (vibración C=O) y la presencia de restos azida (vibración NNN) respectivamente en el compuesto **5**. Además, la ausencia de una banda a  $3.400\text{ cm}^{-1}$  característica de los grupos -OH confirmó que prácticamente la totalidad de los OH presentes en la hidroxipropil celulosa habían sido funcionalizados.



**Figura 2:** Espectro IR de HPC-N<sub>3</sub> (**5**).

Consecuencia de la completa sustitución de la HPC, la manipulación del derivado HPC-N<sub>3</sub> (**5**) fue considerablemente más sencilla respecto a su precursor, ya que en este último se establecen enlaces de hidrógeno entre cadenas al tener OH libres, lo que aumenta enormemente su estabilidad, dificultando el manejo y tratamiento del polímero.

La incorporación del derivado glucurónido (**4** y **6**) sobre la HPC se produjo mediante una reacción de cicloadición en presencia de Cu (I) en la que se genera un anillo de triazol con una regioselectividad 1,4 [12]. La reacción se llevó a cabo paralelamente entre la HPC-N<sub>3</sub> (**5**) y el alquino-GlcA protegido (**4**), y la HPC-N<sub>3</sub> (**5**) y el alquino-GlcA desprotegido (**6**) para obtener los correspondientes compuestos **7** y **8** con anillos de triazol uniendo las unidades de HPC y GlcA. El compuesto **8** tiene un especial interés por la presencia de los grupos OH y CO<sub>2</sub>H libres en el anillo

de azúcar, lo que permitiría una mejor interacción con la diana biológica mediante enlaces iónicos y puentes de hidrógeno.

### **CONCLUSIONES**

Se ha llevado a cabo de manera satisfactoria la síntesis de un glicopolímero empleando como core la HPC, uniéndola al GlcA a través de un anillo de triazol generado por Click-Chemistry. Esta síntesis es sencilla y eficaz y supone una posible alternativa de funcionalización para la obtención de glicoestructuras a partir de polímeros de origen natural como la celulosa.

No se han llevado a cabo ensayos de actividad biológica que midan el potencial terapéutico real de este glicopolímero con la estructura activa del GlcA, pero dadas las propiedades de la HPC y su alta biocompatibilidad con el organismo, es posible que este compuesto tenga posibles aplicaciones como antiviral o antibacteriano, o incluso para conformar andamios u otras estructuras útiles para terapia de regeneración de tejidos.

### **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Varki, A. (2017). Biological roles of glycans. *Glycobiology*, 27(1), 3–49.
2. Smith, B. A. H., & Bertozzi, C. R. (2021). The clinical impact of glycobiology: targeting selectins, Siglecs and mammalian glycans. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(3) 217–243. Nature Research.
3. Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Stanley, P., Hart, G. W., Aebi, M., Darvill, A. G., Kinoshita, T., Packer, N. H., Prestegard, J. H., Schnaar, R. L., & Seeberger, P.H. (2015). *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor (NY), 823.
4. Hoyos, P., Perona, A., Juanes, O., Rumbero, Á., & Hernáiz, M. J. (2021). Synthesis of Glycodendrimers with Antiviral and Antibacterial Activity. In *Chemistry A European Journal*, 27 (28) 7593–7624. John Wiley and Sons Inc.
5. Gallagher, J.T., Lyon, M. (2000). «Molecular structure of Heparan Sulfate and interactions with growth factors and morphogens». En Iozzo, M, V., ed. *Proteoglycans: structure, biology and molecular interactions*. Marcel Dekker Inc. New York, New York. pp. 27-59.
6. Bayón, N. ÉI, M. Deir-Kaspar, P. Blasco, S. Andre, H. J. Gabius, A. Rumbero, J. Jiménez-Barbero, W. D. Fessner, M. J. Hernaiz, Chem. (2017), Eur. J. 23, 1623-1633.
7. Lu W, Pieters RJ. (2019) Carbohydrate-protein interactions and multivalency: implications for the inhibition of influenza A virus infections. *Expert Opin Drug Discov*. Apr;14(4):387-395.
8. Billmeyer F. W. (2004). *Ciencia de los polímeros (Reimp)*, (pp 3-4, 447-456). Reverté.
9. Wagner, W. R., Sakiyama-Elbert, S., Zhang, G., & Yaszemski, M. J. (2020). The concept and assessment of biocompatibility. *Biomaterials Science - An Introduction to Materials in Medicine* (pp.843-849). In *Journal of Clinical Engineering*. Elsevier.
10. Alhazmi, H., Shah, S. A. R., Anwar, M. K., Raza, A., Ullah, M. K., & Iqbal, F. (2021). Utilization of polymer concrete composites for a circular economy: A comparative review for assessment of recycling and waste utilization. *Polymers*, 13(13).
11. Agrahari, A. K., Bose, P., Jaiswal, M. K., Rajkhowa, S., Singh, A. S., Hotha, S., Mishra, N., & Tiwari, V. K. (2021). Cu(I)-Catalyzed Click Chemistry in Glycoscience and Their Diverse Applications. In *Chemical Reviews*, 121(13) 7638–7956.
12. García-Oliva, C., et al. (2020). "Efficient Synthesis of Muramic and Glucuronic Acid Glycodendrimers as Dengue Virus Antagonists." *Chemistry—A European Journal* 26(7): 1588-1596.

**77086: MicroMundo™ y Crónicas Microbianas 2.0: innovación para divulgar la resistencia a los antibióticos****Área de conocimiento:** FARMACIA**Autor(es):** Paula Ruiz Muñoz, Isabel Sanz Riomoros, Gonzalo Torresano Lominchar, Alba Pérez García**Tutor(es):** Carmina Rodríguez Fernández, Guillermo Rodríguez González**Universidad:** Universidad Complutense de Madrid**Facultad:** Facultad de Farmacia**Titulación:** Grado en Farmacia**Formato:** Comunicación Oral - Investigación básica**Palabras Clave:** MicroMundo, calendario, antibióticos, multirresistencias, divulgación.**Resumen:**

En el marco de las actividades del proyecto de Aprendizaje-Servicio MicroMundo™, nuestro grupo ha diseñado un "calendario científico" como recurso alternativo e innovador con el fin de acercar la cultura científica y el problema de las resistencias a los antibióticos, a la sociedad en general. La iniciativa MicroMundo™, es un proyecto de concienciación ciudadana sobre las multirresistencias y el problema socio-sanitario que representan, con la perspectiva OneHealth de salud global. En nuestro país se implantó como proyecto ApS y su innovación radica en la integración de dos niveles educativos, superior y bachillerato. Implica a estudiantes de secundaria que así trabajan en un laboratorio de Microbiología analizando la posible actividad antibiótica frente a bacterias multirresistentes, a partir de muestras de suelo recogidas por ellos mismos; y concienciándoles del uso racional de los antibióticos.

En colaboración con los alumnos del IES Renacimiento (Madrid), además del aislamiento de bacterias con antibiosis, nuestro grupo ha reelaborado un novedoso calendario que permite relacionar eventos singulares de la historia de la Microbiología con las actividades de MicroMundo. De esta forma se pretende acercar el mundo de los microorganismos al público mediante un formato a la vez didáctico y atractivo.

En cada mes del calendario aparecen hechos destacables datados en ese mes, relacionados con la Microbiología y MicroMundo. Se incluyen códigos BIDI para acceder a una información más amplia sobre cada evento, así como a los microorganismos ESKAPE, las resistencias antimicrobianas, nuevos antibióticos, novedades en vacunación, hitos en la historia de la Microbiología y actividades de diversas organizaciones internacionales y nacionales de la salud (como el PRAN).

El calendario está disponible en fichero descargable desde la red y puede ser impreso, facilitando la mayor accesibilidad y visibilidad del proyecto.

**Abstract:**

Within the framework of the MicroMundo™ Service-Learning project, our group has designed a "scientific calendar" as an alternative and innovative resource in order to bring scientific culture and the problem of antibiotic resistance to the society in general. The MicroMundo™ initiative is a project to raise public awareness about multiresistances and the socio-sanitary problem they represent, with the One Health global perspective. In Spain it was implemented as an ApS project and its innovation lies in the integration of two educational fields, higher education and high school. It involves high school students who thus work in a Microbiology laboratory analyzing a possible antibiotic activity against multi-resistant bacteria, from soil samples collected by themselves; and making them aware of the rational use of antibiotics.

In collaboration with the students of the IES Renacimiento (Madrid), in addition to carrying out the isolation of bacteria with antibiosis, our group has re-elaborated an innovative calendar that allows to relate unique events in the history of Microbiology with the MicroWorld activities. In this way, the aim is to bring the world of microorganisms closer to the public through a format that is both didactic and attractive.

In each month of the calendar there are notable events dated in that month, related to Microbiology and the MicroWorld. BIDI codes are included to access to more extensive information on each event, as well as ESKAPE microorganisms, antimicrobial resistance, new antibiotics, newness in vaccination, some milestones in the history of Microbiology and the activities of various international and national health organizations (such as the PRAN).

The calendar is available as a downloadable file from the web and can be printed, facilitating greater accessibility and visibility of the project.

## **MicroMundo™ y Crónicas Microbianas 2.0: innovación para divulgar la resistencia a los antibióticos**

### **MicroMundo™ and Microbial Chronicles 2.0: innovation to communicate antibiotic resistance**

Paula Ruiz Muñoz, Alba Pérez García, Isabel Sanz Riomoros, Gonzalo Torresano Lominchar  
([pruiz09@ucm.es](mailto:pruiz09@ucm.es))

*Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. España*

Tutores: Carmina Rodríguez y Guillermo Rodríguez González

[carmina@ucm.es](mailto:carmina@ucm.es); [grodri06@ucm.es](mailto:grodri06@ucm.es)

*Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia. UCM*

#### **Resumen:**

En el marco de las actividades del proyecto de Aprendizaje-Servicio MicroMundo™, nuestro grupo ha diseñado un "calendario científico" como recurso alternativo e innovador con el fin de acercar la cultura científica y el problema de las resistencias a los antibióticos, a la sociedad en general. La iniciativa MicroMundo™, es un proyecto de concienciación ciudadana sobre las multirresistencias y el problema socio-sanitario que representan, con la perspectiva *OneHealth* de salud global. En nuestro país se implantó como proyecto ApS y su innovación radica en la integración de dos niveles educativos, superior y bachillerato. Implica a estudiantes de secundaria que así trabajan en un laboratorio de Microbiología analizando la posible actividad antibiótica frente a bacterias multirresistentes, a partir de muestras de suelo recogidas por ellos mismos; y concienciándoles del uso racional de los antibióticos.

En colaboración con los alumnos del IES Renacimiento (Madrid), además del aislamiento de bacterias con antibiosis, nuestro grupo ha reelaborado un novedoso calendario que permite relacionar eventos singulares de la historia de la Microbiología con las actividades de MicroMundo. De esta forma se pretende acercar el mundo de los microorganismos al público mediante un formato a la vez didáctico y atractivo.

En cada mes del calendario aparecen hechos destacables datados en ese mes, relacionados con la Microbiología y MicroMundo. Se incluyen códigos BIDI para acceder a una información más amplia sobre cada evento, así como a los microorganismos ESKAPE, las resistencias antimicrobianas, nuevos antibióticos, novedades en vacunación, hitos en la historia de la Microbiología y actividades de diversas organizaciones internacionales y nacionales de la salud (como el PRAN).

El calendario está disponible en fichero descargable desde la red y puede ser impreso, facilitando la mayor accesibilidad y visibilidad del proyecto.

**Palabras clave:** MicroMundo, calendario, antibióticos, multirresistencias, divulgación.

#### **Abstract:**

Within the framework of the MicroMundo™ Service-Learning project, our group has designed a "scientific calendar" as an alternative and innovative resource in order to bring scientific culture and the problem of antibiotic resistance to the society in general. The MicroMundo™ initiative is a project to raise public awareness about multiresistances and the socio-sanitary problem they represent, with the *One Health* global perspective. In Spain it was implemented as an ApS project and its innovation lies in the integration of two educational fields, higher education and high school. It involves high school students who thus work in a Microbiology laboratory analyzing a possible antibiotic activity

against multi-resistant bacteria, from soil samples collected by themselves; and making them aware of the rational use of antibiotics.

In collaboration with the students of the IES Renacimiento (Madrid), in addition to carrying out the isolation of bacteria with antibiotics, our group has re-elaborated an innovative calendar that allows to relate unique events in the history of Microbiology with the MicroWorld activities. In this way, the aim is to bring the world of microorganisms closer to the public through a format that is both didactic and attractive.

In each month of the calendar there are notable events dated in that month, related to Microbiology and the MicroWorld. BIDI codes are included to access to more extensive information on each event, as well as ESKAPE microorganisms, antimicrobial resistance, new antibiotics, newness in vaccination, some milestones in the history of Microbiology and the activities of various international and national health organizations (such as the PRAN).

The calendar is available as a downloadable file from the web and can be printed, facilitating greater accessibility and visibility of the project.

**Key words:** MicroMundo, calendar, antibiotics, multiresistances, scientific diffusion

### Introducción

Las bacterias multirresistentes a los antibióticos son el paradigma de la *adaptabilidad* al excesivo uso de antibióticos; y el acuciante problema socio-sanitario que representa el fracaso terapéutico a nivel mundial. Las bacterias hacen, así, realidad la cita atribuida al naturalista Charles R. Darwin (1809-1882): «*no es la especie más fuerte la que sobrevive, ni la más inteligente, sino la que mejor se adapta a los cambios*».

El economista Leon C. Megginson (1921- 2010), propuso que nuestra sociedad requiere para subsistir una evolución que implique «*amarnos a nosotros mismos, a los demás y a nuestro planeta*», para «*mejorar la sanidad mundial para evitar miles de muertes por fracasos terapéuticos y ahorrar miles de millones de dólares en los sistemas sanitarios globales*», fondos que podrían ser destinados a otros fines médicos.

Esta evolución coincide con el concepto *One Health*, acuñado en 1964 por el veterinario Calvin Schwabe. *One Health* busca aumentar la colaboración interdisciplinar para la salud de las personas, los animales y el medio ambiente, e implementar programas y políticas en pro de la salud pública.

El proyecto *MicroMundo*<sup>TM</sup> ([www.ucm.es/small-world-initiative/](http://www.ucm.es/small-world-initiative/)) (antes *SWI@Spain*), es la adaptación a Aprendizaje-Servicio (ApS) de la estrategia de *crowdsourcing* y ciencia ciudadana internacional *Tiny Earth* ([www.tinyearthnet.org/](http://www.tinyearthnet.org/)). Esta iniciativa fue introducida y desarrollada en España por Víctor Jiménez Cid (2016) y tiene como objetivos: concienciar sobre el problema que las bacterias multirresistentes a antibióticos representa para la salud, aislar bacterias productoras de nuevos antibióticos y despertar vocaciones científicas en los preuniversitarios (Jiménez, 2016; Pernaute y Cid, 2017; Valderrama *et al.*, 2018).

La innovación de *MicroMundo*<sup>TM</sup>/UCM, que la diferencia de *Tiny Earth*/USA, consiste en integrar dos niveles educativos: superior y bachillerato. Implica a estudiantes y profesores de centros de Educación Secundaria, y a profesores y estudiantes universitarios de los ámbitos de Sanidad Humana, Animal y Medioambiental de manera transversal e interfacultativa.

En colaboración con los alumnos del IES Renacimiento (Madrid), nuestro grupo ha rediseñado un innovador calendario (Crónicas Microbianas 2.0) como recurso alternativo de comunicación y divulgación científica.

### Objetivos del calendario *Crónicas microbianas 2.0*:

1. Revisar y actualizar los avances relacionados con las multirresistencias y las vacunas.
2. Elaborar un calendario atractivo y didáctico que facilite el acceso a dichos conocimientos.
3. Facilitar el acceso a quien desee profundizar en la información mediante códigos BIDI y URL's.
4. Motivar la curiosidad del lector y estimular la búsqueda de conocimientos sobre la Ciencia.
5. Diseñar un calendario de acceso "on line", descargable e imprimible, en formatos de pared y sobremesa.

### Materiales y métodos

- La búsqueda de información se realizó en:
- Organismos oficiales: OMS (Organización Mundial de la Salud), CDC (Centros para el Control y Prevención de Enfermedades Infecciosas), ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), PRAN (Plan Nacional Resistencia a Antibióticos), Ministerio de Sanidad.
- Bases bibliográficas: PubMed (Med Line (<https://www.nlm.nih.gov/bsd/pmresources.html/>); Med Line (<https://www.nlm.nih.gov/bsd/pmresources.html/>); Cisne (Cisne (<https://biblioteca.ucm.es/cisne>); Web of Science (<https://www.recursoscientificos.fecyt.es/>); Elsevier ([www.elsevier.com](http://www.elsevier.com)); Bucea (<https://biblioteca.ucm.es/>); Google Académico (<https://scholar.google.es>); Science Direct ([www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)); además de libros.
- La herramienta de diseño utilizada ha sido Canva.
- La nomenclatura de siglas y abreviaturas científicas (DNA, RNA) se hizo según los criterios del Vocabulario Científico y Técnico (VCTRAC), de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (RACEFN, 1996) y las recomendaciones de la *International Union of Pure and Applied Chemistry IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature* (1970).

### Resultados y Discusión

Nuestro grupo de MicroMundo ha trabajado con el I.E.S. Renacimiento (Madrid). En este curso 2022-23 (Figura 1) se han analizado 22 muestras de tierra de las que se han aislado **8 cepas** con actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas multirresistentes (ESKAPE).

Los microorganismos multirresistentes son un grave problema de salud pública ya que crean mecanismos para contrarrestar la acción de los antibióticos. Entre éstos, destaca el grupo denominado ESKAPE, acrónimo para las siguientes bacterias: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp.



Figura 1. Grupo de trabajo y alumnos del IES Renacimiento (Madrid, 2023).



## Crónicas microbianas 2.0

Además de las actividades propias de MicroMundo™, este año nuestro grupo ha reeditado y actualizado un calendario “científico” como actividad educativa y divulgativa complementaria. Se trata de un recurso alternativo e innovador diseñado para acercar la cultura científica y el problema de las resistencias a los antibióticos, a los estudiantes y a la sociedad de forma amena. Si bien ya habíamos iniciado este proyecto divulgativo en colaboración con el IES Renacimiento en una edición anterior de nuestro grupo en el marco de MicroMundo™, en esta edición *Crónicas microbianas 2.0*, no sólo se ha actualizado la información y la infografía, sino que se ha añadido nueva información y capítulos; como son los meses de noviembre (vacunas) y diciembre (juegos educativos microbiológicos).

*Crónicas microbianas 2.0* es un proyecto interactivo que facilita el acceso rápido, dinámico e interactivo (códigos BIDI y URL's) al proyecto MicroMundo™, sus actividades, las resistencias microbianas a los antibióticos y su problema socio sanitario en la perspectiva *OneHealth* y otros aspectos actuales de la Microbiología.

El calendario consta de dos páginas por mes: en una se incluyen las fechas importantes del mes, distintos hitos conmemorados en dichas fechas o la información correspondiente a la temática de dicho mes.

En la página siguiente, el calendario propiamente dicho, se han incluido los códigos QR para facilitar el acceso a la totalidad de la información incluida en la fecha. Se intenta, así, motivar la curiosidad científica del lector, y estimular la búsqueda y la profundización en la actualidad microbiológica.

Cada mes está destinado a un aspecto particular relacionado con MicroMundo™, las resistencias a los antibióticos, la prevención de enfermedades o a organismos nacionales dedicados a la salud. Así, por ejemplo, *febrero* se ha dedicado al PRAN (Plan de Resistencia Nacional a Antibióticos). El PRAN es un plan estratégico y de acción para reducir el riesgo de selección y diseminación de resistencia a los antibióticos; y minimizar su impacto. De esta forma, conserva de manera sostenible la eficacia de los antibióticos que ya existen.

Asimismo, en cada mes se ha incluido una *frase célebre* de científicos para rendir homenaje a las personalidades que nos precedieron y acercarlas a nuestros jóvenes.

Los meses de marzo a septiembre han sido dedicados a las bacterias ESKAPE.

La distribución de los contenidos por meses es la siguiente (Figura 2):

- Enero: el proyecto MicroMundo™.
- Febrero: el Plan Nacional de Resistencia a Antibióticos” (PRAN) y sus actividades.
- Marzo: *Mycobacterium tuberculosis*.
- Abril: *Enterococcus faecium*, bacteria ESKAPE Gram +.
- Mayo: *Staphylococcus aureus*, bacteria ESKAPE Gram +.
- Junio: *Klebsiella pneumoniae*, bacteria ESKAPE Gram -.
- Julio: *Acinetobacter baumannii*, bacteria ESKAPE Gram -.
- Agosto: *Pseudomonas aeruginosa*, bacteria ESKAPE Gram -.
- Septiembre: *Enterobacter aerogenes*, bacteria ESKAPE Gram -.
- Octubre: Historia de la Microbiología.
- Noviembre: Vacunación y calendario de vacunación de la Comunidad de Madrid.
- Diciembre: Juegos relacionados con la Microbiología.

Su diseño permite introducir fácilmente las actualidades que se van produciendo cada año, para poder disfrutar de los descubrimientos y de la actualidad científica en un calendario anual de uso diario.

El calendario está disponible en fichero descargable desde la red y puede ser impreso, facilitando la mayor accesibilidad y visibilidad del proyecto.



Figura 2. Ejemplos de algunos meses del calendario Crónicas Microbianas 2.0.

### Conclusiones

- Se han aislado nuevas bacterias productoras de antibióticos a partir de muestras de suelo tomadas por los propios alumnos.
- Los estudiantes universitarios han transmitido su vocación por las carreras del ámbito biosanitario. Algunos alumnos del I.E.S. manifestaron su deseo de cursar dichos estudios.
- Los alumnos han aprendido a trabajar en un laboratorio de Microbiología y han adquirido conocimientos sobre bioseguridad.
- Para el grupo de MicroMundo universitario, ha sido una ocasión desarrollar aptitudes de enseñanza y expresión en público.
- El calendario es una forma amena e innovadora de acercar la ciencia a las nuevas generaciones y despertar curiosidad sobre temas de interés relacionados con la Microbiología.

### Bibliografía

IUPAC-IUB (1970). Commission on Biochemical Nomenclature. Abbreviations and symbols for the description of the conformation of polypeptide chains. *Biochemistry*. 9(18): 3471-3479.

Jiménez, V. (2016). Educando en el descubrimiento: La resistencia a antibióticos como desafío de salud global en el s. XXI. *SEM@FORO*, 62, 25-26.

Jiménez-Cid, V. (s.f.). Small World Initiative@UCM. Proyecto MicroMundo. Recuperado de <https://www.ucm.es/small-world-initiative/proyecto> [18 marzo 2023]

Pernaute Lau, L. y Jiménez Cid, V. (2017). Small World Initiative. Educando para combatir la resistencia a los antibióticos. *Pharmatech* 32, 58-64

OMS (2016). Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos. ISBN 978 92 4 350976 1

O'Neill, J. (2014). Review on Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. *Review on Antimicrobial Resistance*. Londres.

RANF-CEFN (1996). Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Vocabulario científico y técnico. 3. ed. Madrid: Espasa Calpe.

Valderrama, MJ. et al. (2018). Educating in antimicrobial resistance awareness: adaptation of the Small World Initiative program to service learning. *FEMS Microbiol Lett.* 365 vol fny161. doi: 10.1093/femsle/fny161

**77096: Niveles séricos de IgA frente a Anisakis simplex en donantes de la Comunidad de Madrid****Área de conocimiento:** FARMACIA**Autor(es):** María Piedad de la Hoz Martín**Tutor(es):** JUAN GONZALEZ FERNANDEZ**Universidad:** UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**Facultad:** FACULTAD DE FARMACIA**Titulación:** Grado en Farmacia**Formato:** Comunicación Oral - Investigación básica**Palabras Clave:** Anisakis, antígenos, IgA, donantes, pescado.**Resumen:**

La anisakiosis es una parasitosis producida por larvas vivas de *Anisakis simplex*. Sin embargo, este parásito se alberga en el intestino, donde es característica la secreción de IgA por la mucosa. El contacto entre los antígenos de *Anisakis* y los linfocitos B, y su posterior activación y respuesta, se produce en el propio intestino. Con el objetivo de determinar los niveles de IgA, que es la inmunoglobulina mayoritaria en las secreciones intestinales, se analizaron 414 sueros de donantes de sangre de la Comunidad de Madrid para determinar los niveles séricos de IgA anti-*Anisakis* mediante la técnica de ELISA indirecto. Estos datos se analizaron en función del sexo, la edad y el consumo de pescado cocinado y crudo, información que se recopiló directamente de los donantes. Se obtuvo una mayor concentración de IgA anti-*Anisakis* en hombres que en mujeres. Se observó una relación importante entre la edad y los niveles séricos de IgA anti-*Anisakis*, siendo esta mayor a mayor edad del donante. El patrón en cuanto a la cantidad de pescado consumido fue similar en todas las edades. También se ha observado que los niveles séricos de IgA anti-*Anisakis* no están vinculados a la cantidad de pescado que se consume. Aunque sí se ha visto que influye el comer el pescado crudo o cocinado, tendiendo a tener niveles más elevados de IgA anti-*Anisakis* aquellas personas que comen más pescado crudo.

**Abstract:**

Anisakiosis is a parasitosis produced by live larvae of *Anisakis simplex*. However, this parasite harbors in the intestine, where mucosal secretion of IgA is characteristic. The contact between the *Anisakis* antigens and the B lymphocytes, and their subsequent activation and response, occurs in the intestine. In order to determine the levels of IgA, which is the major immunoglobulin in intestinal secretions, 414 sera from blood donors from the Community of Madrid were analyzed to determine the serum levels of anti-*Anisakis* IgA using the indirect ELISA technique. These data were analyzed based on gender, age, and consumption of cooked and raw fish, information that was collected directly from the donors. A higher concentration of anti-*Anisakis* IgA was obtained in men than in women. A significant relationship was observed between age and anti-*Anisakis* IgA serum levels, this being greater the older the donor was. The pattern in terms of the amount of fish consumed was similar at all ages. It has also been observed that serum anti-*Anisakis* IgA levels are not linked to the amount of fish consumed. Although it has been seen that eating raw or cooked fish has an influence, those people who eat more raw fish tend to have higher levels of anti-*Anisakis* IgA.

## Niveles séricos de IgA frente a *Anisakis simplex* en donantes de la Comunidad de Madrid

Primer autor. 1463419, María Piedad de la Hoz Martín, [mdelahoz@ucm.es](mailto:mdelahoz@ucm.es)

Tutor. Juan González-Fernández, [juangonzalez@ucm.es](mailto:juangonzalez@ucm.es)

Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.

Resumen:

La anisakiosis es una parasitosis producida por larvas vivas de *Anisakis simplex*. Sin embargo, este parásito se alberga en el intestino, donde es característica la secreción de IgA por la mucosa. El contacto entre los antígenos de *Anisakis* y los linfocitos B, y su posterior activación y respuesta, se produce en el propio intestino. Con el objetivo de determinar los niveles de IgA, que es la inmunoglobulina mayoritaria en las secreciones intestinales, se analizaron 414 sueros de donantes de sangre de la Comunidad de Madrid para determinar los niveles séricos de IgA anti-*Anisakis* mediante la técnica de ELISA indirecto. Estos datos se analizaron en función del sexo, la edad y el consumo de pescado cocinado y crudo, información que se recopiló directamente de los donantes. Se obtuvo una mayor concentración de IgA anti-*Anisakis* en hombres que en mujeres. Se observó una relación importante entre la edad y los niveles séricos de IgA anti-*Anisakis*, siendo esta mayor a mayor edad del donante. El patrón en cuanto a la cantidad de pescado consumido fue similar en todas las edades. También se ha observado que los niveles séricos de IgA anti-*Anisakis* no están vinculados a la cantidad de pescado que se consume. Aunque sí se ha visto que influye el comer el pescado crudo o cocinado, tendiendo a tener niveles más elevados de IgA anti-*Anisakis* aquellas personas que comen más pescado crudo.

Palabras clave: *Anisakis*, antígenos, IgA, donantes, pescado.

Abstract:

Anisakiosis is a parasitosis produced by live larvae of *Anisakis simplex*. However, this parasite harbors in the intestine, where mucosal secretion of IgA is characteristic. The contact between the *Anisakis* antigens and the B lymphocytes, and their subsequent activation and response, occurs in the intestine. In order to determine the levels of IgA, which is the major immunoglobulin in intestinal secretions, 414 sera from blood donors from the Community of Madrid were analyzed to determine the serum levels of anti-*Anisakis* IgA using the indirect ELISA technique. These data were analyzed based on gender, age, and consumption of cooked and raw fish, information that was collected directly from the donors. A higher concentration of anti-*Anisakis* IgA was obtained in men than in women. A significant relationship was observed between age and anti-*Anisakis* IgA serum levels, this being greater the older the donor was. The pattern in terms of the amount of fish consumed was similar at all ages. It has also been observed that serum anti-*Anisakis* IgA levels are not linked to the amount of fish consumed. Although it has been seen that eating raw or cooked fish has an influence, those people who eat more raw fish tend to have higher levels of anti-*Anisakis* IgA.

Keywords: *Anisakis*, antigens, IgA, donors, fish.

## 1. INTRODUCCIÓN

*Anisakis simplex* es un nematodo parásito de la familia *Anisakidae*. Los hospedadores definitivos de este parásito son los mamíferos marinos, siendo los seres humanos son hospedadores accidentales que se infectan mediante la ingesta de larvas vivas de tercer estadio (L3) presentes en pescado crudo o poco cocinado. (Nieuwenhuizen and Lopata, 2013).

La anisakioasis es la enfermedad causada por las L3 de *Anisakis* cuando atraviesan nuestra mucosa gastrointestinal. Los pacientes sensibilizados no reaccionan frente a las larvas muertas, ni frente a las proteínas del parásito (antígeno total larvario ni antígenos de excreción secreción) (Daschner et al., 2012). Existen diferentes fenotipos de la enfermedad: anisakiosis gástrica (inflamación localizada de tipo alérgica aguda en la mucosa gástrica o intestinal), gastroalérgica (síntomas digestivos y alérgicos generalizados desde urticaria hasta shock anafiláctico) y urticaria crónica asociada a sensibilización por *Anisakis*. La forma de evitar esta parasitosis es matando las larvas mediante la congelación del pescado un mínimo de 24 horas o cocinándolo a más de 60°C durante, al menos, un minuto (Real Decreto 1420/2006).

En Japón se notifican la mayoría de los casos, aunque también es común encontrar *Anisakis* de manera endémica o con una alta seroprevalencia en algunas zonas mediterráneas como Italia, España, Marruecos y Croacia debido al consumo de pescado marinado o crudo en la cultura mediterránea. Concretamente en Madrid hay más riesgo de contraer anisakiosis debido a la alta tasa de consumo de pescado crudo. Esta prevalencia es mayor que la que se produce en comunidades autónomas costeras como Galicia debido a que allí no se consume tanto pescado crudo (Puente et al., 2008).

En este estudio hemos analizado, por primera vez, en donantes sanos los niveles séricos de IgA específicas frente a *Anisakis simplex* para conocer el grado de inmunización que se produce a través de la mucosa digestiva. El contacto entre las proteínas del parásito y los linfocitos encargados de la respuesta inmune específica o humoral se produce en el propio tubo digestivo, al igual que la activación y diferenciación de los linfocitos productores de IgA, junto con su posterior secreción.

Los linfocitos B productores de IgA (células plasmáticas) tienen un patrón selectivo de alojamiento intestinal ya que durante su activación en el GALT (gut-associated lymphoid tissue) y en los ganglios linfáticos mesentéricos, se producen cambios en las moléculas de adhesión y en los receptores para quimiocinas. Estas células plasmáticas no están concentradas en los ganglios linfáticos mesentéricos, sino que están dispersas por toda la lámina propia del tubo digestivo. Los linfocitos B secretores pueden pasar a circulación sistémica y si fuese necesario, recircular de nuevo a la lámina propia para ejercer una respuesta rápida (Abul K Abbas et al., 2022).

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

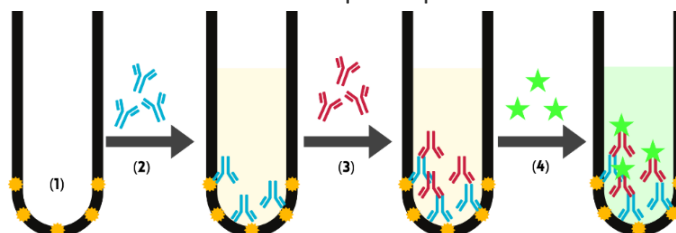
Obtuvimos del banco de sangre del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz (HUFJD) un total de 414 sueros de donantes (estudio PIC142-21-FJD aprobado por el Comité de Ética del HUFJD) de entre 18 y 65 años (desde 1956, ya que las muestras se empezaron a tomar en enero de 2022). Las muestras se obtuvieron a través de la misma vía de la donación en dos tubos estériles de tapón amarillo.

Todos los donantes firmaron un consentimiento informado. Recogimos información sobre su edad, sexo y patrón de consumo de pescado cocinado semanal y crudo anual, así, como si habían sufrido alguna vez algún problema digestivo o alérgico debido al consumo de pescado.

La sangre se obtuvo a través de la misma vía de la donación en dos tubos estériles de extracción con vacío (con activador de la coagulación-tapón amarillo BD Vacutainer® Ref. 367953 de 8,5 ml para obtener suero), una sola vez. Los tubos de tapón amarillo se invirtieron 180°, 5 o 6 veces y se dejaron reposar 60 minutos para la coagulación de la sangre. Luego, se procedió a su centrifugación a 800 g durante 10 minutos entre 18-25°C para recoger el suero en tubos codificados con 500 µl/tubo y congelarlos a -80°C.

La técnica de ELISA indirecto se empleó para la determinación de inmunoglobulinas en suero. Se tapizaron placas de 96 pocillos (Costar, Corning, NY) con 100 µl/pocillo de antígeno total de *Anisakis* a una concentración de 10 µg/ml en tampón bicarbonato/carbonato 0,1M (pH 9,6). Tras la sensibilización de los pocillos durante una noche a 4°C, se realizaron tres lavados con Tween 20 al 0,05% en PBS (PBS-Tween) y se realizó el postapizado con 200 µl/pocillo de BSA al 0,1% durante 1 h a 37°C. Tras realizar de nuevo tres lavados con PBS-Tween se añadieron por duplicado 100 µl/pocillo de los sueros humanos diluidos 1:100 en PBS-Tween con BSA al 0,1% (PTB). A continuación, se incubaron durante 2 h a 37°C o una noche a 4°C. Luego se realizó el paso de lavado y se añadieron 100 µl/pocillo de anti-IgA humana obtenida en cabra (*Horse Radish Peroxidase*) HRP (Biosource) diluida 1:3000 en PTB. Incubación durante 1 h a 37°C.

Para el revelado se incubó con o-fenilenodiamina (OPD) (Sigma-Aldrich) al 0,04% disuelta en tampón citrato-fosfato (Citrato monosódico 0,1 M, Fosfato disódico dodecahidratado 0,1 M, pH 5) con peróxido de hidrógeno al 0,04%. La reacción, tras 20 minutos en oscuridad a temperatura ambiente, se frenó con 50 µl/pocillo de ácido sulfúrico 3N. Las densidades ópticas (D.O.) a 490 nm se calcularon restando a los valores de D.O. de cada suero la D.O. resultante de la fijación inespecífica a la BSA utilizada en el postapizado. Todas las determinaciones para cada suero se realizaron por duplicado.



**Imagen 1.** (1) Antígeno de *Anisakis simplex* fijado al pocillo. (2) Adición del suero del donante con IgA específicas y unión al antígeno. (3) Adición del antisuero con anticuerpos anti-IgA humana conjugados con peroxidasa de rábano (HRP). (4) Adición del sustrato de la enzima conjugada produciendo una reacción colorimétrica.

Tras obtener los resultados de las absorbancias de los sueros los tratamos con el programa IBM SPSS Statistics v27. Los datos se agruparon según los siguientes criterios:

- Edad: por año de nacimiento 1956-66, 1967-75, 1976-85, 1986-95 y 1996-05.
- Consumo semanal de pescado: nada de consumo (0 veces/semana), consumo ocasional (1-2 veces/semana), habitual (3-4 veces/semana) y alto (>5 veces/semana).
- Consumo anual de pescado crudo: nada de consumo (0 veces/año), consumo ocasional (1-6 veces/año), habitual (7-12 veces/año), frecuente (13-24 veces/año) y alto (>25 veces/año).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se analizó la normalidad de los datos con el test de Kolmogorov-Smirnov. La población presentó una distribución no normal ( $p < 0,001$ ). Los sucesivos análisis de comparación se realizaron empleando el test U de Mann-Whitney. Se consideró una significación estadística  $p < 0,050$  bilateral.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la concentración sérica de IgA anti-*Anisakis* entre hombres y mujeres, siendo mayor en hombres que en mujeres.

	N	ABS m	1956-66	1967-75	1976-85	1986-95	1996-2005
1956-66	79	0,47962					
1967-75	85	0,37588	0,005				
1976-85	84	0,42477	0,188	0,103			
1986-95	83	0,32036	<0,001	0,084	0,001		
1996-05	83	0,33625	<0,001	0,177	0,003	0,657	

**Tabla 1.** Distribución de la muestra por grupos de edad; tamaño de los grupos; ABS m; resultados del test U de Mann-Whitney.

Entre los grupos de edad se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos más jóvenes y los de mayor edad (tabla 1). Se observó una tendencia en la que a mayor edad se incrementaron los niveles de IgA anti-*Anisakis*. Al analizar cada grupo de edad en función del consumo semanal de pescado y del consumo anual de pescado crudo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de IgA anti-*Anisakis*.

	N	ABS m	Nada	Ocasional	Habitual	Alto
Nada	25	0,30900				
Ocasional	226	0,39620	0,313			
Habitual	134	0,37652	0,375	0,775		
Alto	29	0,42414	0,256	0,534	0,503	

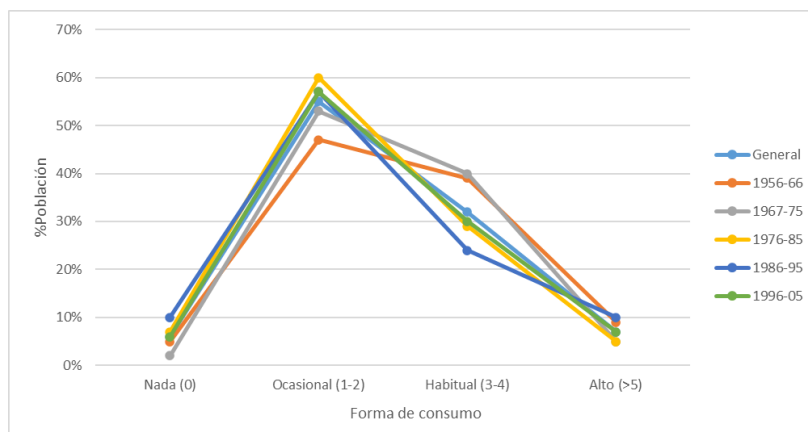
**Tabla 2.** Distribución de la muestra según el consumo semanal de pescado; tamaño de los grupos; ABS m; resultados del test de U Mann-Whitney.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas comparando los grupos en función del consumo semanal de pescado (Tabla 2). Sin embargo, al analizar cada uno de estos en función de los grupos edad, sí se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la concentración sérica de IgA anti-*Anisakis* entre grupos de diferente edad, sobre todo en consumo semanal ocasional y habitual de pescado. También se observó una clara tendencia en la que a mayor consumo de pescado, mayor era la concentración de IgA anti-*Anisakis*.

	N	ABS media	Nada	Ocasional	Habitual	Frecuente	Alto
Nada	118	0,35447					
Ocasional	116	0,40325	0,091				
Habitual	73	0,43003	0,039	0,634			
Frecuente	45	0,33562	0,804	0,120	0,050		
Alto	62	0,40194	0,028	0,581	0,993	0,032	

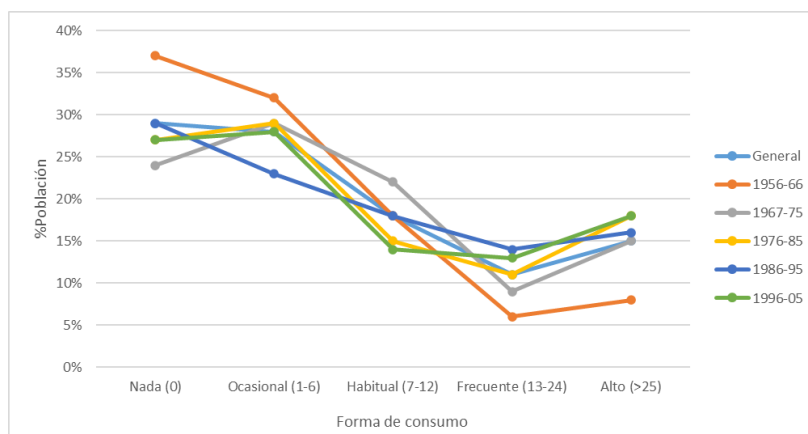
**Tabla 3.** Distribución de la muestra según el consumo anual de pescado crudo; tamaño de los grupos; ABS m; resultados del test de U de Mann-Whitney.

Al analizar el consumo anual de pescado crudo, sí se observaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración sérica de IgA anti-*Anisakis* entre las diferentes formas de consumo (Tabla 3). En este caso, al analizar individualmente cada uno de estos grupos en función del grupo de edad, sí se observaron diferencias estadísticamente significativas en todos los patrones de consumo, destacando entre los grupos más jóvenes y los de mayor edad.



**Tabla 4.** Representación del porcentaje de población general y por grupos de edad en función de las diferentes formas de consumo semanal de pescado.

Se observó un patrón similar de consumo de pescado en todos los grupos de edad aunque existen diferencias en el porcentaje de hasta el 15% entre grupos, tendiendo las personas de más edad a consumir más pescado.



**Tabla 5.** Representación del porcentaje de población general y por grupos de edad en función de las diferentes formas de consumo anual de pescado crudo.

En cuanto al consumo de pescado crudo, de la misma manera, en todas las edades se sigue un mismo patrón, observándose en este caso, diferencias de hasta el 10% entre grupos, siendo las personas de mayor edad las que menos pescado crudo consumen.

En otros estudios se ha observado una mayor sensibilización al parásito en hombres que en mujeres en personas que no habían experimentado síntomas alérgicos al *Anisakis* (Marcos et al., 2001). Un informe realizado por el gobierno de España refleja que la Comunidad de Madrid tiene un consumo de pescado mayor a la media nacional y también que a mayor edad se tiende a consumir más pescado (Martin Cerdeño, 2011).

Se ha visto en algunos estudios que el consumo de pescado crudo se asocia con una respuesta inmune específica al parásito, que la larva tiene que estar viva para desencadenar la parasitosis y que esta está más relacionada con la forma de consumir el pescado que con la frecuencia (Puente Águeda, 2011).



#### 4. CONCLUSIONES

Las diferencias en los niveles de IgA específica frente a *Anisakis* no están relacionadas con el mayor o menor consumo de pescado cocinado, ya que no hay diferencias estadísticamente significativas en los niveles de IgA anti-*Anisakis* en personas de la misma edad independientemente del patrón de consumo que tengan.

Sin embargo, si analizamos un mismo patrón de consumo entre personas de diferentes edades, sí encontramos diferencias estadísticamente significativas en los niveles de IgA sérica anti-*Anisakis*. Las personas de mayor edad han adquirido una mayor inmunidad frente a las proteínas de *Anisakis*. Esto puede reflejar un mayor contacto con el parásito a lo largo del tiempo, ya que si bien la legislación actual obliga a congelar el pescado para forzar la muerte del parásito, los restos del parásito muerto en el pescado también pueden desencadenar una respuesta inmune.

Las personas que consumen más pescado crudo tienen mayores concentraciones séricas de IgA anti-*Anisakis* que las que menos lo consumen. Esto refleja la conveniencia de seguir las indicaciones sanitarias, dado que desaconsejan el consumo de pescado crudo para prevenir este tipo de parasitosis.

Estas diferencias se refuerzan al haber una distribución homogénea del consumo de pescado (ya sea crudo o no) en todos los grupos de edad. Es decir, que la proporción de personas con diferentes patrones de consumo es similar en todos los grupos de edad.

#### 5. BIBLIOGRAFÍA

Abul K Abbas, Shiv Pillai, & Andrew H Lichtman. (2022). Inmunidad especializada en las barreras epiteliales y en los tejidos con privilegio inmunitario. En *Inmunología celular y molecular* (10 ed., p. Chapter 14; 313-336). Elsevier.

Daschner, A., Cuéllar, C., & Rodero, M. (2012). The *Anisakis* allergy debate: Does an evolutionary approach help? *Trends in Parasitology*, 28(1), 9-15.

Marcos, C., E, A., Fernandez, E., J, G., Joral, A., G, B., Tabar, A., Lobera, T., P, C., F, G., & Pascual, C. (2001). Prevalencia de la sensibilización a *Anisakis simplex* en tres áreas españolas, en relación a las diferentes tasas de consumo de pescado. *Relevancia de la alergia a Anisakis simplex*. *Alergol Inmunol Clin*, 16, 337-346.

Martin Cerdeño, V. J. (2011, octubre). Consumo de Pescado en España. Distribución y consumo. *Alimentación en España*, 103-109.

Nieuwenhuizen, N.E., Lopata, A.L., 2013. *Anisakis*—A food-borne parasite that triggers allergic host defences. *Int J Parasitol* 43, 1047-1057.

Puente Águeda, P. (2011). *Anisakiosis en Madrid: Prevalencia, relación con patologías digestivas y hábitos de consumo de pescado*. Universidad Complutense de Madrid.

Puente, P., Anadón, A.M., Rodero, M., Romarís, F., Ubeira, F.M., and Cuéllar, C. (2008) *Anisakis simplex: The high prevalence in Madrid (Spain) and its relation with fish consumption*. *Experimental Parasitology* 118: 271–274.

Real Decreto 1420/2006, de 1 de diciembre, sobre prevención de la parasitosis por *Anisakis* en productos de la pesca suministrados por establecimientos que sirven comida a los consumidores finales o a colectividades.

**76720: MTP COMO DIANA TERAPÉUTICA DE LA DISLIPIDEMIA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE RATAS DIABÉTICAS. MTP AS A PROMISING TARGET FOR THE TREATMENT OF DYSLIPIDEMIA IN A LATE-STAGE DIABETIC RAT MODEL****Área de conocimiento:** FARMACIA**Autor(es):** Irene Vivar García, Cristina Soriano Amador**Tutor(es):** Marina Hernández Martín, M<sup>a</sup> Elvira López-Oliva**Universidad:** Universidad Complutense de Madrid**Facultad:** Farmacia**Titulación:** Grado en Farmacia**Formato:** Póster - Investigación básica**Palabras Clave:** Dislipemia diabética, MTP, modelo ratas diabéticas estado avanzado, diana terapéutica, dieta alta en grasa saturada y colesterol. Diabetic dyslipidemia, MTP, advanced stage diabetic rat model, therapeutic target, diet high in saturated fat and cholesterol

Introducción: La Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) es una enfermedad metabólica caracterizada por la hiperglucemia y la resistencia a la insulina de diferentes tejidos corporales. Una de sus complicaciones es la dislipemia diabética por lo que se precisan modelos animales para estudiar candidatos efectivos para su tratamiento. La regulación al alza de la Proteína de Transferencia de Triglicéridos Microsomal (MTP) contribuye al desarrollo de la dislipidemia en pacientes con DM2, siendo una diana terapéutica para el tratamiento de la DM2.

Objetivo: Verificar que el modelo experimental de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa saturadas y colesterol que simula un estado avanzado de DM2 (HFHCD-STZ/NA-T2DM) es adecuado para probar fármacos inhibidores de MTP para el tratamiento de la dislipidemia diabética.

Material y métodos: Se diseña un modelo de ratas diabéticas en etapa tardía alimentadas con una dieta hipercolesterolémica alta en grasas saturadas combinada con una inyección de estreptozotocina a dosis baja más nicotinamida (HFHCD/STZ) (LD). Se analizaron los niveles de lípidos en suero y de MTP en yeyuno e hígado por inmunohistoquímica y Western blot.

Resultados: Las ratas LD mostraron dislipemia e incrementos en los niveles de MTP hepático e intestinal (prueba t de Student,  $p < 0,05$ ).

Conclusiones: El modelo HFHCD-STZ/NA-T2DM podría ser utilizado para investigar fármacos inhibidores de MTP para el tratamiento de la DM2.

Introduction: Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) is a metabolic disease characterized by the hyperglycemia and insulin resistance of different body tissues. One of the most described complications of T2DM is diabetic dyslipidemia, which is why animal models are needed to study effective candidates for its treatment. Upregulation of the Microsomal Triglyceride Transfer Protein (MTP) contributes to the development of dyslipidemia in patients with DM2, being a therapeutic target for the treatment of DM2.

Aim: To verify that the experimental model of rats fed a diet high in saturated fat and cholesterol that simulates an advanced stage of DM2 (HFHCD-STZ/NA-T2DM) is adequate to test MTP inhibitor drugs for the treatment of diabetic dyslipidemia

Material and Methods: A late-stage diabetic rats' model fed a high saturated-fat hypercholesterolemic diet a meat-matrix combined with a low-dose streptozotocin injection plus nicotinamide (HFHCD/STZ) (LD) has been used. Serum lipids and jejunum and liver MTP levels were analyzed by immunohistochemistry and Western blot.

Results: LD rats showed dyslipidemia and increases in hepatic and intestinal MTP levels (Student's t-test,  $p < 0.05$ )

Conclusions: HFHCD-STZ/NA-T2DM model serves as an alternative animal model of the progression of T2DM to test MTP-inhibiting antidiabetic agents for the treatment of diabetic dyslipidemia.

# MTP COMO DIANA TERAPÉUTICA DE LA DISLIPIDEMIA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE RATAS DIABÉTICAS

## MTP AS A PROMISING TARGET FOR THE TREATMENT OF DYSLIPIDEMIA IN A LATE-STAGE DIABETIC RAT MODEL

1472132, Irene Vivar García, [irevivar@ucm.es](mailto:irevivar@ucm.es); 1479918, Cristina Soriano Amador [csoria01@ucm.es](mailto:csoria01@ucm.es)

Tutor 1: Marina Hernández Martín, [marinh04@ucm.es](mailto:marinh04@ucm.es). Tutor 2: M<sup>a</sup> Elvira López-Oliva, [elopez@ucm.es](mailto:elopez@ucm.es).

Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.

### Resumen:

**Introducción:** La Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) es una enfermedad metabólica caracterizada por la hiperglucemia y la resistencia a la insulina de diferentes tejidos corporales. Una de sus complicaciones es la dislipemia diabética por lo que se precisan modelos animales para estudiar candidatos efectivos para su tratamiento. La regulación al alza de la Proteína de Transferencia de Triglicéridos Microsomal (MTP) contribuye al desarrollo de la dislipidemia en pacientes con DM2, siendo una diana terapéutica para el tratamiento de la DM2.

**Objetivo:** Verificar que el modelo experimental de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa saturadas y colesterol que simula un estado avanzado de DM2 (HFHCD-STZ/NA-T2DM) es adecuado para probar fármacos inhibidores de MTP para el tratamiento de la dislipidemia diabética.

**Material y métodos:** Se diseña un modelo de ratas diabéticas en etapa tardía alimentadas con una dieta hipercolesterolémica alta en grasas saturadas combinada con una inyección de estreptozotocina a dosis baja más nicotinamida (HFHCD/STZ) (LD). Se analizaron los niveles de lípidos en suero y de MTP en yeyuno e hígado por inmunohistoquímica y Western blot.

**Resultados:** Las ratas LD mostraron dislipemia e incrementos en los niveles de MTP hepático e intestinal (prueba t de Student,  $p < 0,05$ ).

**Conclusiones:** El modelo HFHCD-STZ/NA-T2DM podría ser utilizado para investigar fármacos inhibidores de MTP para el tratamiento de la DM2.

### Abstract:

**Introduction:** Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) is a metabolic disease characterized by the hyperglycemia and insulin resistance of different body tissues. One of the most described complications of T2DM is diabetic dyslipidemia, which is why animal models are needed to study effective candidates for its treatment. Upregulation of the Microsomal Triglyceride Transfer Protein (MTP) contributes to the development of dyslipidemia in patients with DM2, being a therapeutic target for the treatment of DM2.

**Aim:** To verify that the experimental model of rats fed a diet high in saturated fat and cholesterol that simulates an advanced stage of DM2 (HFHCD-STZ/NA-T2DM) is adequate to test MTP inhibitor drugs for the treatment of diabetic dyslipidemia.

**Material and Methods:** A late-stage diabetic rats' model fed a high saturated-fat hypercholesterolemic diet a meat-matrix combined with a low-dose streptozotocin injection plus nicotinamide (HFHCD/STZ) (LD) has been used. Serum lipids and jejunum and liver MTP levels were analyzed by immunohistochemistry and Western blot.

**Results:** LD rats showed dyslipidemia and increases in hepatic and intestinal MTP levels (Student's t-test,  $p < 0.05$ ).

**Conclusions:** HFHCD-STZ/NA-T2DM model serves as an alternative animal model of the progression of T2DM to test MTP-inhibiting antidiabetic agents for the treatment of diabetic dyslipidemia.

**Palabras clave:** dislipemia diabética, MTP, modelo ratas diabéticas estado avanzado, diana terapéutica, dieta alta en grasa saturada y colesterol

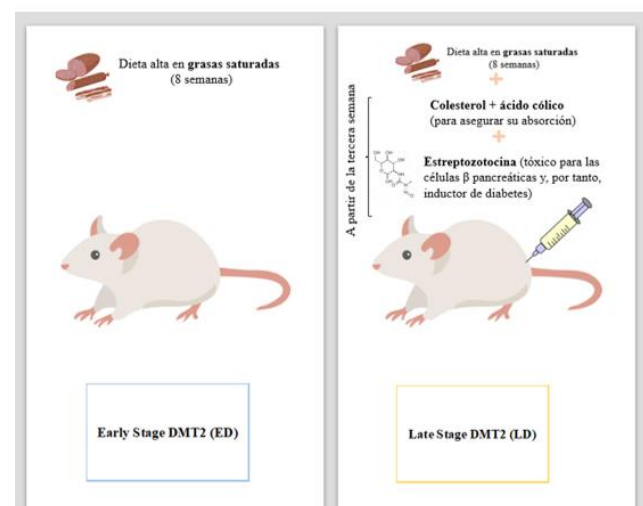
**Keywords:** diabetic dyslipidemia, MTP, advanced stage diabetic rat model, therapeutic target, diet high in saturated fat and cholesterol.

Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) is an ever-growing health issue affecting an estimate of 463 million people worldwide and is considered as a leading global health problem [8]. T2DM is a chronic disease characterized by hyperglycemia resulting from defects in secretion and action of the pancreatic hormone insulin [10]. The most people with T2DM progress through an early stage of insulin resistance before the development of hyperglycemia. In the late stage of T2DM, the pancreas degenerates producing a deficit in insulin secretion [4]. The increase in the consumption of unhealthy diets, the sedentary lifestyle, obesity and the aging of the human population are factors that contribute to its increasing prevalence. All these risk factors lead also to dyslipidemia with increased concentration of small dense VLDL and LDL cholesterol, which contributes to the increased risk of cardiovascular disease in T2DM [18,2]. To overcome the challenges, many antidiabetic drugs are being used, and research is being carried out in search of more effective anti-diabetic drugs. Several newer targets are identified and evaluated to treat T2DM [11]. Microsomal triglyceride transfer protein (MTP) has been identified as one of the promising targets for the treatment of diabetic dyslipidemia. MTP plays crucial role in the assembly of triglyceride rich chylomicrones in enterocytes and VLDL in hepatocytes and several lines of evidence suggested that MTP inhibitors could be instrumental in combating this illness [7]. MTP inhibitors has been a favorite target to lower plasma lipids and treat disorders characterized by higher production of apoB-containing lipoproteins such as atherosclerosis, metabolic syndrome, T2DM and hypertriglyceridemia [14]. To study the effectiveness of antidiabetic drugs, many diabetic models, chemicals, and diabetogenic hormones are used at the research level. Animal model study is essential for the development of new and effective means of treating diseases like T2DM [15]. Several animals are exploited for the experimental studies related to T2DM using the species more biologically similar to humans [11]. To mimic the clinical manifestations of human long-term T2DM progression, the combination of high-saturated fat and cholesterol diet-fed and low-dose streptozotocin-plus nicotinamide-treated (STZ/NA) rat model of T2DM (HFHCD-STZ/NA-T2DM) had been designed [5,1]. The consumption of a dietary cholesterol plus saturated fat is one of the main risk factors for T2DM. The main objective of this study is to determine if MTP is upregulated in this model of late-stage T2DM inducing dyslipidemia, and to verify that HFHCD-STZ/NA-T2DM model could be used to test MTP-inhibiting drugs for the treatment of diabetic dyslipidemia.

## MATERIAL & METHODS

### *Experimental model*

Wistar rats two months old were divided into two groups: an early stage of T2DM (ED) group with insulin resistance, hyperinsulinemia, and hyperglycemia, produced by a high-saturated fat diet; and an advanced late-state of T2DM (LD) group produced by the intake of a high-saturated fat high-cholesterol diet (HSFHCD) for three weeks; followed by an intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ, 65 mg/kg b.w.) and nicotinamide (NAD, 225 mg/kg b.w.) (both from Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). Four days later, fasting hyperglycemia was confirmed and LD rats continued with HSFHCD until the end of experiment 5 weeks more. After 8 weeks, the rats were sacrificed and the plasma and livers and small intestines were collected, weighed, and processed. Total serum cholesterol and VLDL-cholesterol (VLDL-C) were determined by using Spinreact kits (Girona, Spain). Western Blot and immunohistochemistry techniques were carried out from liver and jejunal samples.



**Figure 1** High-saturated fat and cholesterol diet-fed and low-dose streptozotocin-plus nicotinamide-treated (STZ/NA) rat model of T2DM (HFHCD-STZ/NA-T2DM)

The jejunum and liver samples were weighed and crushed with the Ultra-turrax to obtain the extracts. To know the exact protein content, the Lowry method was used, a colorimetric technique for quantitative protein assessment [9]. The added reagent forms a colored complex with the proteins, the color intensity (absorbance) being proportional to the protein concentration, according to the Lambert-Beer Law. With the calibration curves obtained, the corresponding calculations are made to know the amount of extract that will be added with the Laemmli buffer to the wells of the polyacrylamide/sodium dodecyl sulfate gel (SDS-PAGE), where they will be separated by electrophoresis. Once this process is finished, wet transfer is made to a polyvinylidene [17] fluoride membrane, which is subsequently blocked with bovine serum albumin and incubated overnight at 4°C with the corresponding primary antibodies. It is subsequently revealed by incubating the membranes with the appropriate peroxidase-conjugated secondary antibodies [16,3]. The chemiluminescence signal is detected using the ECL kit and quantified using the ImageJ+Fiji program (ImageJ v1.52j software).

### Immunohistochemistry

Jejunum sections were deparaffinized, rehydrated, and boiled in 10 mM citrate buffer (pH 6.0) for tissue permeabilization. Subsequently, endogenous peroxidase is inactivated with hydrogen peroxide and the sections are incubated overnight at 4°C with the primary antibody anti-MTP (Biotechnology Santa Cruz, Quimigen, Madrid, Spain). After this time, the sections were covered with the appropriate biotinylated secondary antibody. Immunohistochemical staining was performed using streptavidin-conjugated horseradish peroxidase and visualized by incubation with 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) (Sigma Aldrich, Madrid, Spain). Sections were stained with Harris's hematoxylin, dehydrated, and mounted on slides. Finally, the results were visualized under the microscope and quantified by scores, evaluating the protein levels by their staining pattern (scores): weak 1), moderate 2), diffuse 3), or intense 4).

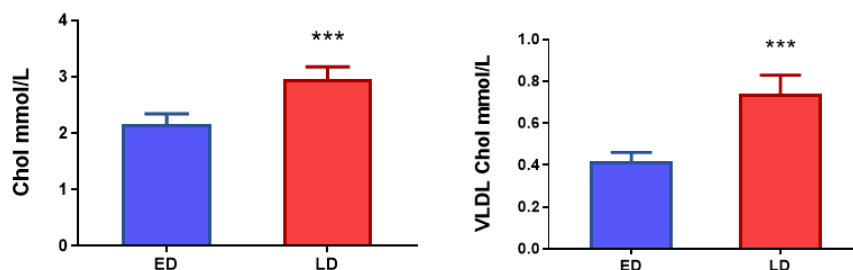
### Statistical analysis

With the results obtained, a database was created in SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) on which a student's t test was then performed to assess its significance ( $p < 0.5$ ). The graphs with the means and standard deviation were prepared with Graph Pad (GraphPad Prism version 8.0, GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## RESULT

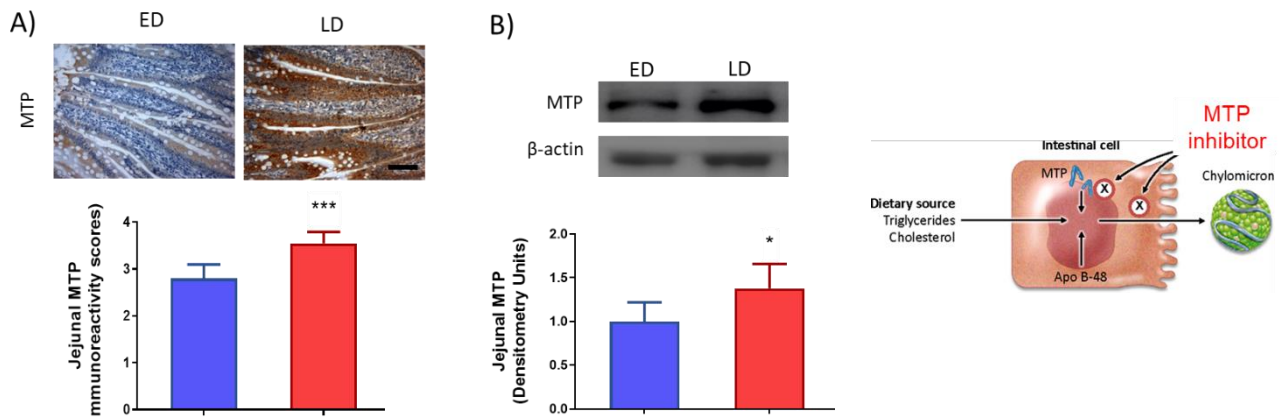
### Cholesterol and VLDL-C levels

Both plasma cholesterol levels and VLDL cholesterol showed significantly higher levels in LD group compared to ED group ( $p = 0.0000$ ) (Figure 2).



**Figure 2.** Serum total cholesterol and VLDL lipoprotein cholesterol levels of early stage T2DM (ED) and late stage T2DM (LD). Values expressed as mean + SD. Asterisks indicate significant differences between groups (Student's t-test,  $p < 0.5$ ).

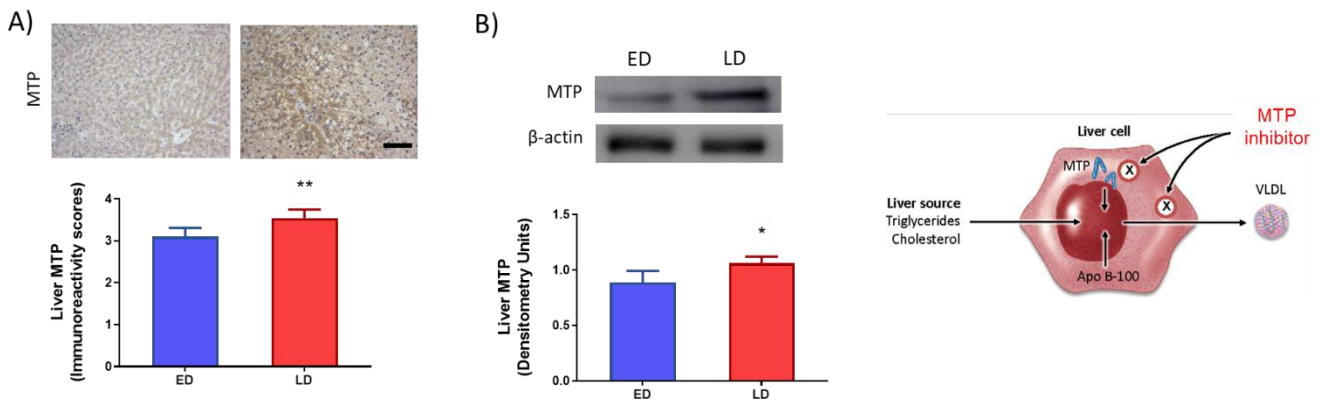
Specifically in the section of the jejunum, MTP levels were measured by immunohistochemistry and Western Blot, which gave a significant increase in LD rats compared to ED rats with both techniques (Figure 3).



**Figure 3.** MTP levels measured by A) immunohistochemistry photographs and scores), and B) Western Blot (densitometry units) in jejunal extracts from an early stage T2DM (ED) and a late stage T2DM (LD) rats. Values expressed as mean + SD. Asterisks indicate significant differences between groups (Student's t-test,  $p < 0.05$ ).

Liver MTP levels

MTP protein was measured in both liver extracts and histological sections (Figure 4). The results indicated that the late-stage rat model showed the highest MTP levels compared to ED group measured by both immunohistochemistry and Western Blot techniques.



**Figure 4.** MTP levels measured by A) immunohistochemistry photographs and scores), and B) Western Blot (densitometry units) in liver extracts from an early stage T2DM (ED) and a late stage T2DM (LD) rats. Values expressed as mean + SD. Asterisks indicate significant differences between groups (Student's t-test,  $p < 0.05$ ).

DISCUSSION

Diabetic dyslipidemia is one of the most frequent complications associated with T2DM [4], thus it is essential researching for new therapeutic targets for its treatment in animal models available for it. HFHCD-STZ/NA-T2DM model is characterized by showing the typical features of the pathophysiological progression of human T2DM with an insulin secretion decreased by pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction [12]. This T2DM model minimize a late-stage T2DM with dysfunctional glucose and lipid metabolisms [5] and could be an appropriate candidate to search new therapies to treat dyslipidemia in T2DM. In this study, we demonstrated that LD late-stage T2DM rats showed dyslipidemia with high cholesterol and VLDL-C levels. Parallely, MTP was raised significantly in both the liver and intestine of LD group. Increased plasmatic cholesterol and VLDL-C were found to correlate with hepatic MTP, since MTP is rate limiting to

produce VLDL-C [13]. Its principal role is to transfer lipids onto the apoB polypeptide in the endoplasmic reticulum of lipoprotein-secreting cells [13]. MTP activity is also essential for the synthesis of chylomicron in intestine and the cholesterol secretion [6]. Thus, MTP has become a potential therapeutic target for the treatment of both hypercholesterolemia, as well as chylomicronemia [7]. It has been demonstrated that MTP inhibitors such as lomitapide, leads to reversal of hyperlipidemia [15, 6]. This study suggests that the elevated intestinal and hepatic MTP may be an important target in an attempt to reduce atherosclerosis in a late stage T2DM. Future experiments should evaluate the benefits of MTP inhibitors in HFHCD-STZ/NA-T2DM model to facilitate the further development of these drugs.

## CONCLUSIONS

HFHCD-STZ/NA-T2DM model serves as an alternative animal model of the progression of T2DM to test MTP-inhibiting antidiabetic agents for the treatment of diabetic dyslipidemia.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Bass, J. J., Wilkinson, D. J., Rankin, D., Phillips, B. E., Szewczyk, N. J., Smith, K., & Atherton, P. J. (2017). An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, 27(1), 4–25. <https://doi.org/10.1111/sms.12702>
2. Corkey BE. T2DM: Have We Got it All Wrong? Insulin Hypersecretion and Food Additives: Cause of Obesity and T2DM? *T2DM Care* (2012) 35:2432–7.
3. Diccionario de cáncer del NCI. <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/prueba-inmunohistoquimica>
4. Galicia-García U, Benito-Vicente A, Jebari S, Larrea-Sebal A, Siddiqi H, Uribe KB, Ostolaza H, Martín C. Pathophysiology of Type 2 T2DM Mellitus. *Int J Mol Sci*. 2020, 30;21(17):6275.
5. Hernandez-Martín, M. Could Duodenal Molecular Mechanisms be Involved in the Hypocholesterolemic Effect of Silicon Used as Functional Ingredient in Late-Stage Type 2 Diabetes Mellitus. *Mol. Nutr. Food Res*. 2022, 2200104
6. Hiroshi Mabuchi & Atsushi Nohara (2013) MTP inhibitor for treating severe LDL cholesterolemia, *Clinical Lipidology*, 8:4, 387-389.
7. Hussain, M.M., Rava, P., Walsh, M. et al. Multiple functions of microsomal triglyceride transfer protein. *Nutr Metab (Lond)* 9, 14 (2012).
8. IDF T2DM Atlas 10th edition 2021.
9. Johnson, M. Protein Quantitation. *Materials and Methods* 2, (2012)
10. Kharroubi AT, Darwish HM. T2DM mellitus: the epidemic of the century. *World J T2DM*. 2015;6(6):850–867. doi: 10.4239/wjd.v6.i6.850.
11. Kottaisamy CPD, Raj DS, Prasanth Kumar V, Sankaran U. Experimental animal models for T2DM and its related complications-a review. *Lab Anim Res*. 2021
12. Macho-González A, López-Oliva ME, Merino JJ, García-Fernández RA, Garcimartín A, Redondo-Castillejo R, Bastida S, Sánchez-Muniz FJ, Benedí J. Carob fruit extract-enriched meat improves pancreatic beta-cell dysfunction, hepatic insulin signaling and lipogenesis in late-stage type 2 diabetes mellitus model. *J Nutr Biochem*. 2020 Oct;84:108461.
13. Meghan T. Walsh & M. Mahmood Hussain (2017) Targeting microsomal triglyceride transfer protein and lipoprotein assembly to treat homozygous familial hypercholesterolemia, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 54:1, 26-48.
14. Muscoli, S.; Ifrim, M.; Russo, M.; Candido, F.; Sanseviero, A.; Milite, M.; Di Luozzo, M.; Marchei, M.; Sangiorgi, G.M. Current Options and Future Perspectives in the Treatment of Dyslipidemia. *J. Clin. Med*. 2022, 11, 4716.
15. Szkudelski, T. Streptozotocin-Nicotinamide-Induced T2DM in the rat. Characteristics of the experimental model. *Exp. Biol. Med*. 2012, 237, 481–490.
16. Taylor, S. C., Berkelman, T., Yadav, G., & Hammond, M. (2013). A defined methodology for reliable quantification of Western blot data. *Molecular biotechnology*, 55(3), 217–226. <https://doi.org/10.1007/s12033-013-9672-6>
17. Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9), 4350–4354. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>
18. Yanai H, Hirowatari Y, Yoshida H. Diabetic dyslipidemia: evaluation and mechanism. *Glob Health Med*. 2019 Oct 31;1(1):30-35.

**76894: Oxidative stress increases in the liver of the offspring of lactating rats exposed to BPA-low-dose - Estrés oxidativo hepático aumenta en la descendencia de ratas expuestas a dosis bajas de BFA****Área de conocimiento:** MEDICINA**Autor(es):** Salomón José Marea Peñalver**Tutor(es):** Lisa Rancan, Beatriz Linillos Pradillo**Universidad:** Universidad Complutense de Madrid**Facultad:** Facultad de Medicina**Titulación:** Grado en Medicina**Formato:** Comunicación Oral - Investigación básica**Palabras Clave:** Keywords: bisphenol A; oxidative stress; inflammation; apoptosis; liver injury. Palabras clave: bisfenol A, estrés oxidativo, inflamación, apoptosis, daño hepático

Abstract: Bisphenol A (BPA) is a synthetic xenoestrogen compound with high prevalence in our environment. Monomers of this compound can be released into the environment and enter the food chain, resulting in human exposure to low doses. Since bisphenols are primarily metabolized by the liver, this organ is more vulnerable to lower doses of bisphenols than others. Exposure during prenatal development may increase the risk of diseases in adulthood. The aim was to evaluate whether BPA administration could generate oxidative stress in liver of female postnatal day 6 (PND6) offspring. Long Evans rats received oral treatment: Control, BPA-lowdose (LBPA) 0.036 mg/kg b.w./day, and BPA-high-dose (HBPA) 3.42 mg/kg b.w./day. The levels of antioxidant enzymes (CAT, SOD, GR, GPx, and GST) and glutathione system (GSH, GSSG) were measured using colorimetric methods in liver of PND6 offspring. Mean values were analyzed using Prism-7. LBPA affected liver defense mechanisms (antioxidant enzymes and glutathione system), increasing ROS levels and producing lipid peroxidation in female PND6 offspring as a consequence of perinatal exposure.

Resumen: Bisfenol A (BFA) es un xenoestrógeno sintético con alta prevalencia en nuestro medio. Los monómeros de este compuesto pueden ser liberados al ambiente y entrar en la cadena alimenticia, resultando en una exposición humana a dosis bajas. Debido a que los bisfenoles son metabolizados principalmente en el hígado, este órgano es más vulnerable a las dosis bajas de bisfenoles que otros. La exposición durante el desarrollo prenatal puede incrementar el riesgo de enfermedades en la edad adulta. El objetivo fue evaluar si la administración de BFA puede generar estrés oxidativo en el hígado de la descendencia femenina en el día post natal 6 (DPN6). Ratas Long Evans recibieron tratamiento oral: Control, BFA a bajas dosis (BBFA) 0.036 mg/kg peso corporal/día, y BFA a altas dosis (ABFA) 3.42 mg/kg peso corporal/día. Los niveles de enzimas antioxidantes (CAT, SOD, GGR, GPx y GST) y el sistema glutatión (GSH, GSSG) fueron medidos utilizando métodos colorimétricos en el hígado de la descendencia DPN6. Los valores medios fueron analizados utilizando Prism-7. BBFA afectaron los mecanismos de defensa hepáticos (enzimas antioxidantes y sistema glutatión), incrementando los niveles de ROS y produciendo lipoperoxidación en la descendencia de hembras DPN6 como consecuencia de la exposición perinatal.



## **Oxidative stress increases in the liver of the offspring of lactating rats exposed to BPA-low-dose**

### **Estrés oxidativo hepático aumenta en la descendencia de ratas expuestas a dosis bajas de BFA**

Autor: 1516234, Salomón José Marea Peñalver, [smarea@ucm.es](mailto:smarea@ucm.es)

Tutor 1: Lisa Rancan, [lisaranc@ucm.es](mailto:lisaranc@ucm.es)

Tutor 2: Beatriz Linillos Pradillo, [beatlini@ucm.es](mailto:beatlini@ucm.es)

Facultad de medicina, Universidad Complutense de Madrid.

**Abstract:** Bisphenol A (BPA) is a synthetic xenoestrogen compound with high prevalence in our environment. Monomers of this compound can be released into the environment and enter the food chain, resulting in human exposure to low doses. Since bisphenols are primarily metabolized by the liver, this organ is more vulnerable to lower doses of bisphenols than others. Exposure during prenatal development may increase the risk of diseases in adulthood. The aim was to evaluate whether BPA administration could generate oxidative stress in liver of female postnatal day 6 (PND6) offspring. Long Evans rats received oral treatment: Control, BPA-low-dose (LBPA) 0.036 mg/kg b.w./day, and BPA-high-dose (HBPA) 3.42 mg/kg b.w./day. The levels of antioxidant enzymes (CAT, SOD, GR, GPx, and GST) and glutathione system (GSH, GSSG) were measured using colorimetric methods in liver of PND6 offspring. Mean values were analyzed using Prism-7. LBPA affected liver defense mechanisms (antioxidant enzymes and glutathione system), increasing ROS levels and producing lipid peroxidation in female PND6 offspring as a consequence of perinatal exposure.

**Resumen:** Bisfenol A (BFA) es un xenoestrógeno sintético con alta prevalencia en nuestro medio. Los monómeros de este compuesto pueden ser liberados al ambiente y entrar en la cadena alimenticia, resultando en una exposición humana a dosis bajas. Debido a que los bisfenoles son metabolizados principalmente en el hígado, este órgano es más vulnerable a las dosis bajas de bisfenoles que otros. La exposición durante el desarrollo prenatal puede incrementar el riesgo de enfermedades en la edad adulta. El objetivo fue evaluar si la administración de BFA puede generar estrés oxidativo en el hígado de la descendencia femenina en el día post natal 6 (DPN6). Ratas Long Evans recibieron tratamiento oral: Control, BFA a bajas dosis (BBFA) 0.036 mg/kg peso corporal/día, y BFA a altas dosis (ABFA) 3.42 mg/kg peso corporal/día. Los niveles de enzimas antioxidantes (CAT, SOD, GGR, GPx y GST) y el sistema glutatión (GSH, GSSG) fueron medidos utilizando métodos colorimétricos en el hígado de la descendencia DPN6. Los valores medios fueron analizados utilizando Prism-7. BBFA afectaron los mecanismos de defensa hepáticos (enzimas antioxidantes y sistema glutatión), incrementando los niveles de ROS y produciendo lipoperoxidación en la descendencia de hembras DPN6 como consecuencia de la exposición perinatal.

**Keywords:** bisphenol A; oxidative stress; inflammation; apoptosis; liver injury.

**Palabras clave:** bisfenol A, estrés oxidativo, inflamación, apoptosis, daño hepático.

## 1. Introduction

Bisphenol A is one of the most widely used material in everyday plastic products, resulting that the population is submitted to a constant exposure to low doses of this chemical. Numerous scientific studies describe the toxic effects of Bisphenol A (BPA), an endocrine disruptor used in industry, it is associated with cardiovascular, respiratory, diabetes, renal, obesity, and reproductive disorders.

In previous studies, BPA has been detected in the human placenta, umbilical cord blood, amniotic fluid, and fetal liver [1]. Hence, since BPA was found in the previously mentioned tissues, as well as at birth [1], exposure to this compound during prenatal life is probable. However, the effect of BPA on the offspring is still poorly understood.

The aim of this study was to evaluate whether BPA administration during pregnancy is able to induce liver damage in lactating dams and their female offspring at postnatal day 6 (PND6) by affecting the oxidant/antioxidant balance through the induction of oxidative stress, increasing inflammation and triggering apoptosis.

## 2. Materials and methods

Male and female Long Evans rats were randomly divided into three groups, consisting of (1) untreated group - given a diet with a corresponding concentration of corn oil (n=10 females; n=4 males); (2) low-dose Bisphenol A (0.5 mg/kg of chow) group - intake of 0.036 mg/kg body weight/day of BPA in the diet (n=9 females; n=4 males); (3) high-dose Bisphenol A (50 mg/kg of food) group - intake of 3.42 mg/kg body weight/day of BPA in the diet (n=8 females; n=4 males). Dosages for each rat were calculated from food intake data, which equated to 7.3% of body weight. BPA was dissolved in a 10% ethanol and 90% corn oil solution. Rats were housed in polypropylene cages with glass drinkers to avoid endocrine disruptors, and a cylindrical environmental enrichment element was added.

During pre-mating, rats were treated with their corresponding BPA dose or control diet for two weeks. Mating occurred between male and female rats from the same group after verifying the female was in estrus. Subsequently, positive vaginal smears for sperm or sperm plug were checked every morning for a week. Treatment was maintained during pregnancy. After birth, the lactating dams were kept in individual cages with their offspring and dietary treatment continued until PND6.

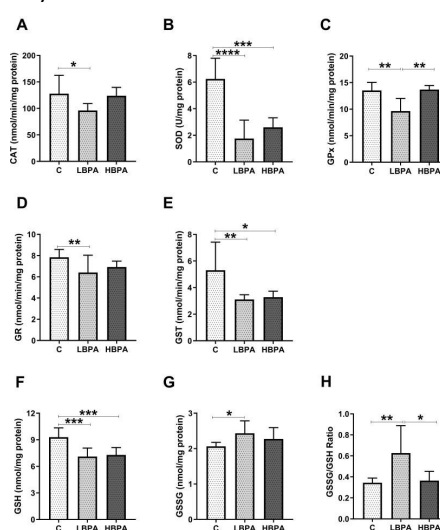
Lactating mothers and female offspring postnatal day 6 (PND6) were sacrificed by decapitation. The livers were collected and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for the purpose of studying antioxidant enzymes, markers of oxidative stress, inflammation, and apoptosis.

## 3. Results

### 3.1. *Effects of Perinatal Exposure to BPA on Antioxidant Enzyme Activities and Glutathione Concentrations in Liver of Female PND6 Offspring*

Antioxidant enzyme activities and glutathione concentrations were determined in the livers of female PND6 pups to determine the effect of perinatal exposure to low and high doses of BPA (Figure 1). When PND6 offspring were perinatally exposed to low dose of BPA, all antioxidant enzyme activities (CAT, SOD, GPx, GR, and GST) were significantly decreased compared to the control group (Figure 1A–E). In addition, a decrease in reduced glutathione (GSH) concentration (Figure 1F) and an increase in oxidized glutathione (GSSG) concentration

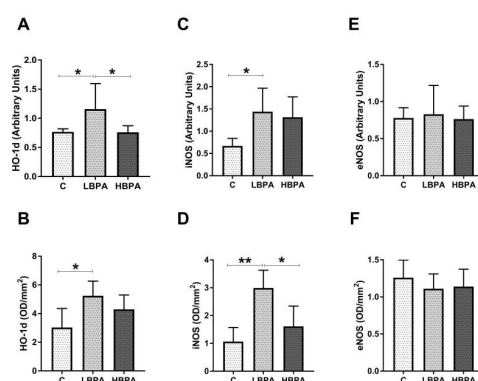
(Figure 1G) were observed in the low dose of BPA offspring. When PND6 offspring were perinatally exposed to the high dose of BPA, decreased activities of antioxidant enzymes SOD and GST were observed in comparison to the control group (Figure 1B, E, respectively). GSH concentration decreased in comparison to the control group whereas no significant changes were observed in GSSG concentration (Figure 1G). The GSSG/GSH ratio increased in offspring exposed to low dose of BPA as compared to the control group (Figure 1H). When antioxidant enzyme activities and glutathione concentrations were compared between treated groups, a significant increase in GPx was observed in the high dose of BPA group compared to the low dose one (Figure 1C). On the contrary, an imbalance between GSSG and GSH levels was observed in the low dose of BPA group, resulting in a higher ratio as a marker of oxidative stress compared to the high dose one (Figure 1H).



**Figure 1.** Effects of perinatal exposure to BPA on antioxidant enzyme activities and glutathione concentrations in livers from female PND6 offspring. (A) Enzymatic activity of catalase (CAT) in nmol/min/mg protein; (B) superoxide dismutase (SOD) in U/mg protein; (C) glutathione peroxidase (GPx) in nmol/min/mg protein; (D) glutathione reductase (GR) in nmol/min/mg protein; (E) glutathione S-transferase (GST) in nmol/min/mg protein. (F) Concentration of reduced glutathione (GSH) in nmol/mg protein; (G) concentration of oxidized glutathione (GSSG) in ng/mg protein. (H) GSSG/GSH ratio. Data represent mean  $\pm$  SD.  $n = 12$  control PND6 offspring;  $n = 12$  LBPA PND6 offspring;  $n = 12$  HBPA PND6 offspring (two replicates for each sample). Statistical significance was determined by one-way ANOVA. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

### 3.2. Effects of Perinatal Exposure to BPA on Oxidative Stress Intermediaries in Liver of PND6 Offspring

In PND6 offspring exposed to low doses of BPA, an up-regulation in gene and protein expressions of HO-1d and iNOS compared to the control group was observed (Figure 2A–D). Regarding HO-1d gene expression and iNOS protein expression, significant differences were also observed between treatment groups, where the low-dose-PND6 group showed significantly higher expressions than the high dose group (Figure 2A, D, respectively). However, no differences in eNOS gene and protein expressions were observed among groups (Figure 2E, F, respectively).

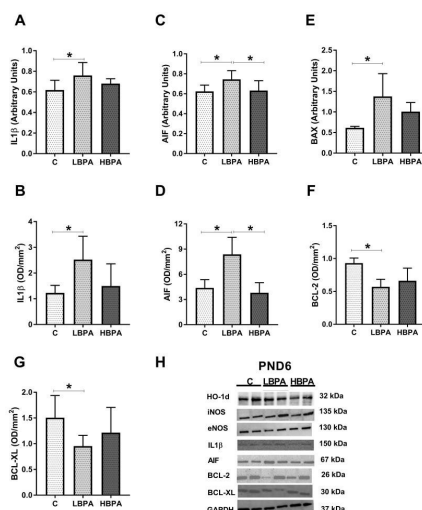


**Figure 2.** Effects of perinatal exposure to BPA on oxidative stress intermediaries in livers from female PND6 offspring. mRNA and protein expressions of HO-1d (heme oxygenase 1) (A, B); iNOS (inducible nitric oxide synthase) (C,D); and eNOS (endothelial nitric oxide synthase) (E,F). Data represent mean  $\pm$  SD. For mRNA, n = 12 control PND6 offspring; n = 12 LBPA PND6 offspring; n = 12 HBPA PND6 offspring (three replicates for each gene). For protein, n = 5 rats per experimental group. Statistical significance was determined by one-way ANOVA. \* p < 0.05; \*\* p < 0.01.

### 3.3. Effects of Perinatal Exposure to BPA on Inflammatory Mediator and Apoptosis Markers in Liver of PND6 Offspring

The results of gene and protein expressions of inflammatory markers IL1 $\beta$  and apoptosis markers AIF, BAX, BCL-2, and BCL-XL are shown in Figure 3. The proinflammatory cytokine IL1 $\beta$  showed a significant increase in gene and protein expressions in offspring treated with low doses of BPA as compared to the control group (Figure 3A, B, respectively). Regarding the proapoptotic molecules, AIF gene and protein expressions were up-regulated in offspring exposed to low doses of BPA compared to the control group (Figure 3C, D, respectively). When AIF gene and protein expressions were analyzed between treated groups, significant differences were found. In both gene and protein expressions, the low-dose-PND6 offspring showed significantly higher values than the high-dose group, whose results were not different from the control group (Figure 3C, D, respectively). BAX gene expression was up-regulated in low dose of BPA offspring (Figure 3E).

The anti-apoptotic markers BCL-2 and BCL-XL significantly reduced their protein expression in low-dose-BPA offspring versus the control group (Figure 3F, G, respectively). Representative protein blots for each tested marker are shown in Figure 3H.



**Figure 3.** Effects of perinatal exposure to BPA on inflammatory mediator and apoptosis markers in livers from female PND6 offspring. (A, B) mRNA and protein expressions of IL1 $\beta$  (interleukin-1- $\beta$ ). (C, D); mRNA and protein expression of AIF (apoptosis-inducing factor). (E) mRNA of BAX (Bcl-2- associated X protein). (F, G) Protein expressions of BCL-2 (B-cell lymphoma) and BCL-XL (B-cell lymphoma-extra large). (H) Representative images of the Western blot results of the different proteins studied. Data represent mean  $\pm$  SD. For mRNA, n = 12 control PND6 offspring; n = 12 LBPA PND6 offspring; n = 12 HBPA PND6 offspring (three replicates for each gene). For protein, n = 5 rats per experimental group. Statistical significance was determined by one-way ANOVA. \* p < 0.05.

#### 4. Discussion

Most scientific studies have focused on the effect of high doses of BPA in adults, but the effect of low BPA dose on perinatal exposure seems to be more important to take into consideration [2]. Exposure of pregnant dams to BPA is of concern to the developing fetus since it is able to cross the placenta and enter into cord blood and amniotic fluid. This is in addition to the presence of little or no fetal enzymatic activity at all of uridyl diphosphate glucuronyl transferase (UDPGT) to biotransform it into inactive bisphenol A-glucuronide (BPAG) [2].

Nishikawa et al. [3] showed that the presence of free BPA in the liver of fetal rats could be the result of direct transfer of free BPA into the maternal circulation via the placenta, in addition to the hydrolysis of BPAG in the fetal liver.

In the present study, we observed a decrease in the activity levels of antioxidant enzymes CAT, SOD, GPx, GR, and GST in PND6 pups exposed to the low dose of BPA. SOD and GST activities were also decreased in the offspring with the high dose of BPA. GSH was reduced in the offspring exposed to the low dose of BPA, with increased levels of oxidized GSH. This is consistent with a study in pregnant mice orally exposed to a dose of 100 ng/g BPA from PND7 to PND21, showing that perinatal BPA exposure could induce oxidative damage and alter normal metabolic profiles in the liver [4].

Lin et al. [5] showed that perinatal BPA exposure causes the development of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in the offspring of pregnant Sprague-Dawley rats that had access to water containing 1 or 10  $\mu$ g/mL BPA from gestational day six (GD6) to PND21.

This oxidant/antioxidant imbalance also became noticeable here as gene and protein expression levels of oxidative stress-inducing proteins (HO-1d and iNOS) were increased in the offspring exposed to the low dose of BPA, along with elevated plasma NO levels. Increased proinflammatory cytokine IL-1 $\beta$  and proapoptotic factors AIF and BAX, with the subsequent decrease in antiapoptotic factors BCL-2 and BCL- XL, led to an induction of apoptosis in liver cells in the offspring perinatally exposed to the low dose of BPA. Furthermore, the expression of inflammatory cytokines, Sirt1, its natural antisense long non-coding RNA (Sirt1-AS LncRNA), and histone deacetylase 1 (Hdac1) were affected in exposed animals. Another study has shown susceptibility to NAFLD in adulthood following mitochondrial dysregulation upon perinatal exposure [5]. Jiang et al. [2] showed that perinatal BPA exposure contributes to the development of hepatic steatosis in male offspring at 3, 15, and 26 weeks when postnatally treated with 40  $\mu$ g/kg BPA, and that this was mediated by impaired hepatic mitochondrial function.

Therefore, exposure to low levels of endocrine disrupting chemical (EDC) BPA— these levels being easier to achieve in daily life—is of concern since it interferes with many metabolic

processes and causes widespread damage to body tissues. The fact that lower levels of BPA are generally more effective than the higher doses is a very remarkable issue as previously described. Moreover, it should also be noted that the timing of BPA exposure may determine the long-term outcome, as earlier exposure points tend to exert a more severe effect [2]. Thus, fetuses and newborns are more sensitive than adults, and chemical exposure during critical developmental stages could cause irreversible long-term consequences [5]. In our study, similar effects were observed in perinatally exposed offspring after BPA exposure, being this a critical period influencing ontogenic development of various tissues and also increasing the risk of developing diseases later in adulthood. Further research is critical to understand the extent and effect of prenatal exposure to potentially toxic chemicals including BPA.

## 5. Conclusions

BPA is one of the most widely used material in everyday plastic products, resulting that the population is submitted to a constant exposure to low doses of this chemical. In this study, it was observed that exposure to low doses of BPA in female offspring increased oxidative stress levels by decreasing the activity of antioxidant enzymes and altering the glutathione system in the liver, the organ responsible for detoxification. The period of exposure is very important because even if it occurs during the fetal or neonatal period, the effects can influence tissue development and affect adult life. Regardless, further research is needed to elucidate the health risk of BPA exposure in adult life and in offspring.

## 6. References

1. Cao, X.L.; Zhang, J.; Goodyer, C.G.; Hayward, S.; Cooke, G.M.; Curran, I.H.A. Bisphenol A in Human Placental and Fetal Liver Tissues Collected from Greater Montreal Area (Quebec) during 1998-2008. *Chemosphere* 2012, 89, 505–511. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.05.003>.
2. Jiang, Y.; Xia, W.; Zhu, Y.; Li, X.; Wang, D.; Liu, J.; Chang, H.; Li, G.; Xu, B.; Chen, X.; et al. Mitochondrial Dysfunction in Early Life Resulted from Perinatal Bisphenol A Exposure Contributes to Hepatic Steatosis in Rat Offspring. *Toxicol. Lett.* 2014, 228, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.04.013>.
3. Nishikawa, M.; Iwano, H.; Yanagisawa, R.; Koike, N.; Inoue, H.; Yokota, H. Placental Transfer of Conjugated Bisphenol A and Subsequent Reactivation in the Rat Fetus. *Environ. Health Perspect.* 2010, 118, 1196–1203. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901575>.
4. Meng, Z.; Tian, S.; Yan, J.; Jia, M.; Yan, S.; Li, R.; Zhang, R.; Zhu, W.; Zhou, Z. Effects of Perinatal Exposure to BPA, BPF and BPAF on Liver Function in Male Mouse Offspring Involving in Oxidative Damage and Metabolic Disorder. *Environ. Pollut.* 2019, 247, 935–943. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.01.116>
5. Lin, R.; Wu, D.; Wu, F.-J.; Meng, Y.; Zhang, J.-H.; Wang, X.-G.; Jia, L.-H. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Induced by Perinatal Exposure to Bisphenol a Is Associated With Activated MTOR and TLR4/NF-KB Signaling Pathways in Offspring Rats. *Front. Endocrinol.* 2019, 10, 620. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00620>.

**76784: Tomografía de Coherencia Óptica en modelos murinos de Alzheimer. Una revisión. / Optical Coherence Tomography in murine models of Alzheimer. A review.****Área de conocimiento:** MEDICINA**Autor(es):** Alberto Arias Vázquez**Tutor(es):** José Manuel Ramírez Sebastián, Lidia Sánchez-Puebla Fernández**Universidad:** Universidad Complutense de Madrid**Facultad:** Facultad de Medicina**Titulación:** Grado en Medicina**Formato:** Póster - Revisiones bibliográficas**Palabras Clave:** Alzheimer, retina, ratones, OCT. Alzheimer's, retina, mice model, OCT**RESUMEN**

Introducción: en la enfermedad de Alzheimer (EA) se han visto alteraciones precoces en la retina de ratones y humanos. Por ello, varios estudios han propuesto el uso de la tomografía de coherencia óptica (OCT) como un biomarcador temprano de la enfermedad.

Material y métodos: se realizó una búsqueda bibliográfica en PubMed hasta enero de 2023 de análisis de retina por OCT en modelos murinos de EA, seleccionando 24 artículos para su estudio.

Resultados: los artículos seleccionados utilizaron seis modelos murinos distintos y diferentes equipos de OCT. El modelo TgCRND8 demostró únicamente un adelgazamiento en la capa de fibras nerviosas de la retina y la capa de células ganglionares (CFNR/CCG). En el APP NL-F/ NL-F, se mostró un adelgazamiento global en varios tiempos de estudio y engrosamiento únicamente a los 17 meses. El APP NL- G- F no presentó diferencias. El APP/PS1, mostró un adelgazamiento del grosor de la retina según envejecían los animales. En el 3xTgAD hubo una reducción en todas las capas excepto la capa nuclear externa, que aumentó de grosor, mientras que otro estudio presentó únicamente un adelgazamiento de la CFNR. Otros dos estudios mostraron un adelgazamiento global y uno de ellos un aumento del complejo CFNR/CCG. El 5xFAD presentó adelgazamiento de la CFNR y del complejo GCL, así como una reducción del grosor global en otro estudio. Un último trabajo no pudo replicar estas diferencias.

Discusión: la falta de homogeneidad de resultados puede explicarse por las diferencias en los modelos y métodos de análisis. Sin embargo, la afectación del sector superior resulta más constante, dado que es la zona que mejor simula la mácula humana. Específicamente, la afectación de la CFNR, está presente en la mayoría de los trabajos.

Conclusiones: es necesario protocolizar los métodos de trabajo para poder avanzar en el estudio de la fisiopatología retiniana de la EA.

**ABSTRACT**

Introduction: in Alzheimer's disease (AD), early alterations have been seen in the retina of mice and humans. Several studies have proposed the use of optical coherence tomography (OCT) as an early biomarker of the disease.

Materials and methods: a literature search was conducted on PubMed up to January 2023 for OCT analysis of the retina in murine models of Alzheimer's disease, selecting 24 articles for study.

Results: the selected articles used six different murine models and various OCT equipment. The TgCRND8 model demonstrated only thinning in the retinal nerve fiber layer and ganglion cell layer (RNFL/GCL). The APP NL-F/NL-F model showed global thinning at various study times and thickening only at 17 months. The APP NL-G-F did not show any differences. The APP/PS1 model showed thinning as the animals aged. In the 3xTgAD model, there was a reduction in all layers except for the outer nuclear layer, which increased in thickness. Another study showed only thinning of the RNFL. Two other studies showed global thinning, and one of them showed an increase in the RNFL/GCL complex. The 5xFAD model showed thinning of the RNFL and GCL complex, as well as a reduction in overall thickness in another study. A final study could not replicate these differences.

Discussion: the lack of homogeneity in results can be explained by differences in models and analysis methods. However, the involvement of the upper sector appears to be more consistent, as it is the area that best simulates the human macula. Specifically, the involvement of the CFNR is present in most studies.

Conclusions: standardizing study methods is necessary to advance the study of retinal pathophysiology in Alzheimer's disease.

# Tomografía de Coherencia Óptica en modelos murinos de Alzheimer. Una revisión.

## *Optical Coherence Tomography in murine models of Alzheimer.*

### *A review.*

Nº identificador 692901 Alberto Arias Vázquez (albearia@ucm.es)

Tutor 1: Prof. José Manuel Ramírez Sebastián (ramirezs@med.ucm.es)

Tutora 2: Lidia Sánchez-Puebla Fernández (lidsan02@ucm.es)

*Instituto de Investigaciones Oftalmológicas Ramón Castroviejo.*

*Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid*

### RESUMEN

**Introducción:** en la enfermedad de Alzheimer (EA) se han visto alteraciones precoces en la retina de ratones y humanos. Por ello, varios estudios han propuesto el uso de la tomografía de coherencia óptica (OCT) como un biomarcador temprano de la enfermedad.

**Material y métodos:** se realizó una búsqueda bibliográfica en PubMed hasta enero de 2023 de análisis de retina por OCT en modelos murinos de EA, seleccionando 24 artículos para su estudio.

**Resultados:** los artículos seleccionados utilizaron seis modelos murinos distintos y diferentes equipos de OCT. El modelo TgCRND8 demostró únicamente un adelgazamiento en la capa de fibras nerviosas de la retina y la capa de células ganglionares (CFNR/CCG). En el *APP<sup>NL-F</sup>/NL-F*, se mostró un adelgazamiento global en varios tiempos de estudio y engrosamiento únicamente a los 17 meses. El *APP<sup>NL-G-F</sup>* no presentó diferencias. El *APP/PS1*, mostró un adelgazamiento del grosor de la retina según envejecían los animales. En el 3xTgAD hubo una reducción en todas las capas excepto la capa nuclear externa, que aumentó de grosor, mientras que otro estudio presentó únicamente un adelgazamiento de la CFNR. Otros dos estudios mostraron un adelgazamiento global y uno de ellos un aumento del complejo CFNR/CCG. El 5xFAD presentó adelgazamiento de la CFNR y del complejo GCL, así como una reducción del grosor global en otro estudio. Un último trabajo no pudo replicar estas diferencias.

**Discusión:** la falta de homogeneidad de resultados puede explicarse por las diferencias en los modelos y métodos de análisis. Sin embargo, la afectación del sector superior resulta más constante, dado que es la zona que mejor simula la mácula humana. Específicamente, la afectación de la CFNR, está presente en la mayoría de los trabajos.

**Conclusiones:** es necesario protocolizar los métodos de trabajo para poder avanzar en el estudio de la fisiopatología retiniana de la EA.

**PALABRAS CLAVE:** Alzheimer, retina, ratones, OCT.



## ABSTRACT

**Introduction:** in Alzheimer's disease (AD), early alterations have been seen in the retina of mice and humans. Several studies have proposed the use of optical coherence tomography (OCT) as an early biomarker of the disease.

**Materials and methods:** a literature search was conducted on PubMed up to January 2023 for OCT analysis of the retina in murine models of Alzheimer's disease, selecting 24 articles for study.

**Results:** the selected articles used six different murine models and various OCT equipment. The TgCRND8 model demonstrated only thinning in the retinal nerve fiber layer and ganglion cell layer (RNFL/GCL). The APP<sup>NL-F/NL-F</sup> model showed global thinning at various study times and thickening only at 17 months. The APP<sup>NL-G-F</sup> did not show any differences. The APP/PS1 model showed thinning as the animals aged. In the 3xTgAD model, there was a reduction in all layers except for the outer nuclear layer, which increased in thickness. Another study showed only thinning of the RNFL. Two other studies showed global thinning, and one of them showed an increase in the RNFL/GCL complex. The 5xFAD model showed thinning of the RNFL and GCL complex, as well as a reduction in overall thickness in another study. A final study could not replicate these differences.

**Discussion:** the lack of homogeneity in results can be explained by differences in models and analysis methods. However, the involvement of the upper sector appears to be more consistent, as it is the area that best simulates the human macula. Specifically, the involvement of the CFNR is present in most studies.

**Conclusions:** standardizing study methods is necessary to advance the study of retinal pathophysiology in Alzheimer's disease.

**KEYWORDS:** *Alzheimer's, retina, mice model, OCT.*

## INTRODUCCIÓN.

La Enfermedad del Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia y constituye un trastorno neurodegenerativo relacionado con la edad que causa deterioro cognitivo y pérdidas de memoria. La enfermedad puede comenzar 20 años antes de los primeros síntomas por lo que es de gran utilidad, estudiar modelos que expresen formas preclínicas de la enfermedad (Peters et al., 2019). Debido a esta necesidad de estudio, los modelos murinos de la enfermedad han evolucionado hacia modelos humanizados, expresando características mucho más parecidas a las encontradas en pacientes con la enfermedad (Sasaguri et al., 2022).

A diferencia de los humanos, las retinas de los ratones no tienen un área macular independiente (Volland et al., 2015) y el disco óptico está ubicado en el centro geométrico de la retina. La zona retiniana correspondiente al área macular coincide con el eje óptico del ojo del ratón (Sterratt et al., 2013). Por lo tanto, a pesar de las diferencias en la anatomía, la retina del ratón tiene una gran similitud con la retina humana (Volland et al., 2015).

El análisis de la retina mediante tomografía de coherencia óptica (OCT) se ha propuesto como un buen biomarcador para la detección temprana y el seguimiento de los cambios relacionados con la EA (Majeed et al., 2021). Sin embargo, los hallazgos encontrados no parecen ser homogéneos y en muchos casos, se contradicen entre sí (Ngolab et al., 2019; Gupta et al., 2021). Una de las ventajas de la OCT es que permite el análisis *in vivo* y realizar estudios longitudinales de la enfermedad (Fischer et al., 2019). Además, los nuevos equipos alcanzan una alta resolución de imagen, comparable a las imágenes histológicas de microscopía (Gloesmann et al., 2003) y la posibilidad de obtener datos volumétricos (Strouthidis et al., 2010). Existen pocos modelos de OCT adaptados a la óptica de modelos animales y en muchos casos, se utilizan dispositivos fabricados o modificados por los propios laboratorios (Ochakovski y Fischer, 2019). Por tanto, el objetivo del presente trabajo es revisar los diferentes métodos de análisis de OCT que se han llevado a cabo en modelos murinos de EA y analizar qué tipo de OCT se ha utilizado, qué sectores de la retina se han analizado y qué capas se han visto afectadas con mayor significación.

## MATERIAL Y MÉTODOS.

Se ha realizado una búsqueda bibliográfica hasta enero de 2023 utilizando los términos "MESH" en PubMed. Los términos utilizados fueron: "modelo de ratón de Alzheimer", "tomografía de coherencia óptica", "tomografía de coherencia óptica retiniana" así como sus combinaciones. Se consideraron un total de 24 artículos que cumplían los siguientes criterios de inclusión (artículos con características generales de retina de ratón, investigaciones que realizaron OCT en modelos de ratones con EA, investigaciones que realizaron OCT en combinación con otras tecnologías). Los criterios de exclusión eran (artículos que utilicen la OCT en modelo murino de otras enfermedades, investigaciones que no utilicen la OCT, investigación realizada en pacientes humanos con EA).

## RESULTADOS

### Modelos de EA y características demográficas

Tras realizar la revisión se ha encontrado que se han realizado estudios de OCT en seis modelos murinos distintos (TgCRND, APP<sup>NL-F</sup>, APP<sup>NL-G-F</sup>, APP/PS1, 3xTg-AD, 5xFAD). Un resumen

de los diferentes estudios se puede encontrar en la tabla 1.

Modelo murino (número de estudios)	Autor y año	Edad/ sexo
TgCRND8 (1)	Buccarello et al.,2017	8 meses/ ♂
APPNL-F (1)	Salobar-García et al.,2020	6,9,12,15,17 y 20 meses / ♂
APP NL- G- F (1)	Vandenabeele et al.,2021	3,6,9,12 y 18 meses / ♂♀
APP/PS1 (2)	Georgevsky et al.,2019	3 a 12 meses/ ♂♀
	Harper et al.,2020	11 a 26 meses/ ♂♀
3xTg-AD (5)	Chiquita et al.,2019	4, 8, 12 y 16 meses/ ♂
	Song et al.,2020	15-16 meses/ ♀
	Gardner et al.,2020	3, 5, 8 y 11 meses / ♂♀
	Ferreira et al.,2021	1,2,3,4 meses/ ♂
	Guimarães et al.,2022	1, 2, 3, 4, 8, 12 y 16 meses / ♂
5xFAD (3)	Lim et al.,2020	6, 12 y 17 meses -
	Kim et al.,2021	6 meses / ♀
	Matei et al.,2022	3 meses/ ♂

**Tabla 1.** Resumen de las principales características de los modelos murinos de EA analizados mediante OCT.

### Equipo OCT

La configuración descrita con mayor frecuencia en la bibliografía es la combinación del microscopio de imagen retiniana Phoenix Micron IV con el modelo OCT de la misma marca (Phoenix Research Laboratories, San Ramon, CA, EE. UU.) (Ferreira et al., 2021; Guimarães et al., 2022).

La OCT Spectralis de Heidelberg se ha empleado en dos estudios (Salobar-García et al., 2020; Matei et al., 2022) al igual que la Envisu R2200 empleada en los trabajos de Vandenabeele y colaboradores y Lim y colaboradores. (Vandenabeele et al.,2021; Lim et al.,2020)

Mientras que para el análisis del modelo APP/PS Georgevski y colaboradores emplearon la OCT Wasatch Photonics (Wasatch Photonics, USA), este mismo modelo de EA fue analizado por Harper y colaboradores emplearon un sistema OCT de alta resolución sensible a la polarización (PS-OCT) (Georgevsky et al.,2019). Estas OCT que además de analizar estructura estudian otros parámetros como el *scattering* y otras propiedades del tejido también fueron empleadas en los estudios de Song, Gardner y Kim y colaboradores en sus respectivos modelos animales. (Song et al.,2020; Gardner et al.,2020; Kim et al.,2021)

### Hallazgos retinianos

Los estudios sobre el modelo TgCRND8 demostraron únicamente un adelgazamiento en la capa de fibras nerviosas de la retina/capa de células ganglionares (CFNR/CCG) a los 4 meses de edad (Buccarello et al., 2017).

En el modelo  $APP^{NL-F/NL-F}$ , los autores reportaron un adelgazamiento global marcado en los sectores nasal y temporal inferior a la edad de 6 meses y exclusivamente en la CFNR de los sectores superotemporal y nasal a los 20 meses. Sin embargo, a los 17 meses se encontró un

engrosamiento de los sectores nasales e inferiores. Finalmente, a los 20 meses de edad se demostró el adelgazamiento nasal, temporal e inferior del anillo interior, así como superior y temporal del anillo externo (Salobrar-García et al., 2021). En el modelo APP<sup>NL-G-F</sup> el grupo de Vandenabeele no fue capaz de replicar estos hallazgos en ningún grupo de edad (Vandenabeele et al., 2021).

En el modelo APP/PS1, Georgevsky describió un adelgazamiento en la retina interna tanto del modelo APP/PS1 como de los ratones *wild type* entre las edades 3 y 12 meses, así como un hallazgo similar en la retina externa de los animales transgénicos, pero no en los controles sanos (Georgevsky et al., 2019). En el mismo modelo, Harper describe un adelgazamiento del grosor retiniano conforme los animales envejecen tanto en animales sanos como en enfermos (Harper et al., 2020).

Chiquita en el modelo 3xTgAD demostró una reducción estadísticamente significativa del grosor retiniano respecto al control sano en todas las capas analizadas excepto en la capa nuclear externa (CNE), capa en la que hallaron un aumento del grosor respecto a los controles (Chiquita et al., 2019). En el mismo modelo, Song presenta un adelgazamiento de la CFNR al control (Song et al., 2020). Sin embargo, no muestra diferencias significativas en las capas CPE (capa plexiforme externa) o EPR (epitelio pigmentario de la retina). El equipo liderado por Gardner describe un adelgazamiento en el grosor total retiniano y más específicamente en las capas superficiales (CFNR + CCG + CPI + CNE) en su modelo (Gardner et al., 2020). En el mismo modelo, Ferreira encontró diferencias al comparar los ratones 3xTgAD con ratones *wild type* entre 1 y 4 meses, demostrando una reducción del grosor total retiniano a excepción del complejo CFNR/CCG, donde el modelo transgénico presentó mayor grosor (Ferreira et al., 2021). Guimarães no especifica el grosor retiniano en sus experimentos, pero describe diferencias en el envejecimiento entre ratones enfermos y sanos (Guimarães et al., 2022).

En el modelo 5xFAD, Lim presenta un adelgazamiento significativo de la capa CFNR en todos los grupos de edad respecto a los controles. El complejo GCL (CFNR+CPI) también presentó una reducción comparada con los ratones sanos (Lim et al., 2020). En el mismo modelo, el trabajo de Kim demostró que el grosor retiniano total era significativamente menor en los ratones 5xFAD comparado con los *wild type*. (Kim et al., 2021). Por último, Matei y colaboradores no encontraron diferencias en el grosor retiniano total en el mismo modelo animal (Matei et al., 2022).

## DISCUSIÓN

Al igual que ocurre en los estudios de la retina en pacientes con EA no existe una homogeneización de los resultados (Ngolab et al., 2019). Por un lado, se han empleado modelos murinos con características diferentes y que sobreexpresan diferentes genes que confieren rasgos diferentes en el desarrollo de la patología neurodegenerativa. La mayoría de los modelos animales estudiados presentan mutaciones en el gen de la Presenilina dando lugar a formas familiares de la enfermedad. Para evitar este problema se estandarizó el uso de modelos de segunda generación como son el modelo *App*<sup>NL-G-F</sup> y *App*<sup>NL-F/NL-F</sup> (Sasaguri et al., 2022). Si bien la aparición precoz de patología puede facilitar el trabajo experimental al acortar los tiempos de estudio, sería más adecuado diseñar los estudios con modelos más tardíos con el fin de simular la historia natural de la enfermedad. Por ejemplo, teniendo en cuenta que 24 meses de edad de

un ratón corresponden a 80 años en humanos (Dutta y Sengupta, 2016), analizar un modelo murino a los 6 meses de edad sería equiparable a estudiar un humano a los 20 años.

La utilización de diferentes dispositivos de OCT hace mucho más complicado fijar estrategias de análisis estándar.

Los hallazgos retinianos también son bastante heterogéneos, sin embargo, se puede observar que la afectación del sector superior resulta mucho más constante en la literatura, debido a que es donde se localiza la mayor concentración de células ganglionares y fotorreceptores en el ratón, siendo el área más parecida a la mácula humana (Volland et al., 2015).

Específicamente, la afectación de la CFNR, está presente en la mayoría de los trabajos presentados. Conforme el ratón envejece, el adelgazamiento parece concentrarse en las regiones temporales e inferiores de la retina. Igualmente, algunos estudios han encontrado aumento de grosor retiniano atribuible a la CPI que podría responder a fenómenos inflamatorios por migraciones gliales, con predominio del área nasal en edades más tempranas al adelgazamiento de la CFNR. Varios estudios han demostrado igualmente un adelgazamiento tardío de la retina total, pero esto no siempre ha podido ser replicado. De esta forma, las alteraciones retinianas parecen localizarse preferentemente en capas de fibras nerviosas en lugar de capas de núcleos celulares.

## CONCLUSIONES

Los hallazgos encontrados tras realizar la revisión no son homogéneos y en muchos casos se contradicen entre sí, esto puede ser debido a los diferentes modelos murinos empleados, su edad, las fases de la enfermedad analizadas y los dispositivos de OCT empleados. Unificar técnicas de exploración así como protocolos de análisis de retina es fundamental para poder conocer detalladamente las características fisiopatológicas de la EA.

## BIBLIOGRAFÍA.

Buccarello, L., Scipio, A., Sacchi, M., Castaldo, A. M., Bertani, I., ReCecconi, A., Maestroni, S., Zerbini, G., Nucci, P., & Borsello, T. (2017). The c-jun N-terminal kinase plays a key role in ocular degenerative changes in a mouse model of Alzheimer disease suggesting a correlation between ocular and brain pathologies. *Oncotarget*, *8*(47), 83038–83051.

Chiquita, S., Campos, E. J., Castelhana, J., Ribeiro, M., Sereno, J., Moreira, P. I., Castelo-Branco, M., & Ambrósio, A. F. (2019). Retinal thinning of inner sub-layers is associated with cortical atrophy in a mouse model of Alzheimer's disease: a longitudinal multimodal in vivo study. *Alzheimer's Research & Therapy*, *11*(1), 90.

Ferreira, H., Martins, J., Moreira, P. I., Ambrósio, A. F., Castelo-Branco, M., Serranho, P., & Bernardes, R. (2021). Longitudinal normative OCT retinal thickness data for wild-type mice, and characterization of changes in the 3xTg-AD mice model of Alzheimer's disease. *Aging*, *13*(7), 9433–9454.

Fischer, J., Otto, T., Delori, F., Pace, L., & Staurengi, G. (2019). Scanning Laser Ophthalmoscopy (SLO). (*J. F. Bille (ed.); pp. 35–57*).

Gardner, M. R., Baruah, V., Vargas, G., Motamedi, M., Milner, T. E., & Rylander, H. G. 3rd. (2020). Scattering Angle Resolved Optical Coherence Tomography Detects Early Changes in 3xTg Alzheimer's Disease Mouse Model. *Translational Vision Science & Technology*, *9*(5), 18.

Georgevsky, D., Retsas, S., Raoufi, N., Shimoni, O., & Golzan, S. M. (2019). A longitudinal assessment of retinal function and structure in the APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Translational Neurodegeneration*, *8*, 30.

Goesmann, M., Hermann, B., Schubert, C., Sattmann, H., Ahnelt, P. K., & Drexler, W. (2003). Histologic correlation of pig retina radial stratification with ultrahigh-resolution optical coherence tomography. *Investigative Ophthalmology & Visual*

*Science*, 44(4), 1696–1703.

Guimarães, P., Serranho, P., Martins, J., Moreira, P. I., Ambrósio, A. F., Castelo-Branco, M., & Bernardes, R. (2022). Retinal Aging in 3x Tg-AD Mice Model of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 14, 832195.

Gupta, V. B., Chitranshi, N., den Haan, J., Mirzaei, M., You, Y., Lim, J. K., Basavarajappa, D., Godinez, A., Di Angelantonio, S., Sachdev, P., Salekdeh, G. H., Bouwman, F., Graham, S., & Gupta, V. (2021). Retinal changes in Alzheimer's disease- integrated prospects of imaging, functional and molecular advances. *Progress in Retinal and Eye Research*, 82, 100899.

Harper, D. J., Augustin, M., Lichtenegger, A., Gesperger, J., Himmel, T., Muck, M., Merkle, C. W., Eugui, P., Kummer, S., Woehrer, A., Glösmann, M., & Baumann, B. (2020). Retinal analysis of a mouse model of Alzheimer's disease with multicontrast optical coherence tomography. *Neurophotonics*, 7(1), 15006.

Kim, B. J., Lee, V., Lee, E. B., Saludades, A., Trojanowski, J. Q., Dunaief, J. L., Grossman, M., & Irwin, D. J. (2021). Retina tissue validation of optical coherence tomography determined outer nuclear layer loss in FTLT-tau. *Acta Neuropathologica Communications*, 9(1), 184.

Lim, J. K. H., Li, Q.-X., He, Z., Vingrys, A. J., Chinnery, H. R., Mullen, J., Bui, B. V., & Nguyen, C. T. O. (2020). Retinal Functional and Structural Changes in the 5xFAD Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neuroscience*, 14, 862.

Majeed, A., Marwick, B., Yu, H., Fadavi, H., & Tavakoli, M. (2021). Ophthalmic Biomarkers for Alzheimer's Disease: A Review. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 13, 720167.

Matei, N., Leahy, S., Blair, N. P., Burford, J., Rahimi, M., & Shahidi, M. (2022). Retinal Vascular Physiology Biomarkers in a 5XFAD Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Cells*, 11(15).

Ngolab, J., Honma, P., & Rissman, R. A. (2019). Reflections on the Utility of the Retina as a Biomarker for Alzheimer's Disease: A Literature Review. *Neurology and Therapy*, 8(Suppl 2), 57–72.

Ochakovski, G. A., & Fischer, M. D. (2019). Phenotyping of Mouse Models with OCT. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1834, 285–291.

Peters, R., Booth, A., Rockwood, K., Peters, J., D'Este, C., & Anstey, K. J. (2019). Combining modifiable risk factors and risk of dementia: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*, 9(1), e022846.

Salobar-García, E., López-Cuenca, I., Sánchez-Puebla, L., de Hoz, R., Fernández-Albarral, J. A., Ramírez, A. I., Bravo-Ferrer, I., Medina, V., Moro, M. A., Saido, T. C., Saito, T., Salazar, J. J., & Ramírez, J. M. (2020). Retinal Thickness Changes Over Time in a Murine AD Model APP (NL-F/NL-F). *Frontiers in Aging Neuroscience*, 12, 625642.

Sasaguri, H., Hashimoto, S., Watamura, N., Sato, K., Takamura, R., Nagata, K., Tsubuki, S., Ohshima, T., Yoshiki, A., Sato, K., Kumita, W., Sasaki, E., Kitazume, S., Nilsson, P., Winblad, B., Saito, T., Iwata, N., & Saido, T. C. (2022). Recent Advances in the Modeling of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neuroscience*, 16, 807473.

Song, G., Steelman, Z. A., Finkelstein, S., Yang, Z., Martin, L., Chu, K. K., Farsiu, S., Arshavsky, V. Y., & Wax, A. (2020). Multimodal Coherent Imaging of Retinal Biomarkers of Alzheimer's Disease in a Mouse Model. *Scientific Reports*, 10(1), 7912.

Sterratt, D. C., Lyngholm, D., Willshaw, D. J., & Thompson, I. D. (2013). Standard anatomical and visual space for the mouse retina: computational reconstruction and transformation of flattened retinae with the Retistruct package. *PLoS Computational Biology*, 9(2), e1002921.

Strouthidis, N. G., Grimm, J., Williams, G. A., Cull, G. A., Wilson, D. J., & Burgoyne, C. F. (2010). A comparison of optic nerve head morphology viewed by spectral domain optical coherence tomography and by serial histology. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51(3), 1464–1474.

Vandenabeele, M., Veys, L., Lemmens, S., Hadoux, X., Gelders, G., Masin, L., Serneels, L., Theunis, J., Saito, T., Saido, T. C., Jayapala, M., De Boever, P., De Strooper, B., Stalmans, I., van Wijngaarden, P., Moons, L., & De Groef, L. (2021). The App(NL-G-F) mouse retina is a site for preclinical Alzheimer's disease diagnosis and research. *Acta Neuropathologica Communications*, 9(1), 6.

Volland, S., Esteve-Rudd, J., Hoo, J., Yee, C., & Williams, D. S. (2015). A comparison of some organizational characteristics of the mouse central retina and the human macula. *PLoS One*, 10(4), e0125631.

**76837: ROLE OF LRRK2 IN THE ACTIVITY OF MICROGLIAL CELLS / PAPEL DE LRRK2 EN LA ACTIVIDAD DE LA MICROGLÍA****Área de conocimiento:** MEDICINA**Autor(es):** Leire García Megía**Tutor(es):** Elisa Navarro González de Mesa, Jorge Montesinos Selfa**Universidad:** Universidad Complutense de Madrid**Facultad:** Facultad de Ciencias Químicas**Titulación:** Grado en Bioquímica**Formato:** Póster - Investigación básica**Palabras Clave:** Parkinson's disease, microglia, LRRK2, G2019S mutation / Enfermedad de Parkinson, microglía, LRRK2, mutación G2019S

Parkinson's disease (PD) is the second-most common neurodegenerative disorder with no disease-modifying therapy so far. The G2019S mutation in the LRRK2 gene is the most common genetic risk factor in sporadic cases of PD. Considering the importance of microglia in neurodegenerative diseases and the role of LRRK2 in the immune system, this research purpose is to study G2019S mutation in LRRK2 gene in the context of microglial activity. Firstly, we tried to (1) generate microglial stable cell lines overexpressing LRRK2-WT and LRRK2-G2019S. In order to do so, we are cloning LRRK2-WT and LRRK2-G2019S plasmids with eukaryotic resistances (Blasticidin and Neomycin), to be used in the generation of lentivirus to infect BV2 microglial cells. Simultaneously, we (2) are characterizing the activity of microglia using the murine cell line BV2. Thus, we studied (i) immune activation of BV2 cells after LPS treatment (10 ng/mL to 1 µg/mL) for 24 hours, using Griess method to assess nitrite production to the media (an indirect measure of inducible nitric oxidase activity). These results showed that LPS produced a significant increase in nitrites in BV2 cells. Moreover, we examined (ii) microglial phagocytic capacity incubating BV2 cells with fluorescent carboxylated-modified beads for either 3 or 24 hours by immunoassay. The results led us to conclude that BV2 microglia was capable of phagocytosing beads at 3 hours condition. Future experiments will be performed to understand how LRRK2 may be affecting microglial functionality. With this research we will shed light on the role of LRRK2 in PD, which will help in the development of new therapies for these tremendously devastating pathologies.

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común y aún no existe una terapia modificadora para ella. La mutación G2019S en el gen LRRK2 es el factor genético de riesgo más común en los casos esporádicos de Parkinson. Considerando la importancia de la microglía en las enfermedades neurodegenerativas y el papel de LRRK2 en el sistema inmune, el objetivo de esta investigación es estudiar la mutación G2019S en el gen LRRK2 en el contexto de actividad microglial. Con este trabajo estamos (1) generando líneas microgliales estables que sobreexpresen LRRK2-WT y LRRK2-G2019S. Para ello, clonamos los plásmidos LRRK2-WT y LRRK2-G2019S con resistencias eucarióticas (Blasticidina y Neomicina), para utilizarlos en la generación de lentivirus para infectar células microgliales BV2. Al mismo tiempo, estamos (2) caracterizando la actividad microglial empleando la línea celular murina BV2. Así, caracterizamos (i) la activación inmune de las células BV2 después de tratarlas con LPS (10 ng/mL-1 µg/mL) durante 24 horas, utilizando el método de Griess, que determina la liberación de nitritos al medio, medida indirecta de la activación de la óxido nítrico sintasa inducible). Nuestros resultados mostraron que el LPS producía un aumento significativo de la producción de nitritos en las células BV2. Además, examinamos (ii) la capacidad fagocítica de la microglía, incubando células BV2 con micropartículas fluorescentes durante 3 o 24 horas y determinamos la fagocitosis por inmunoensayo. Los resultados nos llevaron a concluir que la microglía BV2 es capaz de fagocitar las micropartículas al menos en la condición de incubación de 3 horas. En el futuro se llevarán a cabo experimentos para comprender cómo LRRK2 podría estar afectando a la funcionalidad de la microglía. Con esta investigación aportaremos información relevante sobre el papel de LRRK2 en la EP, lo que ayudará en el desarrollo de nuevas terapias para esta patología tremendamente devastadora.

## ROLE OF LRRK2 IN THE ACTIVITY OF MICROGLIAL CELLS PAPEL DE LRRK2 EN LA ACTIVIDAD DE LA MICROGLÍA

1522836, Leire García Megía, [leigar01@ucm.es](mailto:leigar01@ucm.es).

Elisa Navarro González de Mesa, [elisnava@ucm.es](mailto:elisnava@ucm.es).

Jorge Montesinos Selfa, [jorge.montesinos@cib.csic.es](mailto:jorge.montesinos@cib.csic.es).

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid.

Parkinson's disease (PD) is the second-most common neurodegenerative disorder with no disease-modifying therapy so far. The G2019S mutation in the *LRRK2* gene is the most common genetic risk factor in sporadic cases of PD. Considering the importance of microglia in neurodegenerative diseases and the role of LRRK2 in the immune system, this research purpose is to study G2019S mutation in *LRRK2* gene in the context of microglial activity. Firstly, we tried to (1) generate microglial stable cell lines overexpressing LRRK2-WT and LRRK2-G2019S. In order to do so, we are cloning LRRK2-WT and LRRK2-G2019S plasmids with eukaryotic resistances (Blasticidin and Neomycin), to be used in the generation of lentivirus to infect BV2 microglial cells. Simultaneously, we (2) are characterizing the activity of microglia using the murine cell line BV2. Thus, we studied (i) immune activation of BV2 cells after LPS treatment (10 ng/mL to 1 µg/mL) for 24 hours, using Griess method to assess nitrite production to the media (an indirect measure of inducible nitric oxidase activity). These results showed that LPS produced a significant increase in nitrites in BV2 cells. Moreover, we examined (ii) microglial phagocytic capacity incubating BV2 cells with fluorescent carboxylated-modified beads for either 3 or 24 hours by immunoassay. The results led us to conclude that BV2 microglia was capable of phagocytosing beads at 3 hours condition. Future experiments will be performed to understand how LRRK2 may be affecting microglial functionality. With this research we will shed light on the role of LRRK2 in PD, which will help in the development of new therapies for these tremendously devastating pathologies.

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común y aún no existe una terapia modificadora para ella. La mutación G2019S en el gen *LRRK2* es el factor genético de riesgo más común en los casos esporádicos de Parkinson. Considerando la importancia de la microglía en las enfermedades neurodegenerativas y el papel de LRRK2 en el sistema inmune, el objetivo de esta investigación es estudiar la mutación G2019S en el gen *LRRK2* en el contexto de actividad microglial. Con este trabajo estamos (1) generando líneas microgliales estables que sobreexpresen LRRK2-WT y LRRK2-G2019S. Para ello, clonamos los plásmidos LRRK2-WT y LRRK2-G2019S con resistencias eucarióticas (Blasticidina y Neomicina), para utilizarlos en la generación de lentivirus para infectar células microgliales BV2. Al mismo tiempo, estamos (2) caracterizando la actividad microglial empleando la línea celular murina BV2. Así, caracterizamos (i) la activación inmune de las células BV2 después de tratarlas con LPS (10 ng/mL-1 µg/mL) durante 24 horas, utilizando el método de Griess, que determina la liberación de nitritos al medio, medida indirecta de la activación de la óxido nítrico sintasa inducible). Nuestros resultados mostraron que el LPS producía un aumento significativo de la producción de nitritos en las células BV2. Además, examinamos (ii) la capacidad fagocítica de la microglía, incubando células BV2 con micropartículas fluorescentes durante 3 o 24 horas y determinamos la fagocitosis por inmunoensayo. Los resultados nos llevaron a concluir que la microglía BV2 es capaz de fagocitar las micropartículas al menos en la condición de incubación de 3 horas. En el futuro se llevarán a cabo experimentos para comprender cómo LRRK2 podría estar afectando a la funcionalidad de la microglía. Con esta investigación aportaremos información relevante sobre el papel de LRRK2 en la EP, lo que ayudará en el desarrollo de nuevas terapias para esta patología tremendamente devastadora.

**Keywords:** Parkinson's disease, microglia, LRRK2, G2019S mutation.

**Palabras clave:** Enfermedad de Parkinson, microglía, LRRK2, mutación G2019S.



## BACKGROUND

Parkinson's disease (PD) is the second-most common neurodegenerative disorder that affects over 8.5 million people and the numbers are predicted to increase in the near future. PD is a motor disorder characterized by the loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra and  $\alpha$ -synuclein accumulation, creating Lewy bodies (Poewe et al., 2017). However, there is no disease-modifying therapy for this devastating disease yet, thus it is necessary to understand the pathophysiology in order to develop effective treatments.

*LRRK2* (leucine-rich repeat kinase 2) is the most common genetic risk factor contributing to sporadic cases of PD. *LRRK2* is an ubiquitous protein-coding gene which encodes LRRK2 protein. This gene is highly expressed in immune cells (Zimprich et al., 2004) and is involved in multiple cellular functions, such as lysosomal processes, including autophagy and mitophagy, and cellular homeostasis (Usmani et al., 2021). The G2019S is the most common mutation that leads to a gain of function in the protein. Despite the research done in neurons and other cell types regarding LRRK2 functions, little is known about its role in microglial functionality.

Microglia are the brain immune cells and play critical roles in inflammatory events, regulation of brain homeostasis and neurogenesis (Lopes et al., 2022). For that reason, dysfunctional microglia seems to have a significant role in neurodegenerative disorders. These cells interact with neurons, participating in synaptic remodeling and brain connectivity in physiological conditions. Nevertheless, under pathology, microglia switch to disease-associated phenotype, changing their morphology and secreting pro- and anti-inflammatory factors that exacerbate disease progression. How microglia contributes to PD remains to be an important area of study.

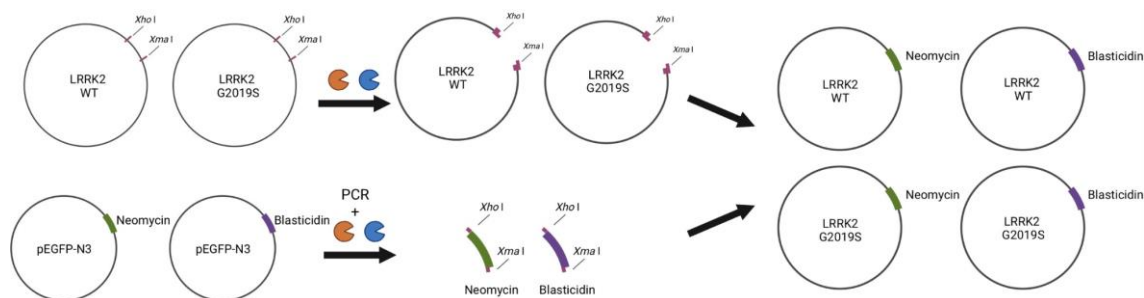
Considering the importance of microglia in neurodegenerative diseases and the role of LRRK2 in the immune system, this research purpose is to study G2019S mutation in *LRRK2* gene in microglial activity. In order to do that, the specific aims are (1) to generate LRRK2-WT and LRRK2-G2019S overexpressing microglial cells and (2) to characterize the activity of both basal and LRRK2 overexpressing microglia. Having larger information about the function of LRRK2 in microglial cells will help to understand the pathophysiology of PD and to develop new therapies for this tremendously devastating disease.

## MATERIALS AND METHODS

### *Cloning strategy*

The LRRK2-WT and LRRK2-G2019S plasmids were nicely shared by Dr. Mark Cookson. In order to add eukaryotic resistances we are following the cloning strategy exemplified in **Fig. 1**. Briefly, Neomycin, Blastidicin and LRRK2 plasmids were digested using *Xho*I and *Xma*I restriction enzymes and ligation of the plasmids and inserts was performed using T4 ligase. We are trying both resistances so that we will be able to use the most suitable.

All plasmids and the ligation products were produced in *E. coli* DH5a in LB (Luria-Bertani Broth) medium and introduced by heatshock. Bacteria were selected by Ampicillin resistance (100  $\mu$ g/mL). Each step was followed by an electrophoresis in 1% agarose gel to check the size of the fragments. Ligation products will be used for the generation of lentivirus to infect BV2 cells.



**Figure 1:** Scheme of cloning eukaryotic resistances (Neomycin and Blasticidin) into LRRK2-WT and LRRK2-G2019S plasmids. Procedure involves amplification of eukaryotic resistances by PCR, digesting the plasmids and eukaryotic resistances using *XhoI* and *XmaI* restriction enzymes, followed by the ligation of the fragments.

### Cell culture and microglial assays

BV2 cells were grown in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma-Aldrich) supplemented with 10% FBS (Fetal Bovine Serum, Sigma-Aldrich), 2 mM UltraGlutamine and P/S antibiotics (Lonza) in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C. Cells are trypsinized twice per week. Mycoplasma tests were performed every other week.

To evaluate the microglial immune activation profile, we performed the experiments at baseline and after LPS activation (Lipopolysaccharide from *E. coli*, Sigma-Merck). We seed the cells at 150,000 cells/well in 48 well/plates. Nitrite production was measured by Griess reaction. This method consists of nitrite reaction with NEDA (N-(1-Naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride, Sigma-Aldrich) and DAPSONE (2-Aminophenyl sulfone, Sigma-Aldrich), forming a pink-red azo dye. Media was incubated with NEDA and DAPSONE for 5 minutes. The quantification was done measuring the absorbance at a wavelength of 540 nm using a plate reader.

In order to evaluate the viability of BV2 cells after LPS treatment, we performed MTT assay. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Panreac) is a yellow tetrazole which is reduced to purple insoluble formazan in living cells by mitochondrial oxidoreductases. MTT was added to the cells and incubated for 2 hours. Afterwards, media was removed and formazan crystals were dissolved in DMSO. Finally, we measured the absorbance at a wavelength of 595 nm.

For the measurement of the phagocytic capacity we used carboxylated-modified beads (Invitrogen). These beads are fluorescent (580/605 nm), thus uptake by BV2 cells can be assessed by immunofluorescence. For this experiment, 300,000 cells were seeded in coverslips in 24 well/plates. Cells were treated for either 3 or 24 hours with 1:1000 beads. We used cells treated with Cytochalasin D (CytD), an inhibitor of actin polymerization, as negative control. CytD (Sigma-Aldrich) 2 µM was added 30 minutes before the beads. Finally, cells were washed with PBS and fixed with paraformaldehyde 4 % for 30 minutes for downstream immunostaining with Iba-1 antibody (Wako Chemicals). Pictures were taken using a Colibri 5 microscope with an amplification of 40x. Pictures were analyzed using Fiji program. Phagocytosis capacity was measured as manual co-localization of Iba-1 and carboxylated-modified beads and normalized by the number of cells.

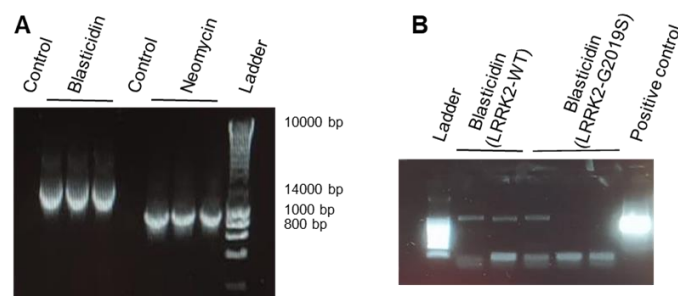
### Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 8.0.2. Normality was assessed using Saphiro-Wilk test and analyses were performed using paired one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test post-hoc. Statistical significance was considered when p-value < 0.05.

## RESULTS

### Generation of microglial stable cell lines overexpressing LRRK2-WT and LRRK2-G2019S

First step was to obtain Neomycin and Blasticidin resistances from available plasmids following the procedure explained in Methods section. Successful isolation of both resistances is presented in **Fig. 2A**. Afterwards, we performed the ligation of the fragments and digested plasmids. Results of the Blasticidin ligation to LRRK2 plasmids is represented in **Fig. 2B**, with promising results for LRRK2-WT. Neomycin results are not shown as we did not obtain a band, so the process will need to be repeated as LRRK2-G2019S ligation, where results were also negative (**Fig. 2B**). In order to ensure that Blasticidin resistance was successfully ligated to LRRK2-WT, we are currently sequencing the ligation product. If sequencing results were positive, we would proceed in the generation of lentivirus using HEK293T cells in order to infect BV2 microglial cells. The ligation of the rest of resistances and plasmids is still on-going.

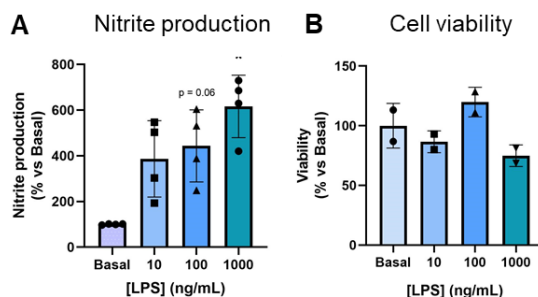


**Figure 2:** Electrophoresis in 1% agarose gels. **A)** Neomycin and Blasticidin resistances after digestion and PCR. Each digestion was performed in triplicates. **B)** Blasticidin resistance from the ligation of LRRK2-WT/LRRK2-G2019S and blasticidin resistance. LRRK2-WT ligation was performed in duplicates and LRRK2-G2019S in triplicates.

### Immune activation after LPS treatment

To assess the microglial immune activation profile, we started evaluating BV2 without overexpressing LRRK2. We used different LPS concentrations, from 10 ng/mL to 1  $\mu$ g/mL and we measured nitrite production with Griess method. The results, shown in **Fig. 3A**, indicated that 24 hours of LPS 1  $\mu$ g/mL induced a significant increase in the production of nitrites, whereas a non-significant increase was observed at the other concentrations. These results prove that LPS is able to activate inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the BV2 microglia, thus releasing nitrites to the media.

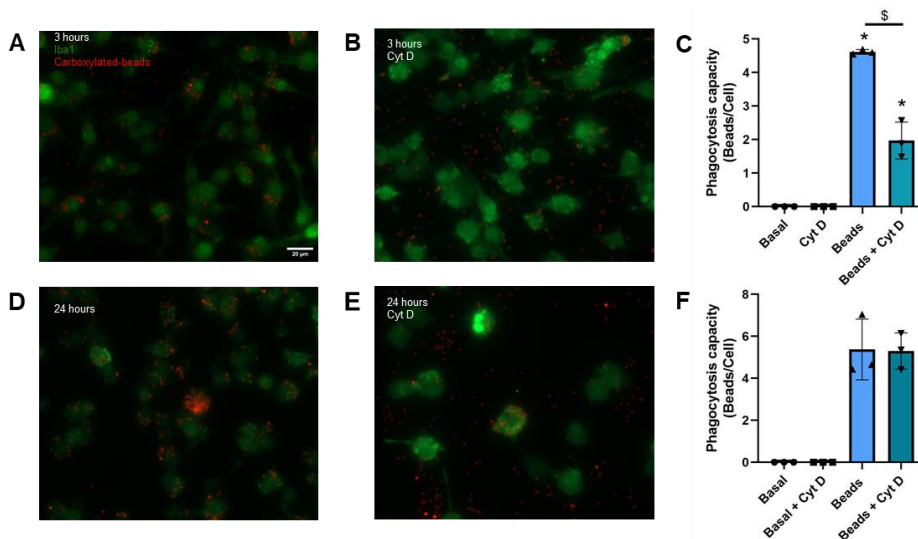
Simultaneously, we asked whether LPS challenge may affect microglial viability. To assess this, we used MTT assay, as shown in **Fig. 3B**. The results were not clear enough but higher concentrations of LPS may affect negatively to cell viability. On-going experiments will confirm any effect that LPS may have on cell viability.



**Figure 3:** Effect of LPS on (A) nitrite production in BV2 cells upon different concentrations of LPS 24 hours and (B) cell viability. Results were calculated as percentage of absorbance vs the basal condition. Each dot represents an independent experiment. All experiments were performed in triplicates. \* p-value < 0.05 vs Basal.

*Microglial phagocytic capacity*

To evaluate the phagocytic capacity of BV2 cells, we carried out an uptake experiment using fluorescent carboxylated-modified beads followed by immunofluorescence assay. We treated BV2 cells with beads for 3 and 24 hours. Representative pictures of cells and quantitative results are shown in **Fig. 4**. In the 3 hour condition we could appreciate a significant increase in uptake that was prevented by CytD. However, despite the increase in uptake in the 24 hour condition, CytD showed no effect. Thus, we need to assess if CytD is losing effect at longer time-points or the increase of fluorescence is due to an artifact. On-going experiments are being developed to assess this issue. Nevertheless, we can confirm that BV2 cells show phagocytic capacity at 3 hours treatment.



**Figure 4:** Phagocytic capacity of BV2 cells. Representative pictures taken at 40x of BV2 cells treated with (A) Beads 3 hrs, (B) Beads + CytD 3 hrs, (D) Beads 24 hrs, (E) Beads + CytD 24 hrs. BV2 cytoplasm is labeled with Iba1, shown in green, and fluorescent beads are shown in red. (C) and (F) represent quantification plots of beads/cell at 3 and 24 hrs respectively. \*p-value < 0.05 vs Basal without Beads. §p-value < 0.05 vs Beads.

**DISCUSSION**

Relation between microglia and neurodegenerative diseases, such as PD, has been extensively studied (Navarro et al., 2021), concluding that dysfunctional microglia contributes to the pathology, although the exact mechanisms remain still elusive. Moreover, the G2019S mutation in the LRRK2 gene (which is highly expressed in immune cells) increases the risk of developing PD. Thus, the aim of this study is to understand the role of LRRK2 in microglial cells.

To do that, we are trying to generate LRRK2-WT and LRRK2-G2019S overexpressing cells. As shown in the Results section, we are in the process of cloning eukaryotic resistances in LRRK2 plasmids. Once we obtain the plasmid, we will generate microglial stable cell lines overexpressing LRRK2-WT and LRRK2-G2019S, via the use of lentivirus generated by HEK293T packaging cells.

In parallel, we are optimizing assays to characterize microglial functionality using BV2 cells. Upon inflammation or damage microglia react inducing iNOS enzyme which produces nitrites, a way to counteract the insult (Verkhatsky et al., 2019). In order to assess this function in the laboratory we have used Griess reaction. We show in this work that the proinflammatory stimulus LPS, component of gram-negative bacteria membrane, produced a significant increase in nitrite production. Our results demonstrate that LPS is capable of activating iNOS, which is key in microglial response to damage situations, such as neurodegeneration. Another important function of microglia is to eliminate pathogens or debris through phagocytosis, helping to maintain brain homeostasis (Verkhatsky et al., 2019). To assess phagocytosis we used carboxylated fluorescent beads. After 24 hours treatment with the beads we observed an increase in uptake that was not prevented by the negative control CytD. Possible explanations are (i) that CytD could be losing its activity after this long treatment or (ii) that beads could be over the cell stick to the membrane instead of being phagocytosed. To identify the reason for these results we could use a confocal microscope in order to distinguish between different layers and find out if the beads are over or inside the cells. However, we decided to perform a shorter treatment of 3 hours. With this condition we observed that the phagocytic capacity of BV2 microglia was significantly higher than the CytD control, demonstrating that BV2 cells have the ability to phagocytose, a process that is essential in microglial activity. This led us to the conclusion that 3 hours is the optimal time condition to use in future experiments. Overall, with our research we are generating resources and assays that will help to understand the role of LRRK2 in microglial functionality.

## CONCLUSIONS

- Treatment with LPS 1 µg/mL for 24 hours increases nitrites production in BV2 cells.
- BV2 microglia shows phagocytic capacity after 3 hours with carboxylated beads.
- On-going experiments aiming to generate BV2 overexpressing LRRK2-WT and LRRK2-G2019S will help to understand the role of LRRK2 on microglial activity.

## BIBLIOGRAPHY

- Lopes, K. de P. et al. (2022). Genetic analysis of the human microglial transcriptome across brain regions, aging and disease pathologies. *Nature Genetics*, 54(1), 4–17.
- Navarro, E. et al. (2021). Dysregulation of mitochondrial and proteolysosomal genes in Parkinson's disease myeloid cells. *Nature Aging*, 1(9), 850–863.
- Poewe, W. et al. (2017). Parkinson disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), 17013.
- Usmani, A. et al. (2021). The Cell Biology of LRRK2 in Parkinson's Disease. *Molecular and Cellular Biology*, 41(5), 1–16.
- Verkhatsky, A. et al. (2019). *Neuroglia in Neurodegenerative Diseases* (Vol. 1175). Springer.
- Zimprich, A. et al. (2004). Mutations in LRRK2 Cause Autosomal-Dominant Parkinsonism with Pleomorphic Pathology. *Neuron*, 44(4), 601–607.

**76984: PAPEL DE TPL2 EN MACRÓFAGOS Y SU RELACIÓN CON EL DESARROLLO DE LA ArLD. ROLE OF TPL2 IN MACROPHAGES AND ITS RELATION WITH THE DEVELOPMENT OF ArLD.****Área de conocimiento:** MEDICINA**Autor(es):** Sara García Fernández**Tutor(es):** Carlos Sanz García**Universidad:** Universidad Complutense de Madrid**Facultad:** Facultad de Ciencias Químicas**Titulación:** Grado en Bioquímica**Formato:** Póster - Investigación básica**Palabras Clave:** Chronic liver disease (CLD), alcohol-related liver disease (ArLD), tumor progression locus 2 (TPL2). Enfermedad hepática crónica (CLD), enfermedad hepática relacionada con el alcohol (ArLD), locus de progresión tumoral 2 (TPL2).

Background: Excessive alcohol consumption is widespread throughout the world and cause serious organ damage. The pathogenesis of alcoholic-related liver disease (ArLD) involves the interaction of several inflammatory signalling pathways. Tumor progression locus 2 (TPL2), is a serine-threonine kinase that functions as a critical regulator of inflammatory pathways by up-regulating production of inflammatory cytokines. This work focused on the role of TPL2 in macrophages and its relation with ArLD. Methods: Both male and female TPL2<sup>fl/fl</sup> and TPL2<sup>Df</sup> (specific deletion of TPL2 in hepatic macrophages) mice were fed a Lieber-DeCarli liquid diet or pair-fed control diet for 25 days. Both histological and molecular biomarkers were examined. Results: The consumption of ethanol diet led to a decrease in the survival rate of the mice, being more acute in TPL2<sup>Df</sup> mice. Although they were not differences in body weight (BW), TPL2<sup>Df</sup> mice had an increased in liver weight (LW) and ratio LW/BW. As expected, alcohol consumption induced the expression of CYP2E1 that was independent of genotype. IHC studies revealed micro steatosis in the liver and loss of gut barrier function in the colon due to alcohol diet. Conclusion: This study has demonstrated the important role of TPL2 in macrophages associated with ArLD and the significance of further research to achieve newer therapies against this CLD.

Antecedentes: El consume excesivo de alcohol está muy extendido en todo el mundo y provoca graves daños en los órganos. La patogenia de la enfermedad hepática asociada a alcohol (ArLD) implica la activación de vías de señalización inflamatorias. El locus de progresión tumoral 2 (TPL2) es una serina-treonina quinasa, regulador crítico de las vías inflamatorias aumentando la producción de citoquinas inflamatorias. Este trabajo se ha centrado en el papel de TPL2 en macrófagos y su relación con la ArLD. Métodos: Se alimentaron a ratones macho y hembra TPL2<sup>fl/fl</sup> y TPL2<sup>Df</sup> (delección específica de TPL2 en macrófagos hepáticos) con una dieta líquida Lieber-DeCarli o una dieta control durante 25 días. Se examinaron biomarcadores histológicos y biomoleculares. Resultados: El consumo de etanol en la dieta provocó una disminución en la tasa de supervivencia de los ratones, siendo más aguda en los ratones TPL2<sup>Df</sup>. Aunque no hubo diferencias en el peso de los ratones (PR), los ratones TPL2<sup>Df</sup> presentaron un aumento en el peso del hígado (PL) y en la relación PL/PR. Como era de esperar, el consumo de alcohol indujo la expresión de CYP2E1 que fue independiente del genotipo. Los estudios de IHC revelaron micro-esteatosis en el hígado y pérdida de la función de la barrera intestinal en el colon debido a la dieta alcohólica. Conclusión: Este estudio ha demostrado el importante papel de TPL2 en los macrófagos asociado con ArLD y el valor de seguir investigando para lograr nuevas terapias contra esta CLD.

**PAPEL DE TPL2 EN MACRÓFAGOS Y SU RELACIÓN CON EL DESARROLLO  
DE LA ArLD**  
**ROLE OF TPL2 IN MACROPHAGES AND ITS RELATION WITH THE  
DEVELOPMENT OF ArLD**

1523704, Sara García Fernández, [sgarci29@ucm.es](mailto:sgarci29@ucm.es).  
Carlos Sanz García, [csanz17@ucm.es](mailto:csanz17@ucm.es).  
Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense.

Background: Excessive alcohol consumption is widespread throughout the world and cause serious organ damage. The pathogenesis of alcoholic-related liver disease (ArLD) involves the interaction of several inflammatory signalling pathways. Tumor progression locus 2 (TPL2), is a serine-threonine kinase that functions as a critical regulator of inflammatory pathways by up-regulating production of inflammatory cytokines. This work focused on the role of TPL2 in macrophages and its relation with ArLD. Methods: Both male and female TPL2<sup>fl/fl</sup> and TPL2<sup>Δφ</sup> (specific deletion of TPL2 in hepatic macrophages) mice were fed a Lieber-DeCarli liquid diet or pair-fed control diet for 25 days. Both histological and molecular biomarkers were examined. Results: The consumption of ethanol diet led to a decrease in the survival rate of the mice, being more acute in TPL2<sup>Δφ</sup> mice. Although they were not differences in body weight (BW), TPL2<sup>Δφ</sup> mice had an increased in liver weight (LW) and ratio LW/BW. As expected, alcohol consumption induced the expression of CYP2E1 that was independent of genotype. IHC studies revealed micro steatosis in the liver and loss of gut barrier function in the colon due to alcohol diet. Conclusion: This study has demonstrated the important role of TPL2 in macrophages associated with ArLD and the significance of further research to achieve newer therapies against this CLD.

**Keywords:** chronic liver disease (CLD), alcohol-related liver disease (ArLD), tumor progression locus 2 (TPL2).

Antecedentes: El consume excesivo de alcohol está muy extendido en todo el mundo y provoca graves daños en los órganos. La patogenia de la enfermedad hepática asociada a alcohol (ArLD) implica la activación de vías de señalización inflamatorias. El locus de progresión tumoral 2 (TPL2) es una serina-treonina quinasa, regulador crítico de las vías inflamatorias aumentando la producción de citoquinas inflamatorias. Este trabajo se ha centrado en el papel de TPL2 en macrófagos y su relación con la ArLD. Métodos: Se alimentaron a ratones macho y hembra TPL2<sup>fl/fl</sup> y TPL2<sup>Δφ</sup> (deleción específica de TPL2 en macrófagos hepáticos) con una dieta líquida Lieber-DeCarli o una dieta control durante 25 días. Se examinaron biomarcadores histológicos y biomoleculares. Resultados: El consumo de etanol en la dieta provocó una disminución en la tasa de supervivencia de los ratones, siendo más aguda en los ratones TPL2<sup>Δφ</sup>. Aunque no hubo diferencias en el peso de los ratones (PR), los ratones TPL2<sup>Δφ</sup> presentaron un aumento en el peso del hígado (PL) y en la relación PL/PR. Como era de esperar, el consumo de alcohol indujo la expresión de CYP2E1 que fue independiente del genotipo. Los estudios de IHC revelaron microesteatosis en el hígado y pérdida de la función de la barrera intestinal en el colon debido a la dieta alcohólica. Conclusión: Este estudio ha demostrado el importante papel de TPL2 en los macrófagos asociado con ArLD y el valor de seguir investigando para lograr nuevas terapias contra esta CLD.

**Palabras clave:** enfermedad hepática crónica (CLD), enfermedad hepática relacionada con el alcohol (ArLD), locus de progresión tumoral 2 (TPL2).



## INTRODUCCIÓN

El consumo excesivo de alcohol está generalizado en todo el mundo y produce graves daños en muchos órganos. En concreto, el consumo de alcohol es uno de los factores más relevantes que contribuyen a la enfermedad hepática crónica (CLD). El desarrollo inicial de la enfermedad hepática relacionada con alcohol (ArLD) está caracterizado por esteatosis hepática (hígado graso) seguido del desarrollo de esteatohepatitis alcohólica. Esta enfermedad puede seguir progresando a los estados irreversibles de fibrosis y cirrosis e incrementar el riesgo de sufrir carcinoma hepatocelular si el consumo de alcohol es continuado (Arab et al., 2023).

Las primeras etapas de la ArLD están caracterizadas por la acumulación lipídica en los hepatocitos y la activación de vías de señalización inflamatorias. Específicamente, el consumo de alcohol produce la entrada masiva de lipopolisacáridos (LPS) al torrente sanguíneo desde el intestino, que activa a las células Kupffer (macrófagos hepáticos) a través del receptor tipo Toll 4 (TLR4). Las quinasas activadas por mitógenos (MAPK), incluyendo quinasas activadas por el receptor extracelular 1/2 (ERK1/2) y la quinasa c-jun-N-terminal (JNK), son esenciales en la señalización de esta respuesta inflamatoria. Estas quinasas convergen en el factor de transcripción NF $\kappa$ B que produce mediadores inflamatorios como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), la interleuquina-6 (IL-6) y la interleuquina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) entre otros (Jardin, 2022).

El locus de progresión tumoral 2 (TPL2), también conocido como Cáncer Tiroideo de Osaka (COT) o MAP3K8, es una serina-treonina quinasa con un papel regulador muy importante en la respuesta inflamatoria inducida por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). TPL2 desempeña un papel clave en el reclutamiento, diferenciación y activación de las células inmunes. Una respuesta masiva a distintos factores de riesgo, como consumo excesivo de etanol, hepatitis viral, drogas u obesidad/diabetes, pueden causar una inflamación, que si no es resuelta, puede evolucionar a estadios más avanzados de la enfermedad hepática como: fibrosis, cirrosis y finalmente a cáncer hepático (Gutierrez et al., 2023) (Njunge et al., 2020).

En los últimos años, se ha relacionado TPL2 con algunos procesos de la respuesta inmune innata. TPL2 hace que las células inmunes innatas produzcan una señal inflamatoria mucho más amplia. A la vez, TPL2 también juega un papel importante en el sistema inmune adaptativo.

En este estudio hemos utilizado ratones TPL2<sup>fl/fl</sup> y TPL2 <sup>$\Delta\phi$</sup>  para investigar el papel de TPL2 en macrófagos y su relación con el desarrollo de la ArLD.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales y dieta

Todos los ratones recibieron cuidados humanos y todos los procedimientos fueron aprobados por la Comunidad de Madrid (CAM) – PROEX 066.1/22. Ratones TPL2<sup>fl/fl</sup> (*wild type*) y TPL2 <sup>$\Delta\phi$</sup>  (*know out* específico en macrófagos hepáticos), con fondo genético C57BL/6, fueron mantenidos en el animalario de biología de la Universidad Complutense de Madrid (UCM). Machos y hembras, entre 8-10 semanas fueron divididos aleatoriamente en dos grupos y los ratones con dieta alcohólica (Lieber-DeCarli) se dejaron con libre acceso a la ingesta de alcohol (F1258SP, Bio-Serv, Madrid, España) que contiene (vol/vol): 1% por 2 días, 2% por 2 días, 4% por una semana, 5% por una semana y 6% por una semana (McCullough et al., 2016). El grupo control fue alimentado con dieta control isocalórica (Bio-Serv, F1259SP, Madrid, España). El



crecimiento de los animales se controló mediante pesaje semanal y la ingesta dietética se evaluó diariamente. Una vez completado el tiempo de estudio, a los ratones se les administró isoflurano para su muerte, se extrajo sangre de la vena cava para parámetros bioquímicos y órganos para su examinación.

Para su genotipado, las colas fueron digeridas con NID buffer y proteinasa K a 64°C. Se llevaron a cabo dos PCRs donde los primers fueron los siguientes: CRE (Mutante Reverse, ACACCGCCTTATTCCAAG; Común, CAA GAA GTC CAC AGG GTG GT y Wild type Reverse, GAAAGACCAAGGGAAGGAG), Flox (loxp3s, GTTTTCACCTGACTGCTCCC; loxp3a, AGCATTTCAGACCATCACC y M3Fb2, ATGGCTTTGTGGGATTGTTGTTCC). Los geles utilizados fueron de agarosa, el de CRE al 1% y el de flox al 2%.

### Inmunohistoquímica

Hígado y colon fueron incluido en parafina y cortados en un microtomo (LEICA RM2125 RTS) a 5 µm de espesor. Muestras de hígado y colon fueron sometidas a tinción con hematoxilina y eosina (H&E). Las fotos fueron tomadas con un microscopio (Nikon, ECLIPSE Ci) con el objetivo 10X y 20X.

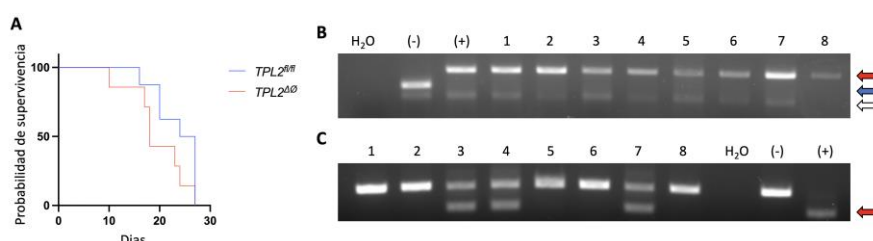
### Aislamiento de proteínas y Western blot

El hígado fue lisado en medio RIPA con inhibidores de proteasas y fosfatasa, y tras su centrifugación, las muestras fueron cuantificadas mediante el método BCA (23227, Thermo, Madrid, España). 40 µg de muestra se corrieron en un gel de poliacrilamida al 10%, se transfirieron a una membrana de PVDF (IPVH00010, Immobilon-P, Madrid, España) y se incubaron con anticuerpos contra: CYP2E1 (ab28146, Abcam, Madrid, España), HSC70 (sc-7298, Santa Cruz, Madrid, España) y GAPDH (MCA4739, Biorad, Madrid, España) fueron utilizados como controles de carga.

## RESULTADOS

### Efecto de la dieta alcohólica en la supervivencia murina

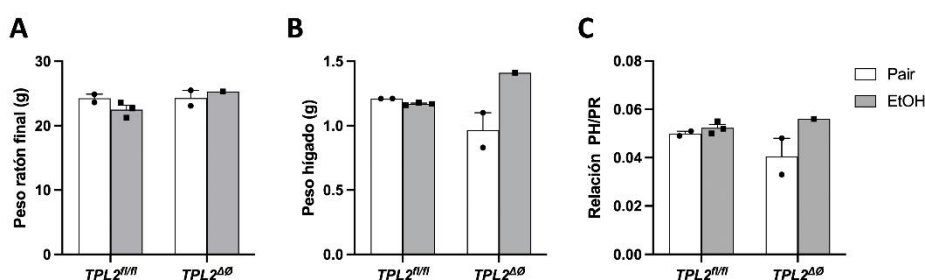
Como era de esperar, los ratones tratados con dieta control mantuvieron el 100% de supervivencia, sin diferencias en el genotipo (datos no mostrados). Sin embargo, los ratones tratados con dieta alcohólica tuvieron una menor tasa de supervivencia (3/8 en ratones TPL2<sup>fl/fl</sup> y 1/7 en ratones TPL2<sup>Δφ</sup>), siendo mucha más acusada en ratones TPL2<sup>Δφ</sup>, con un 14% de supervivencia (**Fig 1A**). Es de notar que los ratones empezaron a morir al final de la semana con 4% vol/vol de alcohol (día 10). A partir de ahora todos los resultados se mostrarán con: n=3 para ratones TPL2<sup>fl/fl</sup> y n=1 para ratones TPL2<sup>Δφ</sup> en el grupo alcohol. Estos resultados indicaron la posible susceptibilidad de la delección de TPL2 en macrófagos en una dieta alcohólica. Para asegurarnos de que este genotipo fue más susceptible, se comprobaron los ratones mediante PCR. Los resultados confirmaron que todos los ratones fueron positivos para TPL2 flox (**Fig 1B** - flecha roja), pero solo los ratones TPL2<sup>Δφ</sup> (muestras 3, 4 y 7) fueron positivos para el gen CRE (**Fig 1C** - flecha roja).



**Figura 1:** Los ratones TPL2 $\Delta\phi$  parecen más susceptibles a dieta alcohólica. Ratones TPL2 $^{fl/fl}$  (n=8) y TPL2 $\Delta\phi$  (n=7) fueron dejados con libre acceso a la ingesta de alcohol por 25 días con un contenido de alcohol (vol/vol): 1% (2d), 2% (2d), 4% (7d), 5% (7d) y 6% (7d). **A)** curva de supervivencia. **B)** genotipado de ratón para TPL2-flox. Flecha roja: ratón Tpl2 $^{fl/fl}$ ; flecha azul: ratón Tpl2; flecha blanca: primers. **C)** genotipado de ratón para CRE. Flecha roja: ratón TPL2 $\Delta\phi$ . (-): control negativo de PCR; (+): control positivo de PCR.

### Estudio de parámetros bioquímicos tras dieta alcohólica

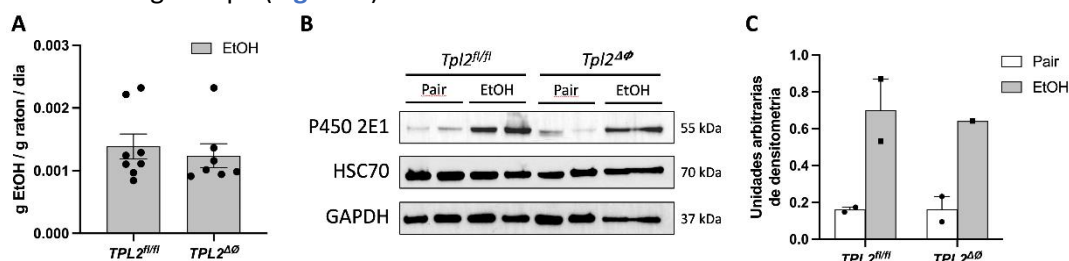
Aunque no existieron diferencias significativas en el peso de los ratones tras la dieta con alcohol (**Fig 2A**), se observa una ligera tendencia en el incremento de peso del hígado del ratón TPL2 $\Delta\phi$  con respecto a los ratones TPL2 $^{fl/fl}$  (**Fig 2B**). A su vez, la relación peso hígado / peso ratón aparece incrementada en los ratones TPL2 $\Delta\phi$ , con un valor más pronunciado tras la dieta con alcohol (**Fig 2C**).



**Figura 2:** Valores paramétricos tras dieta alcohólica. Ratones fueron tratados como en Fig 1. Gráfica del peso final (**A**), peso del hígado (**B**) y de la relación peso del hígado (PH) / peso ratón (PR) (**C**) de los ratones TPL2 $^{fl/fl}$  y TPL2 $\Delta\phi$  alimentados con dieta control y con dieta etanol. Pair, dieta control; EtOH, dieta con etanol. (n=3-1).

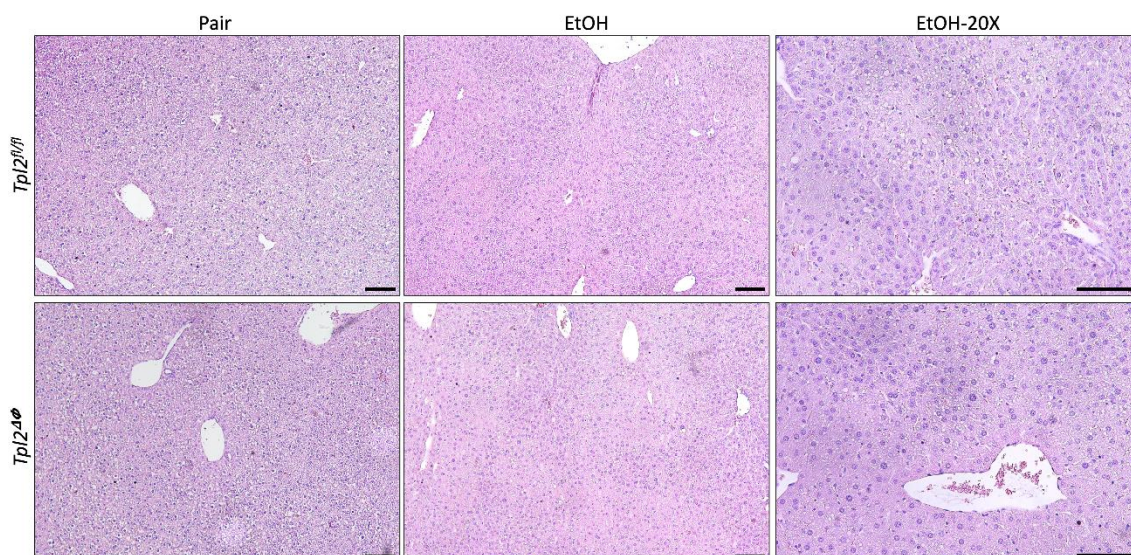
### Efecto de la dieta alcohólica en el metabolismo hepático

La ingesta de alcohol se relaciona con la variación de diferentes parámetros hepáticos. Como obtuvimos una tendencia en el incremento del peso del hígado y la relación peso hígado/peso ratón, quisimos investigar si los ratones tenían diferencias en gramos de alcohol ingeridos por día. Sin embargo, no existieron diferencias significativas entre genotipos (**Fig 3A**). El metabolismo del alcohol en el hígado va asociado a la expresión del citocromo P450 2E1 (CYP2E1), desencadenante de especies reactivas de oxígeno, que finalmente producen daño hepático. Como era de esperar al alcohol incrementó la expresión de CYP2E1, que también fue independiente de genotipo (**Fig 3B-C**).



**Figura 3:** Expresión de parámetros hepáticos asociados a la ingesta de alcohol. Ratones fueron tratados como en Fig 1. **A)** Ingesta de g de EtOH/día/ratón **B)** Expresión de P450 2E1 en muestras de hígado. HSC70 y GAPDH se usaron como controles de carga. **C)** Cuantificación de la expresión de P450 2E1. Pair, dieta control; EtOH, dieta con etanol. (n=3-1).

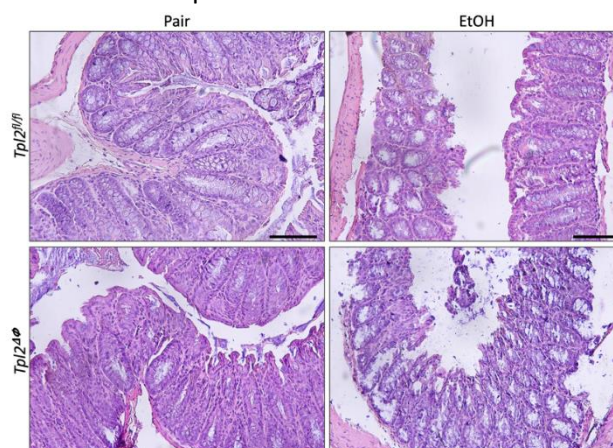
Otro claro marcador de la dieta alcohólica es la micro esteatosis hepática. Las tinciones con H&E de los hígados demostraron la deposición de grasa en los ratones alimentados con alcohol en comparación a los ratones control, que fue más evidente en ratones TPL2 $^{fl/fl}$  (**Fig4**). Además, los ratones TPL2 $^{fl/fl}$  parecen tener una mayor infiltración inmune, por el aumento de células de menor tamaño que los hepatocitos y con morfología muy indicativa de células que no pertenecen al parénquima (NPC).



**Figura 4:** Esteatosis hepática asociada a la dieta alcohólica estaba reducida en ratones TPL2<sup>ΔΔ</sup>. Ratones fueron tratados como en Fig 1. Tinciones de H&E hepáticas fueron hechas y se tomaron fotos con objetivos 10X y 20X (donde se indica). Barra: 50 μm (10X) y 100 μm (20X).

### Estudio de la integridad de la barrera intestinal asociada a la ingesta de alcohol

Las tinciones con H&E de los intestinos, concretamente del colón, demostraron que el colón de los ratones alimentados con dieta alcohólica mostró un descenso en células caliciformes, lo que conllevaba a una parcial destrucción de este en ambos genotipos (Fig5).



**Figura 5:** Pérdida de la barrera intestinal asociada a la dieta alcohólica. Ratones fueron tratados como en Fig 1. Tinciones de H&E intestinales fueron hechas y se tomaron fotos con objetivos 20X. Barra: 100 μm (20X).

### DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

El daño que produce el consumo de alcohol en el hígado ha sido muy estudiado. Sin embargo, los mecanismos moleculares exactos detrás de esta lesión aún no se han dilucidado por completo. TPL2 es una quinasa que juega un papel importante en distintos tipos de cánceres y enfermedades mediante su relación con la activación de la inflamación, aunque la relación de ésta con la ArLD todavía no ha sido estudiada en profundidad.

En este estudio se analiza el efecto del consumo de alcohol y de la delección específica de TPL2 en macrófagos hepáticos. Se observó que los ratones que fueron alimentados con una dieta alcohólica tuvieron un porcentaje de supervivencia mucho menor que los que se alimentaron con la dieta control. La dieta utilizada es una dieta puesta a punto y estandarizada en el mundo de la investigación por laboratorios que trabajan con ArLD (Guo et al., 2018); sin embargo, nuestros resultados mostraron muerte de individuos incluso en ratones TPL2<sup>fl/fl</sup>

(nuestros ratones “wild type”). La generación de nuevas cepas de ratones puede estar asociada a alteraciones de órganos o del metabolismo, lo que podría explicar que incluso los ratones TPL2<sup>fl/fl</sup> murieran. Para ello, actualmente se están haciendo controles parentales de los que se originaron estas cepas con dieta alcohólica para comprobar la resistencia de estos ratones al alcohol.

El consumo de alcohol va directamente asociado a cambios en la fisiopatología del hígado. Aunque la ingesta diaria de alcohol no fue diferente entre genotipos, hubo un incremento en el peso del hígado y en la relación peso hígado / peso ratón. Evidentemente, más experimentos se deben de llevar a cabo para poder corroborar estos resultados puesto que con un individuo por grupo, no es realizar cálculos de significancia. Sin embargo, datos no publicados de nuestro laboratorio muestran una correlación entre el aumento del peso del hígado y de la relación peso hígado / peso ratón con un aumento del daño hepático. La deposición de grasa en el hígado es un claro marcador en pacientes con ArLD, y como era de esperar, ambos genotipos obtuvieron un incremento en la deposición de triglicéridos hepáticos.

Hay muchos estudios donde se relaciona la expresión de CYP2E1 con el consumo de alcohol (Cederbaum et al., 2012). CYP450 2E1 es una proteína de la familia P450 implicada en el metabolismo de xenobióticos entre los que se encuentra el etanol. En diversos estudios se ha demostrado que el consumo de etanol induce una mayor expresión de esta proteína. Así, los ratones alimentados con dieta alcohólica mostraron mayores expresiones de CYP2E1 que los ratones control, sin diferencias significativas entre genotipos.

Finalmente, el eje hígado-intestino está siendo muy investigado en los últimos años por su importancia con la microbiota y la integridad de la barrera intestinal (Milosevic et al., 2019). El aumento en la permeabilidad del intestino permite la translocación de material bacteriano procedente de la microbiota al torrente sanguíneo, y su transporte hasta el hígado. El alcohol no solo modifica la microbiota del huésped, sino que también altera la fisiología intestinal. Datos del colón de los ratones alimentados con dieta alcohólica mostraron un descenso en células calciformes, lo que conllevaba a una parcial destrucción del colón en ambos genotipos.

Aunque son necesarios más estudios para aclarar el papel que tiene TPL2 en la progresión de la enfermedad hepática y su papel en macrófagos hepáticos, este estudio proporciona claros incididos de la estrecha relación entre inflamación y daño hepático y como TPL2 podría ser una diana farmacológica de interés para futuros tratamientos en diversas enfermedades como la ArLD.

## BIBLIOGRAFÍA

- Arab, J. P. et al. (2023). "Alcohol-associated liver disease: integrated management with alcohol use disorder". *Clin Gastroenterol Hepatol*.
- Cederbaum, A. I. et al. (2012). CYP2E1 Sensitizes the Liver to LPS- and TNF alpha-Induced Toxicity via Elevated Oxidative and Nitrosative Stress and Activation of ASK-1 and JNK Mitogen-Activated Kinases. *Int J Hepatol*, 582790.
- Guo, F. et al. (2018). The Lieber-DeCarli Diet-A Flagship Model for Experimental Alcoholic Liver Disease. *Alcohol Clin Exp Res*, 42(10), 1828-1840.
- Gutierrez, A. H. et al. (2023). Tumor progression locus 2 (TPL2): A Cot-plicated progression from inflammation to chronic liver disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1869(4), 166660.
- Jardin, F. (2022). NFkB Pathway and Hodgkin Lymphoma. *Biomedicines*, 10(9).
- McCullough, R. L. et al. (2016). Differential contribution of complement receptor C5aR in myeloid and non-myeloid cells in chronic ethanol-induced liver injury in mice. *Mol Immunol*, 75, 122-132.
- Milosevic, I. et al. (2019). Gut-Liver Axis, Gut Microbiota, and Its Modulation in the Management of Liver Diseases: A Review of the Literature. *Int J Mol Sci*, 20(2).
- Njunge, L. W. et al. (2020). Tumor progression locus 2 (TPL2) in tumor-promoting Inflammation, Tumorigenesis and Tumor Immunity. *Theranostics*, 10(18), 8343-8364.



**76329: VÍA VISUAL Y ENFERMEDAD DE ALZHEIMER // VISUAL PATHWAY AND ALZHEIMER'S DISEASE****Área de conocimiento:** MEDICINA**Autor(es):** MARIA ALVAREZ GUTIERREZ**Tutor(es):** JOSÉ MANUEL RAMÍREZ SEBASTIÁN, INÉS LÓPEZ CUENCA**Universidad:** UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**Facultad:** FACULTAD DE MEDICINA**Titulación:** Grado en Medicina**Formato:** Comunicación Oral - Investigación clínica**Palabras Clave:** Alzheimer; ApoE  $\epsilon$ 4; Tomografía de coherencia óptica; agudeza visual; sensibilidad al contraste //  
**Keywords:** Alzheimer; ApoE  $\epsilon$ 4; Optical Coherence Tomography; Visual Acuity; Contrast sensitivity

La historia familiar (HF+) de enfermedad de Alzheimer (EA) y ser portador de al menos un alelo  $\epsilon$ 4 para el gen ApoE (ApoE  $\epsilon$ 4+) constituyen los factores de riesgo genéticos más relevantes para el desarrollo de la enfermedad. Se han documentado cambios visuales estructurales y funcionales en etapas preclínicas de la misma. Por tanto, el objetivo de este trabajo es identificar los posibles cambios oculares en sujetos que tienen alto riesgo genético para el desarrollo de EA (HF+ ApoE  $\epsilon$ 4+) y si estos cambios evolucionan a lo largo de 27 meses.

Se realizó una revisión oftalmológica completa incluyendo: análisis estructural de la retina mediante tomografía de coherencia óptica (OCT) y análisis de la función visual mediante la evaluación de la agudeza visual (AV) y la sensibilidad al contraste (SC) a 95 sujetos. Para el análisis estructural y funcional de la vía visual, los sujetos se dividieron en dos grupos de estudio (HF+ ApoE  $\epsilon$ 4+) y el grupo control (HF- ApoE  $\epsilon$ 4-).

A los 27 meses, al comparar el grupo HF+ ApoE  $\epsilon$ 4+ frente al grupo HF- ApoE  $\epsilon$ 4-, se observa que los cambios progresaban en la capa nuclear interna. En este mismo grupo, FH+ ApoE  $\epsilon$ 4+, no se observa progresión de los cambios en la función visual, pero, cuando se compara con el grupo HF- ApoE  $\epsilon$ 4- a los 27 meses, el aumento de la AV y la SC se mantiene en 3 y 12 ciclos por grado como ya se observó durante la primera visita.

En conclusión, los cambios estructurales progresan a los 27 meses de seguimiento, sin embargo, los cambios funcionales detectados permanecen estables. Estos cambios oculares podrían ser nuevos biomarcadores para el diagnóstico precoz de la EA.

Family history (FH+) of Alzheimer's disease (AD) and being carrier of at least one  $\epsilon$ 4 allele for the ApoE gene (ApoE  $\epsilon$ 4+) are two of the most relevant genetic risk factors for the development of the disease. Structural and functional visual changes have been documented in preclinical stages of this illness. Therefore, the objective of this investigation is identifying possible ocular changes in subjects with high genetic risk for the development of AD (FH+ ApoE  $\epsilon$ 4+) and whether these changes evolve over 27 months.

A complete ophthalmological review was performed on 95 subjects, including: structural analysis of the retina by optical coherence tomography (OCT) and analysis of visual function by evaluating visual acuity (VA) and contrast sensitivity (CS). For the structural and functional analysis of the visual pathway, the subjects were divided into two study groups (FH+ ApoE  $\epsilon$ 4+) and the control group (FH- ApoE  $\epsilon$ 4-).

At 27 months, when comparing the FH+ ApoE  $\epsilon$ 4+ group versus the FH- ApoE  $\epsilon$ 4- group, it was observed that the changes progressed in the inner nuclear layer. In this same group, FH+ ApoE  $\epsilon$ 4+, no progression of changes in visual function was observed, but when compared with the HF- ApoE  $\epsilon$ 4- group at 27 months, the increase in VA and CS remained at 3 and 12 cycles per grade as was already decreased during the first visit.

In conclusion, the structural changes progress at 27 months of follow-up, however, the functional changes detected will remain stable. These ocular changes could be new biomarkers for the early diagnosis of AD.

## **Análisis longitudinal visual en sujetos de alto riesgo genético para el desarrollo de Alzheimer**

### ***Visual longitudinal analysis in subjects at high genetic risk for the development of Alzheimer's disease***

Nº Identificador 1510816, María Álvarez Gutiérrez, [maralv25@ucm.es](mailto:maralv25@ucm.es)

Tutor1: José Manuel Ramírez Sebastián, [ramirezs@med.ucm.es](mailto:ramirezs@med.ucm.es)

Tutor2: Inés López Cuenca, [inelopez@med.ucm.es](mailto:inelopez@med.ucm.es)

Instituto de Investigaciones Oftalmológicas Ramón Castroviejo, Facultad de Medicina,  
Universidad Complutense de Madrid

#### **RESUMEN**

La historia familiar (HF+) de enfermedad de Alzheimer (EA) y ser portador de al menos un alelo  $\epsilon 4$  para el gen ApoE (ApoE  $\epsilon 4+$ ) constituyen los factores de riesgo genéticos más relevantes para el desarrollo de la enfermedad. Se han documentado cambios visuales estructurales y funcionales en etapas preclínicas de la misma. Por tanto, el objetivo de este trabajo es identificar los posibles cambios oculares en sujetos que tienen alto riesgo genético para el desarrollo de EA (HF+ ApoE  $\epsilon 4+$ ) y si estos cambios evolucionan a lo largo de 27 meses.

Se realizó una revisión oftalmológica completa incluyendo: análisis estructural de la retina mediante tomografía de coherencia óptica (OCT) y análisis de la función visual mediante la evaluación de la agudeza visual (AV) y la sensibilidad al contraste (SC) a 95 sujetos. Para el análisis estructural y funcional de la vía visual, los sujetos se dividieron en dos grupos de estudio (HF+ ApoE  $\epsilon 4+$ ) y el grupo control (HF- ApoE  $\epsilon 4-$ ).

A los 27 meses, al comparar el grupo HF+ ApoE  $\epsilon 4+$  frente al grupo HF- ApoE  $\epsilon 4-$ , se observa que los cambios progresaban en la capa nuclear interna. En este mismo grupo, HF+ ApoE  $\epsilon 4+$ , no se observa progresión de los cambios en la función visual, pero, cuando se compara con el grupo HF- ApoE  $\epsilon 4-$  a los 27 meses, el aumento de la AV y la SC se mantiene en 3 y 12 ciclos por grado como ya se observó durante la primera visita.

En conclusión, los cambios estructurales progresan a los 27 meses de seguimiento, sin embargo, los cambios funcionales detectados permanecen estables. Estos cambios oculares podrían ser nuevos biomarcadores para el diagnóstico precoz de la EA.

#### **ABSTRACT**

Family history (FH+) of Alzheimer's disease (AD) and being carrier of at least one  $\epsilon 4$  allele for the ApoE gene (ApoE  $\epsilon 4+$ ) are two of the most relevant genetic risk factors for the development of the disease. Structural and functional visual changes have been documented in preclinical stages of this illness. Therefore, the objective of this investigation is identifying possible ocular changes in subjects with high genetic risk for the development of AD (FH+ ApoE  $\epsilon 4+$ ) and whether these changes evolve over 27 months.

A complete ophthalmological review was performed on 95 subjects, including: structural analysis of the retina by optical coherence tomography (OCT) and analysis of visual function by evaluating visual acuity (VA) and contrast sensitivity (CS). For the structural and functional

analysis of the visual pathway, the subjects were divided into two study groups (FH+ ApoE  $\epsilon$ 4+) and the control group (FH- ApoE  $\epsilon$ 4-).

At 27 months, when comparing the FH+ ApoE  $\epsilon$ 4+ group versus the FH- ApoE  $\epsilon$ 4- group, it was observed that the changes progressed in the inner nuclear layer. In this same group, FH+ ApoE  $\epsilon$ 4+, no progression of changes in visual function was observed, but when compared with the HF- ApoE  $\epsilon$ 4- group at 27 months, the increase in VA and CS remained at 3 and 12 cycles per grade as was already decreased during the first visit.

In conclusion, the structural changes progress at 27 months of follow-up, however, the functional changes detected will remain stable. These ocular changes could be new biomarkers for the early diagnosis of AD.

**PALABRAS CLAVE:** Alzheimer; ApoE  $\epsilon$ 4; Tomografía de coherencia óptica; agudeza visual; sensibilidad al contraste

**KEYWORDS:** Alzheimer; ApoE  $\epsilon$ 4; Optical Coherence Tomography; Visual Acuity; Contrast sensitivity

## INTRODUCCIÓN

La EA se considera un trastorno multifactorial, siendo la edad el factor de riesgo con mayor impacto en su patogénesis, con formas familiares y esporádicas, siendo estas últimas las mayoritarias (Mayeux, 2003). Además del envejecimiento, en la EA esporádica existen dos factores de riesgo con relevancia clínica: la agregación familiar y ser portador del alelo  $\epsilon 4$  para el gen ApoE (Huang et al., 2004). El riesgo de padecer EA en personas con un antecedente familiar de primer grado de la enfermedad se ve incrementado de cuatro a diez veces (Silverman et al., 2005), mientras que los portadores del alelo ApoE  $\epsilon 4$  experimentan un riesgo tres veces superior en heterocigosis y quince veces superior en homocigosis (Blennow et al., 2006).

A nivel microscópico, las lesiones características de la EA son las placas seniles, formadas por agregados extracelulares de péptido beta-amiloide ( $A\beta$ ), y los ovillos neurofibrilares, constituidos por el acúmulo intracelular de proteína Tau hiperfosforilada (Blennow et al., 2006). La positividad de estos biomarcadores en una etapa previa a la aparición de los síntomas iniciales característicos de esta enfermedad refuerza el concepto de la EA como un continuo y plantea la posibilidad de un diagnóstico anterior a la expresión clínica (Dubois et al., 2016).

Se ha desarrollado una nueva área de investigación dirigida a la detección de alteraciones anatómicas y funcionales de la retina para el diagnóstico y la valoración de la evolución de la EA (Koronyo et al., 2017). En consecuencia, a través de diversos estudios, en sujetos con alto riesgo genético de padecer EA se han identificado alteraciones en el grosor de determinadas capas de la retina medidas mediante la tomografía de coherencia óptica (OCT) (López-Cuenca et al., 2020) (Kromer et al., 2014) que se han correlacionado con áreas cerebrales implicadas en la patogenia de la EA, incluyendo la corteza entorrinal, el hipocampo y el *gyrus lingual* (López-Cuenca et al., 2022)

Estas diferencias estructurales retinianas están acompañadas por alteraciones funcionales en la agudeza visual, la sensibilidad al contraste (Salobar-García et al., 2019), habiéndose documentado concretamente la existencia de una mayor agudeza visual que se correlaciona con la función electrofisiológica cerebral en individuos con alto riesgo genético para EA con respecto a sujetos sin estos condicionantes (López-Cuenca et al., 2023).

## MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo de investigación es un estudio observacional, descriptivo y longitudinal. Forma parte de un proyecto multicéntrico titulado: “Caracterización cognitiva y neurofisiológica de sujetos de alto riesgo para el desarrollo de demencia: un estudio multidimensional”, con acrónimo (COGDEM). Se ha llevado a cabo en el Hospital Clínico San Carlos, el Centro de Tecnología Biomédica y el Instituto de Investigaciones Oftalmológicas Ramón Castroviejo de la Universidad Complutense de Madrid. Esta investigación se rige por los principios de la Declaración de Helsinki y ha sido autorizada por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico San Carlos, con números internos 15/382-E\_BS y 18/422-E\_BS. Todos los participantes del presente estudio han prestado su consentimiento informado por escrito.

Todos los sujetos que forman parte del estudio cumplen los siguientes criterios de inclusión: ausencia de patología cognitiva, puntuación del MMSE igual o superior a 26, PIO < 20 mmHg, ausencia de patología ocular y ausencia de malformaciones oculares congénitas. Entre los



criterios de exclusión se encontraban: tener una agudeza visual inferior a 0,6, la presencia de error refractivo esferocilíndrico superior a  $\pm 5$  dioptrías y padecer glaucoma o sospecha de este.

Para la caracterización estructural de la retina mediante OCT se empleó la Spectralis OCT de Heilderberg siguiendo el protocolo previamente descrito por López-Cuenca et al (López-Cuenca et al., 2020). Se analizaron todas las capas de la retina y las medidas fueron corregidas manualmente por el mismo experto. Las medidas fueron expresadas en micras. Se incluyeron aquellas imágenes con una media de 16 B-scan y una relación señal-ruido mínima de 25.

Debido a los cambios fisiológicos que acontecen en la vía visual durante el envejecimiento (O'Bryhim et al., 2018), la función visual se analizó en aquellos sujetos con edades comprendidas entre los 40 y 60 años. A su vez, este conjunto se subdivide en función de la presencia o ausencia de HF. Además, en el presente estudio se realizó un genotipado para el alelo ApoE mediante una muestra de sangre periférica, lo que permitió establecer una nueva clasificación dentro de los subgrupos previamente descritos (López-Cuenca et al., 2020).

En cuanto a los test psicofísicos usados: para la medida de la AV se empleó el test de Snellen, registrándose la mejor medida monocular de la AV corregida. Mientras que para la medida de la SC se utilizó el sistema *CSV-1000E system*, siempre con la mejor corrección posible de la AV para la visión lejana y teniendo en cuenta las recomendaciones del fabricante en cuanto a la distancia y la iluminación de la sala. Se analizaron cuatro frecuencias espaciales (3, 6, 12, 18 ciclos por grado).

Los resultados se analizaron con el programa SPSS 27.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) y se presentaron en forma de mediana (con su correspondiente rango intercuartílico) y media  $\pm$  desviación estándar. Se emplearon los siguientes tests: chi cuadrado en variables cualitativas, el test de Wilcoxon para hacer la comparación entre la visita baseline y la visita follow-up dentro de un mismo grupo de estudio y el test de Mann-Whitney U entre grupos. Se considera un valor  $< 0,05$  estadísticamente significativa. El grado de significación se indica con \*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,01$ .

## **RESULTADOS**

### **Análisis longitudinal de la OCT**

Comparando entre la primera visita y los 27 meses, el grupo HF- ApoE  $\epsilon 4$ - mostró cambios de grosor estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ) en diferentes sectores de: la retina total, capa de fibras nerviosas de la retina (CFNR), capa de células ganglionares de la retina (CCGR), capa plexiforme interna (CPI), capa nuclear interna (CNI) y capa plexiforme externa (CPE).

Al analizar longitudinalmente el grupo HF+ ApoE  $\epsilon 4$ +, se hallan diferencias de grosor estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en todas las capas de la retina excepto: la CPE, la capa nuclear externa (CNE) y el epitelio pigmentario de la retina (EPR).

A los 27 meses entre el grupo HF- ApoE  $\epsilon 4$ - y HF+ ApoE  $\epsilon 4$ + se encuentra un adelgazamiento de grosor estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) en el sector foveal y temporal interno de la CNI.

### **Análisis Longitudinal de los test psicofísicos:**

Los únicos cambios estadísticamente significativos encontrados fueron en el grupo de HF+ ApoE  $\epsilon$ 4+ cuando se compara con el grupo HF- ApoE  $\epsilon$ 4- a los 27 meses, donde los sujetos con alto riesgo presentan un aumento de la agudeza visual estadísticamente significativo ( $P < 0,05$ ) ( $1.077 \pm 0.148$ ) vs ( $0.933 \pm 0.070$ ) y en la sensibilidad al contraste a los 3 y 12 ciclos por grado ( $1.845 \pm 0.176$ ) vs ( $1.731 \pm 0.148$ ) y ( $1.708 \pm 0.181$ ) vs ( $1.511 \pm 0.142$ ), respectivamente.

### **DISCUSIÓN**

La mayor parte de los cambios con significación estadística se observaron a los 27 meses en el grupo de HF+ ApoE  $\epsilon$ 4+ en comparación con los del grupo HF- ApoE  $\epsilon$ 4-. Se encontraron variaciones de grosor retiniano que pueden ser debidos a un proceso normal de envejecimiento de la retina, (Kanai et al., 2002) (Alamouti & Funk, 2003). La retina es un tejido vivo que se encuentra en constante cambio, existiendo, por tanto, modificaciones en su grosor (Ramirez et al., 2017)

Al comparar entre los grupos de HF- ApoE  $\epsilon$ 4- y el grupo HF+ ApoE  $\epsilon$ 4+ a los 27 meses, los cambios con significación estadística aparecen en la CNI. En la primera visita los cambios se dieron mayoritariamente en la CPI, la cual contiene las conexiones sinápticas entre amacrinas, bipolares y ganglionares (López-Cuenca et al., 2020). Esto probablemente se deba a que existen procesos neuroinflamatorios en los cuales la microglía realiza fenómenos de *stripping* (desconexión de las sinapsis anómalas) adelgazándose esta capa. En la segunda visita, los adelgazamientos significativos se encontraron en la CNI, posiblemente por la muerte de alguna de estas células que comenzaron a desconectarse hace 27 meses (de Hoz et al., 2013) (de Hoz et al., 2018)

Cuando comparamos los valores funcionales de la segunda visita entre el grupo de mayor y menor riesgo, encontramos que el grupo de HF+ ApoE  $\epsilon$ 4+ 40-60 presentaba una AV y una SC en las frecuencias espaciales de 3 y 12 cpd estadísticamente superior ( $p < 0,05$ ) a la del grupo HF- ApoE  $\epsilon$ 4- 40-60. Estos hallazgos ya se observaron durante la primera evaluación, por lo que los cambios funcionales se mantienen estables a los 27 meses. Esto apuntaría a una hiperactivación temprana del sistema visual, que puede estar asociada a un mecanismo compensatorio, o a un mal funcionamiento de este (López-Cuenca et al., 2023)

### **CONCLUSIONES**

En sujetos con alto riesgo genético para el desarrollo de la EA, a los 27 meses de seguimiento, persisten los cambios estructurales en la CNI de la retina y se mantienen los cambios funcionales encontrados en la AV y la SC. Estas pruebas visuales podrían constituir un nuevo biomarcador precoz en el diagnóstico y seguimiento de sujetos con alto riesgo para el desarrollo de EA.

### **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Alamouti, B., & Funk, J. (2003). Retinal thickness decreases with age: An OCT study. *British Journal of Ophthalmology*, 87(7), 899–901. <https://doi.org/10.1136/bjo.87.7.899>
- Blennow, K., de Leon, M. J., & Zetterberg, H. (2006). Alzheimer's disease. *Lancet*, 368(9533), 387–403. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69113-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69113-7)

- de Hoz, R., Gallego, B. I., Ramírez, A. I., Rojas, B., Salazar, J. J., Valiente-Soriano, F. J., Avilés-Trigueros, M., Villegas-Perez, M. P., Vidal-Sanz, M., Triviño, A., & Ramírez, J. M. (2013). Rod-Like Microglia Are Restricted to Eyes with Laser-Induced Ocular Hypertension but Absent from the Microglial Changes in the Contralateral Untreated Eye. *PLoS ONE*, *8*(12), e83733. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083733>
- de Hoz, R., Ramírez, A. I., González-Martín, R., Ajoy, D., Rojas, B., Salobar-Garcia, E., Valiente-Soriano, F. J., Avilés-Trigueros, M., Villegas-Pérez, M. P., Vidal-Sanz, M., Triviño, A., Ramírez, J. M., & Salazar, J. J. (2018). Bilateral early activation of retinal microglial cells in a mouse model of unilateral laser-induced experimental ocular hypertension. *Experimental Eye Research*, *171*, 12–29. <https://doi.org/10.1016/j.EXER.2018.03.006>
- Dubois, B., Hampel, H., Feldman, H. H., Scheltens, P., Aisen, P., Andrieu, S., Bakardjian, H., Benali, H., Bertram, L., Blennow, K., Broich, K., Cavado, E., Crutch, S., Dartigues, J. F., Duyckaerts, C., Epelbaum, S., Frisoni, G. B., Gauthier, S., Genthon, R., ... Jack, C. R. (2016). Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria. In *Alzheimer's and Dementia* (Vol. 12, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.02.002>
- Huang, W., Qiu, C., von Strauss, E., Winblad, B., & Fratiglioni, L. (2004). Genotype, Family History of Dementia, and Alzheimer Disease Risk. *Arch Neurol.*, *61*(12), 1930–1934.
- Kanai, K., Abe, T., Murayama, K., & Yoneya, S. (2002). [Retinal thickness and changes with age]. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*, *106*(3), 162–165. <http://europepmc.org/abstract/MED/11925953>
- Koronyo, Y., Biggs, D., Barron, E., Boyer, D. S., Pearlman, J. A., Au, W. J., Kile, S. J., Blanco, A., Fuchs, D. T., Ashfaq, A., Frautschy, S., Cole, G. M., Miller, C. A., Hinton, D. R., Verdooner, S. R., Black, K. L., & Koronyo-Hamaoui, M. (2017). Retinal amyloid pathology and proof-of-concept imaging trial in Alzheimer's disease. *JCI Insight*, *2*(16). <https://doi.org/10.1172/JCI.INSIGHT.93621>
- Kromer, R., Serbecic, N., Hausner, L., Froelich, L., Aboul-Enein, F., & Beutelspacher, S. C. (2014). Detection of retinal nerve fiber layer defects in Alzheimer's disease using SD-OCT. *Frontiers in Psychiatry*, *5*(FEB). <https://doi.org/10.3389/FPSYT.2014.00022>
- López-Cuenca, I., de Hoz, R., Salobar-García, E., Elvira-Hurtado, L., Rojas, P., Fernández-Albarral, J. A., Barabash, A., Salazar, J. J., Ramírez, A. I., & Ramírez, J. M. (2020). Macular Thickness Decrease in Asymptomatic Subjects at High Genetic Risk of Developing Alzheimer's Disease: An OCT Study. *Journal of Clinical Medicine*, *9*(6), 1728. <https://doi.org/10.3390/jcm9061728>
- López-Cuenca, I., Marcos-Dolado, A., Yus-Fuertes, M., Salobar-García, E., Elvira-Hurtado, L., Fernández-Albarral, J. A., Salazar, J. J., Ramírez, A. I., Sánchez-Puebla, L., Fuentes-Ferrer, M. E., Barabash, A., Ramírez-Toraño, F., Gil-Martínez, L., Arrazola-García, J., Gil, P., de Hoz, R., & Ramírez, J. M. (2022). The relationship between retinal layers and brain areas in asymptomatic first-degree relatives of sporadic forms of Alzheimer's disease: an exploratory analysis. *Alzheimer's Research and Therapy*, *14*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s13195-022-01008-5>
- López-Cuenca, I., Nebreda, A., García-Colomo, A., Salobar-García, E., de Frutos-Lucas, J., Bruña, R., Ramírez, A. I., Ramírez-Toraño, F., Salazar, J. J., Barabash, A., Gil, P., Maestú, F., Ramírez, J. M., & de Hoz, R. (2023). Early visual alterations in individuals at-risk of

- Alzheimer's disease: a multidisciplinary approach. *Alzheimer's Research & Therapy*, 15(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13195-023-01166-0>
- Mayeux, R. (2003). Epidemiology of neurodegeneration. *Annual Review of Neuroscience*, 26, 81–104. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.26.043002.094919>
- O'Bryhim, B. E., Apte, R. S., Kung, N., Coble, D., & van Stavern, G. P. (2018). Association of Preclinical Alzheimer Disease with Optical Coherence Tomographic Angiography Findings. *JAMA Ophthalmology*, 136(11), 1242–1248. <https://doi.org/10.1001/JAMAOPHTHALMOL.2018.3556>
- Ramírez, A. I., de Hoz, R., Salobar-García, E., Salazar, J. J., Rojas, B., Ajoy, D., López-Cuenca, I., Rojas, P., Triviño, A., & Ramírez, J. M. (2017). The role of microglia in retinal neurodegeneration: Alzheimer's disease, Parkinson, and glaucoma. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 9(JUL), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00214>
- Salobar-García, E., de Hoz, R., Ramírez, A. I., López-Cuenca, I., Rojas, P., Vazirani, R., Amarante, C., Yubero, R., Gil, P., Pinazo-Durán, M. D., Salazar, J. J., & Ramírez, J. M. (2019). Changes in visual function and retinal structure in the progression of Alzheimer's disease. *PLoS ONE*, 14(8), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220535>
- Silverman, J. M., Ciresi, G., Smith, C. J., Marin, D. B., & Schnaider-Beeri, M. (2005). Variability of familial risk of Alzheimer disease across the late life span. *Archives of General Psychiatry*, 62(5), 565–573. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.62.5.565>

**76877: Hidatidosis en Turkana: un estudio epidemiológico de una Enfermedad Tropical Desatendida/ Hydatidosis in Turkana: an epidemiological study of a neglected tropical disease****Área de conocimiento:** MEDICINA**Autor(es):** Adela Querencias Martinez, Ester García Gracia, Pablo Nistal Moreira**Tutor(es):** María Francisca Colom Valiente, Carmen Hernández Pérez**Universidad:** Universidad Complutense de Madrid**Facultad:** Facultad de Medicina**Titulación:** Grado en Medicina**Formato:** Comunicación Oral - Investigación clínica**Palabras Clave:** Hidatidosis, Turkana, factores de riesgo/ Hydatidosis, Turkana, Risk factors.**RESUMEN**

La hidatidosis es una Enfermedades Desatendidas Tropicales, siendo Turkana uno de los lugares con mayor prevalencia del mundo. El objetivo del estudio es conocer la epidemiología y los factores de riesgo asociados a esta patología, para poder llevar a cabo medidas preventivas, así como un diagnóstico precoz y un tratamiento adecuado. Se ha realizado un estudio prospectivo descriptivo observacional acerca de los datos recopilados en la campaña de 2023 de Cirugía en Turkana. Destaca la elevada prevalencia de la enfermedad así como su relación con el contacto con animales y sus vísceras. La localización más afectada fue el hígado (30%) y los síntomas más referidos la cefalea (60%), dolor abdominal (55%), tos (60%). A raíz del estudio se puede concluir que esta patología supone un reto de abordaje, no solo por la necesidad de prevención multidisciplinar sino también por la obligación de un diagnóstico precoz para poder realizar un tratamiento adecuado a las condiciones del medio.

**ABSTRACT**

Hydatidosis is part of the Neglected Tropical Diseases, being Turkana one of the places with the highest prevalence in the world. The aim of this study is to understand the epidemiology and risk factors associated with this pathology, in order to carry out preventive measures, as well as early diagnosis and appropriate treatment. A prospective observational descriptive study was performed with the data collected in the 2023 Surgery In Turkana campaign. It highlights the high prevalence of the disease as well as its relationship with animals and their viscera. The most affected site was the liver (30%) and the most referred symptoms were headache (60%), abdominal pain (55%) and cough (60%). As a result of the study it can be concluded that this pathology is a challenge to approach, not only because of the need for multidisciplinary prevention but also because of the necessity of an early diagnosis to be able to perform an appropriate treatment due to the conditions of the environment.

## HIDATIDOSIS EN TURKANA: ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE UNA ENFERMEDAD TROPICAL DESATENDIDA/

## HYDATIDOSIS IN TURKANA: AN EPIDEMIOLOGICAL STUDY OF A NEGLECTED TROPICAL DISEASE

**Primer autor:** 1496607 Adela Querencias Martínez<sup>1</sup>, [adquer01@ucm.es](mailto:adquer01@ucm.es)

**Segundo autor:** 1489459 Ester García Gracia<sup>2</sup>, [ester.garcia05@goumh.umh.es](mailto:ester.garcia05@goumh.umh.es)

**Tercer autor:** 1489490, Pablo Nistal Moreira<sup>1</sup>, [pablonistal12@gmail.com](mailto:pablonistal12@gmail.com)

**Tutor 1:** María Francisca Colom Valiente<sup>2</sup>, [colom@umh.es](mailto:colom@umh.es)

**Tutor 2:** Carmen Hernández Pérez<sup>1</sup>, [mchernan@ucm.es](mailto:mchernan@ucm.es)

**Afiliaciones:** Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid<sup>1</sup>; Facultad de Medicina, Universidad Miguel Hernández de Elche<sup>2</sup>

### Resumen

La hidatidosis es una Enfermedades Desatendidas Tropicales, siendo Turkana el lugar con mayor prevalencia del mundo. El objetivo del estudio es conocer la epidemiología y los factores de riesgo asociados a esta patología, para poder llevar a cabo medidas preventivas, así como un diagnóstico precoz y un tratamiento adecuado. Se ha realizado un estudio prospectivo descriptivo observacional acerca de los datos recopilados en la campaña de 2023 de Cirugía en Turkana. Destaca la elevada prevalencia de la enfermedad así como su relación con el contacto con animales y sus vísceras. La localización más afectada fue el hígado (30%) y los síntomas más referidos la cefalea (60%), dolor abdominal (55%), tos (60%). A raíz del estudio se puede concluir que esta patología supone un reto de abordaje, no solo por la necesidad de prevención multidisciplinar sino también por la obligación de un diagnóstico precoz para poder realizar un tratamiento adecuado a las condiciones del medio.

### Abstract

Hydatidosis is part of the Neglected Tropical Diseases, being Turkana the place with the highest prevalence in the world. The aim of this study is to understand the epidemiology and risk factors associated with this pathology, in order to carry out preventive measures, as well as early diagnosis and appropriate treatment. A prospective observational descriptive study was performed with the data collected in the 2023 Surgery In Turkana campaign. It highlights the high prevalence of the disease as well as its relationship with animals and their viscera. The most affected site was the liver (30%) and the most referred symptoms were headache (60%), abdominal pain (55%) and cough (60%). As a result of the study it can be concluded that this pathology is a challenge to approach, not only because of the need for multidisciplinary prevention but also because of the necessity of an early diagnosis to be able to perform an appropriate treatment due to the conditions of the environment.

**Palabras clave:** Hidatidosis, Turkana, factores de riesgo

**Key words:** hydatidosis, Turkana, Risk factors

## HIDATIDOSIS EN TURKANA: ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE UNA ENFERMEDAD TROPICAL DESATENDIDA.

### INTRODUCCIÓN

La hidatidosis es una zoonosis parasitaria causada por el estadio larvario de *Echinococcus granulosus*. Es una enfermedad que ha disminuido su incidencia a nivel mundial de forma notable en las últimas décadas, pero que sigue representando una gran carga en los sistemas sanitarios de muchos países (Grosso, 2012).

Los hospedadores definitivos de este cestodo son los cánidos, mientras que los hospedadores intermediarios en los que se desarrollan las larvas del parásito son mamíferos herbívoros como el ganado ovino o caprino. El ser humano es un hospedador intermediario accidental en este proceso. Los hospedadores intermediarios se infectan mediante la ingesta de huevos de *E. granulosus* por alimentos contaminados. En el estómago de estos se libera la oncosfera que es capaz de llegar a diferentes órganos por el sistema venoso, llegando la mayoría al hígado por la circulación porta hepática. Los órganos afectados desarrollan quistes hidatídicos con el crecimiento larvario de *E. granulosus* en su interior. Los hospedadores definitivos se infectan ante la ingesta de vísceras con quistes hidatídicos (Armiñanzas, 2015).

El diagnóstico de un quiste hidatídico se suele conseguir a través de la combinación de clínica, hallazgos en pruebas de imagen, serologías y análisis del líquido del quiste. El tratamiento en España no sigue un consenso general, pero se basa en cirugía, drenaje percutáneo y administración de fármacos antiparasitarios como el albendazol.

Turkana, una región del noroeste keniana, está considerada la región más afectada por hidatidosis del mundo. La prevalencia de *E. granulosus* en Turkana varía según zonas entre 23-63,5% (Solomon, 2017). Los perros son una parte esencial de la vida en esta región al ayudar en la protección contra animales salvajes y realizar labores de pastoreo, y son el eslabón más importante para la transmisión de la enfermedad. Durante la campaña de "Cirugía en Turkana" (CET) de 2023 (30 de enero a 10 de febrero) fueron atendidos 20 pacientes con hidatidosis. Esto representa el 2,06% de los 970 pacientes atendidos en esta campaña de cooperación internacional.

El proyecto de Enfermedades Tropicales Desatendidas (ETDs) de la Universidad Miguel Hernández de Elche (UMH) en colaboración con CET busca estudiar la epidemiología de ETDs como la hidatidosis. En este trabajo hay una importante implicación del grupo de estudiantes en cooperación Surgery In Turkana University Project (SITUP) que ha trabajado estos datos para poder realizar una aproximación a la prevención, diagnóstico precoz y tratamiento de pacientes con hidatidosis en Turkana.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha realizado un estudio prospectivo descriptivo observacional sobre los pacientes con hidatidosis asistidos durante la campaña de 2023 de CET en Turkana (Kenia), como parte del trabajo de investigación sobre ETDs de la UMH. Los pacientes incluidos en el estudio fueron seleccionados siguiendo el criterio de presentar síntomas o signos sugestivos de hidatidosis, y

que aceptaron participar ofreciendo sus datos mediante firma del consentimiento informado. Los datos fueron obtenidos por entrevista con los pacientes a través de un intérprete. Estos datos se han valorado mediante estadística descriptiva, estudiando la frecuencia de los distintos parámetros en la población de estudio.

## RESULTADOS

Durante la campaña de CET de 2023 se recogieron los datos de 20 pacientes diagnosticados de hidatidosis de los cuales un 60% son mujeres (5 niñas) y un 40% hombres (4 niños), siendo la media de edad en mujeres de 32,5 años y en hombres de 27,5 años.

El 100% de los pacientes vive en zonas rurales. El 30% de ellos no tienen acceso a agua. El 45% se dedican al pastoreo (9 pacientes), una paciente es ama de casa, y el 50% no trabajan.

Los datos de contacto con animales son de especial relevancia, como se muestran en la figura 1, teniendo un 50% de los pacientes contacto solamente con cabras, un 6% únicamente con perros y un 44% de los pacientes tenían contacto tanto con cabras como con perros. El 60% de los pacientes refieren manejo de cadáveres de ganado, incluyéndolos como parte de su dieta el 20% de los pacientes. El 40% de los pacientes describen dar vísceras con indicios de quistes hidatídicos a los perros para su consumo. De los pacientes en contacto con estos animales, el 30% describe compartir agua, comida y cama con perros.

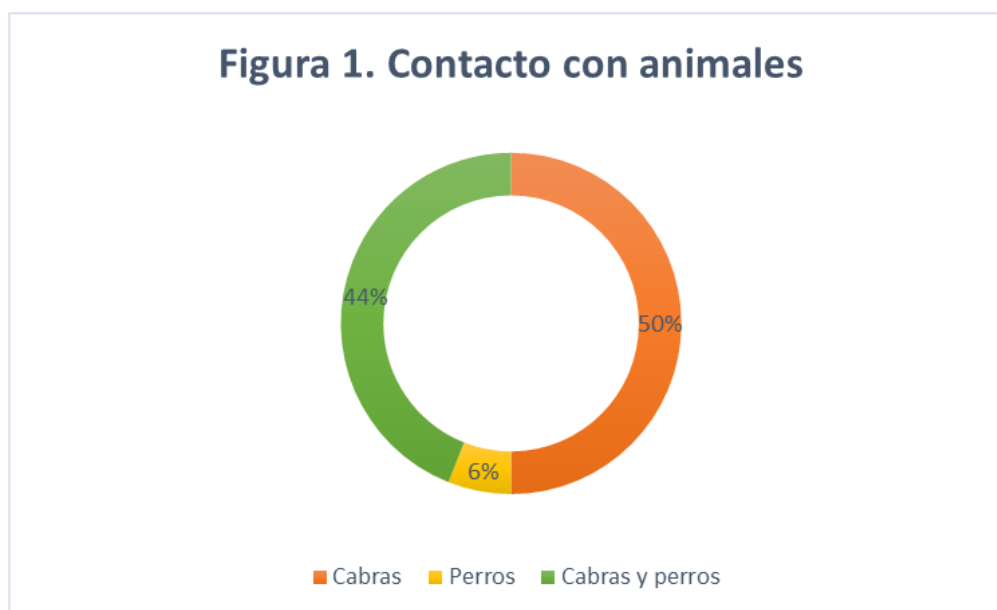


Figura 1. Gráfico circular representando el contacto con animales de diferentes en los pacientes que tuvieron contacto con animales.

La sintomatología presentada en los pacientes, tal y cómo se puede observar en la Figura 2, incluye cefalea (60%), tos (60%), dolor abdominal (55%), pérdida de peso (45%), hepatomegalia (10%) y hepatoesplenomegalia (10%). Ningún paciente refiere ictericia.



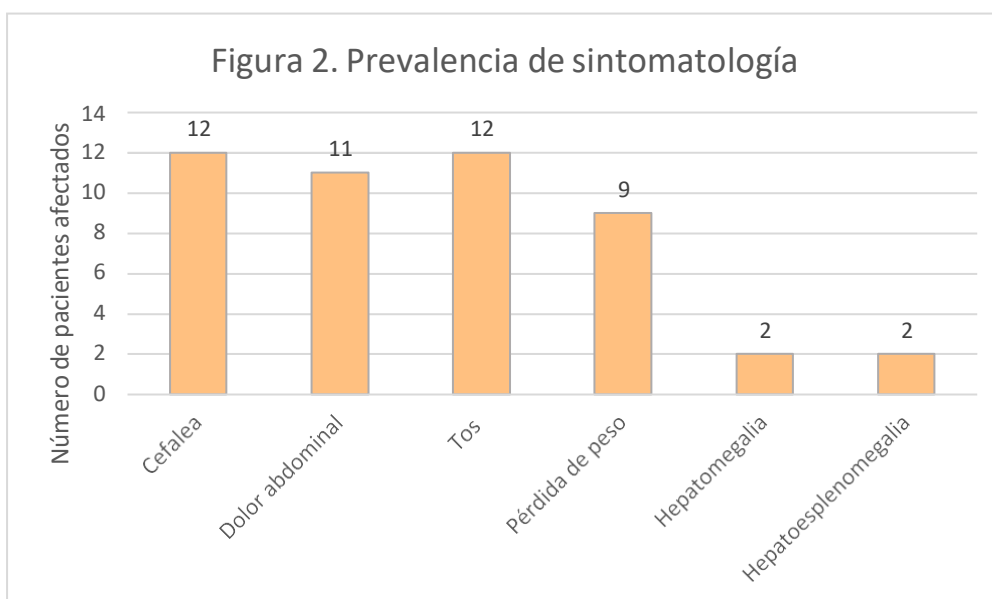


Figura 2. Gráfico de barras mostrando la prevalencia de la sintomatología descrita (n = 20).

Cómo se muestra en la Figura 3, la localización del quiste o los quistes es en una pierna (15%), en un dedo (5%), intraabdominal (10%), en fosa ilíaca derecha (5%), hepática (30%), esplénica (5%), en el pecho (5%) y en útero (5%). En un 15% de ellos se desconoce la localización. El tamaño medio de las lesiones es de 8 cm, alcanzando alguna más de 10 cm de diámetro. La media del tiempo de evolución de la patología es de 7 años, variando entre 1-20 años.

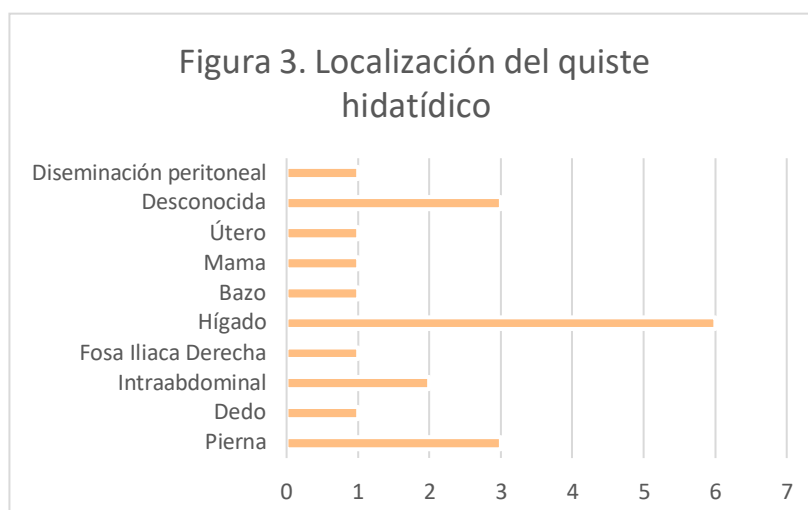


Figura 3. Gráfico circular representando las localizaciones de los quistes hidatídicos encontrados en los pacientes estudiados.

De los 20 pacientes, 6 (30%) se sometieron a intervención quirúrgica, 4 (20%) para resección del quiste con anestesia local, uno (5%) para resección del quiste con anestesia general y otro para diagnóstico intraoperatorio de quiste hidatídico ante previa sospecha de mioma uterino. Todos los pacientes fueron informados sobre la necesidad de realizar un tratamiento antiparasitario adecuado, derivándolos para su manejo farmacológico a entidades especializadas en el mismo.

## DISCUSIÓN

A pesar de que la población estudiada supone una muestra muy pequeña, nuestros resultados confirman, una alta prevalencia de hidatidosis en el pueblo Turkana (Solomon, 2017). El 95% de los pacientes con hidatidosis viven en zonas rurales. Muchos de ellos tienen contacto estrecho con perros y cabras sin control veterinario y la mitad de ellos se dedican al pastoreo, estando en contacto directo constante con estos animales hospedadores de la hidatidosis.

Destaca una mayor prevalencia entre las mujeres, con datos que concuerdan exactamente con los de otros estudios, en los que también el 60% de los afectados eran mujeres y el 40% restante eran hombres (Solomon, 2017). Según este autor, esto se podría deber a la estrecha relación con los perros dentro de las casas (Solomon, 2017). Además, se ha visto que los perros son utilizados por las mujeres como nodrizas para limpiar a los bebés de sus heces y vómitos, así como para limpiar platos y ollas durante los prolongados períodos de sequía (Beigom, 2019). De esta forma existe un alto riesgo de transmisión de la enfermedad.

Dada la importancia de esta patología en Turkana, en octubre de 1983 se inició un programa piloto de control de hidatidosis por parte de la AMREF (African Medical and Research Foundation). Este comenzó con un componente educacional, enfocado en reducir el contacto con perros, evitar alimentarlos con vísceras de ganado, así como la concienciación sobre la necesidad de reducir la enorme cantidad de perros callejeros y la salud de estos a través de administración de praziquantel (Macpherson, 1984). Las mujeres fueron el objetivo principal de la educación, ya que tenían la mayor frecuencia, tasa de exposición al parásito y las tasas más altas de enfermedad como se ha expuesto anteriormente.

En este programa se encontró una prevalencia de 5,6% de pacientes con hidatidosis en la región de Turkana, decreciendo así hasta un 1,9-3,8% en 2012. Estos cambios en la prevalencia muestran el impacto positivo del programa de control y por tanto la importancia de la prevención de esta enfermedad. Sin embargo, el impacto en la transmisión de enfermedades a través de la educación es un proceso lento y el cambio rara vez se realiza a través de programas educativos solamente. La reducción de la población de perros y el tratamiento de estos con praziquantel, han sido las medidas más exitosas en la reducción en la prevalencia de la hidatidosis (Solomon, 2017).

En países como España el tratamiento farmacológico está indicado en pacientes asintomáticos (como profilaxis prequirúrgica) o en sintomáticos (no complicados) donde la cirugía está contraindicada. Siendo el tiempo mínimo de tratamiento de 3 meses. En Turkana estos pacientes son derivados a otros centros para la toma de esta medicación.

A su vez, el manejo quirúrgico difiere entre ambos lugares. En España estaría indicado en todo quiste hidatídico pulmonar y en quistes hepáticos sintomáticos y asintomáticos de más de 7-10 cm. Mientras que en Turkana estos tipos de quistes no son intervenidos debido al alto riesgo para el paciente.

Las dificultades para el tratamiento de la hidatidosis en Turkana se basan en la ausencia de recuerdos para el diagnóstico precoz y tratamiento. Esto se puede observar en el tiempo de evolución medio de los quistes, teniendo una media de 7 años y un máximo de 20. Además, el

tratamiento farmacológico es largo, supone un alto coste económico para los recursos de la zona y la vida semi-nómada de muchos de los pacientes puede suponer otro impedimento para la adherencia terapéutica. El tratamiento quirúrgico está limitado por el acceso al mismo y su complejidad.

A pesar de que los datos de este trabajo concuerdan con estudios previos, sólo se estudian pacientes que presentan hidatidosis. Carecemos de datos poblacionales relacionados con los factores de riesgo a estudio y datos de cribado sobre esta patología. No obstante, dados los resultados de campañas previas de reducción de la prevalencia de la hidatidosis según datos similares, los hallazgos de este estudio parecen apoyar la literatura previa descrita sobre la región de Turkana.

## CONCLUSIÓN

Turkana es una de las regiones más afectada a nivel mundial por la hidatidosis, a pesar de que se hayan llevado a cabo campañas en el pasado con éxito en la reducción de la prevalencia de esta enfermedad. No obstante, este trabajo y otros artículos muestran la necesidad de perseverar en estas campañas de reducción de la hidatidosis, al mostrar que esta patología sigue siendo una afección con deterioro para la calidad de vida de muchos pacientes.

El estudio epidemiológico desarrollado en esta investigación refuerza el conocimiento sobre la presencia de factores de riesgo asociados al comportamiento de los habitantes de las zonas rurales, lo que facilita el cribado de pacientes y anima a retomar las campañas preventivas dirigidas en este sentido

## BIBLIOGRAFÍA

- Armiñanzas, C., Gutiérrez-Cuadra, M., y Fariñas, M. C. (2015) "Hidatidosis: aspectos epidemiológicos, clínicos, diagnósticos y terapéuticos", *Revista Española de Quimioterapia* 2015, 28(3), págs. 116-124. Disponible en: <https://seq.es/seq/0214-3429/28/3/farinas.pdf>
- Beigom KIA, E. et al. (2019) "The burden of cystic echinococcosis in Kenya: A review article", *Iranian Journal of Parasitology*. Disponible en: <https://doi.org/10.18502/ijpa.v14i4.2092>
- Grosso, G. et al. (2012) "Worldwide epidemiology of liver hydatidosis including the Mediterranean area", *World Journal of Gastroenterology*, 18(13), págs. 1425–1437. Disponible en: <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i13.1425>
- Macpherson, C.N., Zeyhle, E. y Romig, T. (1984) "An echinococcus pilot control programme for North-West Turkana, Kenya", *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 78(3), págs. 188–192. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/00034983.1984.11811798>
- Solomon, N. et al. (2017) "Cystic echinococcosis in Turkana, Kenya: The role of cross-sectional screening surveys in assessing the prevalence of human infection", *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 97(2), págs. 587–595. Disponible en: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0643>

**76871: Efecto protector del cannabidiol frente al envejecimiento en hígado - Cannabidiol's protective effect against aging in kidney****Área de conocimiento:** MEDICINA**Autor(es):** Julia Centeno**Tutor(es):** Lisa Rancan, Beatriz Linillos**Universidad:** Universidad Complutense de Madrid**Facultad:** Facultad de Medicina**Titulación:** Grado en Bioquímica**Formato:** Comunicación Oral - Investigación básica**Palabras Clave:** estrés oxidativo, cannabidiol, envejecimiento, inflamación - oxidative stress, cannabidiol, aging, inflammation

El envejecimiento se caracteriza por la acumulación de daño oxidativo, inflamación y apoptosis en las células. Esto afecta a todos los tejidos del organismo, pero el hígado es especialmente sensible. En este estudio se pretende investigar el papel del cannabidiol (CBD) en la prevención de las alteraciones oxidativas asociadas al envejecimiento utilizando un modelo murino. Se trabaja con 29 ratas Long Evans de 15 meses, de las cuales 15 son tratadas con 10mg/Kg/día de CBD durante 10 semanas, y con 10 ratas Long Evans de 5 meses como control joven. Tras el sacrificio de los animales por decapitación, se obtienen las muestras de hígado y se mantienen en nitrógeno líquido a -80°C. Mediante RT PCR se mide la expresión génica de TNF $\alpha$ , NF $\kappa$ B, IL1 $\beta$ , BAX y CASP1. Estos parámetros miden inflamación y apoptosis, y son superiores en las ratas adultas que en las jóvenes. Se observan disminuciones significativas de sus niveles en las ratas adultas tratadas con CBD, indicando que esta molécula puede prevenir los daños causados en el hígado durante el envejecimiento. Además se mide el estrés oxidativo cuantificando con un kit el malondialdehído (medir la peroxidación de lípidos), y estudiando la expresión de GST y GPx con RT PCR. Se observa que las ratas de 15 meses muestran niveles altos de estrés oxidativo, al haber un significativo aumento de lípidos peroxidados y disminución de GST y GPx en comparación con las ratas jóvenes. De nuevo, el tratamiento de las ratas adultas permite reestablecer estos valores hasta alcanzar prácticamente los niveles observados en los controles jóvenes. Por tanto, el tratamiento con CBD durante 10 semanas de las ratas Long Evans de 15 meses muestra efectos beneficiosos significativos en la reducción de la inflamación, oxidación y apoptosis del tejido hepático inherentes al envejecimiento. [Aging is characterized by the accumulation of oxidative damage, inflammation and apoptosis in cells. This affects every tissue, but the liver is particularly sensitive. This study aims to investigate the role of cannabidiol (CBD) in preventing oxidative alterations associated with aging using a murine model. 29 15-month-old Long Evans rats are used, of which 15 are treated with 10mg/kg/day of CBD for 10 weeks. 10 5-month-old Long Evans rats are used as young controls. After the animals are sacrificed by decapitation, liver samples are obtained and kept in liquid nitrogen at -80°C. Gene expression of TNF $\alpha$ , NF $\kappa$ B, IL1 $\beta$ , BAX and CASP1 is measured by RT-PCR. These parameters measure inflammation and apoptosis, and they are higher in adult rats than in young ones. Significant decreases in their levels are observed in adult rats treated with CBD, indicating that this molecule can prevent liver damage caused by aging. Moreover, oxidative stress is measured by quantifying malondialdehyde (measuring lipid peroxidation) with a kit and studying the expression of GST and GPx through RT-PCR. It is observed that 15-month-old rats show high levels of oxidative stress, with a significant increase in peroxidized lipids and a decrease in GST and GPx compared to young rats. Again, treatment of adult rats allows these values to be restored almost to the levels observed in young controls. Therefore, treatment with CBD for 10 weeks in 15-month-old Long Evans rats shows significant beneficial effects in reducing inflammation, oxidation, and apoptosis of liver tissue inherent to aging.]

## **Efecto protector del cannabidiol frente al envejecimiento en hígado [Cannabidiol's protective effect against aging in kidney]**

1516236, Julia Centeno Álvarez, [juliacentenoalvarez@gmail.com](mailto:juliacentenoalvarez@gmail.com)

Tutor 1: Lisa Rancan

Tutor 2: Beatriz Linillos

Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid

**Abstract:** El envejecimiento se caracteriza por la acumulación de daño oxidativo, inflamación y apoptosis en las células. Esto afecta a todos los tejidos del organismo, pero el hígado es especialmente sensible. En este estudio se pretende investigar el papel del cannabidiol (CBD) en la prevención de las alteraciones oxidativas asociadas al envejecimiento utilizando un modelo murino. Se trabaja con 29 ratas Long Evans de 15 meses, de las cuales 15 son tratadas con 10mg/Kg/día de CBD durante 10 semanas, y con 10 ratas Long Evans de 5 meses como control joven. Tras el sacrificio de los animales por decapitación, se obtienen las muestras de hígado y se mantienen en nitrógeno líquido a -80°C. Mediante RT PCR se mide la expresión génica de TNF $\alpha$ , NF $\kappa$ B, IL1 $\beta$ , BAX y CASP1. Estos parámetros miden inflamación y apoptosis, y son superiores en las ratas adultas que en las jóvenes. Se observan disminuciones significativas de sus niveles en las ratas adultas tratadas con CBD, indicando que esta molécula puede prevenir los daños causados en el hígado durante el envejecimiento. Además se mide el estrés oxidativo cuantificando con un kit el malonildialdehído (medir la peroxidación de lípidos), y estudiando la expresión de GST y GPx con RT PCR. Se observa que las ratas de 15 meses muestran niveles altos de estrés oxidativo, al haber un significativo aumento de lípidos peroxidados y disminución de GST y GPx en comparación con las ratas jóvenes. De nuevo, el tratamiento de las ratas adultas permite reestablecer estos valores hasta alcanzar prácticamente los niveles observados en los controles jóvenes. Por tanto, el tratamiento con CBD durante 10 semanas de las ratas Long Evans de 15 meses muestra efectos beneficiosos significativos en la reducción de la inflamación, oxidación y apoptosis del tejido hepático inherentes al envejecimiento.

[Aging is characterized by the accumulation of oxidative damage, inflammation and apoptosis in cells. This affects every tissue, but the liver is particularly sensitive. This study aims to investigate the role of cannabidiol (CBD) in preventing oxidative alterations associated with aging using a murine model. 29 15-month-old Long Evans rats are used, of which 15 are treated with 10mg/kg/day of CBD for 10 weeks. 10 5-month-old Long Evans rats are used as young controls. After the animals are sacrificed by decapitation, liver samples are obtained and kept in liquid nitrogen at -80°C. Gene expression of TNF $\alpha$ , NF $\kappa$ B, IL1 $\beta$ , BAX and CASP1 is measured by RT-PCR. These parameters measure inflammation and apoptosis, and they are higher in adult rats than in young ones. Significant decreases in their levels are observed in adult rats treated with CBD, indicating that this molecule can prevent liver damage caused by aging. Moreover, oxidative stress is measured by quantifying malondialdehyde (measuring lipid peroxidation) with a kit and studying the expression of GST and GPx through RT-PCR. It is observed that 15-month-old rats show high levels of oxidative stress, with a significant increase in peroxidized lipids and a decrease in GST and GPx compared to young rats. Again, treatment of adult rats allows these values to be restored almost to the levels observed in young controls. Therefore, treatment with CBD for 10 weeks in 15-month-old Long Evans rats shows significant beneficial effects in reducing inflammation, oxidation, and apoptosis of liver tissue inherent to aging.]

Palabras clave: estrés oxidativo, cannabidiol, envejecimiento, inflamación

[Key words: oxidative stress, cannabidiol, aging, inflammation]

## 1. Introducción

Con el envejecimiento de un organismo, aumenta la expresión de moléculas proinflamatorias en sus tejidos mediante distintas reacciones metabólicas. Por ejemplo, la activación del factor de transcripción NFκB da lugar a la expresión de interleuquinas como IL1b y proteínas proinflamatorias como TNFα. El hígado es un órgano que puede generar respuestas inflamatorias tanto a nivel local como sistémico gracias a su alto contenido en macrófagos. Esto hace que juegue un papel esencial en la respuesta de un organismo a señales de estrés como el daño celular o la infección, para lo que cuenta con una red compleja de receptores que interactúan con diversas citoquinas. En consecuencia se trata de un tejido muy sensible al estado proinflamatorio característico del envejecimiento, ya que sus receptores lo convierten en una diana de la señalización inflamatoria de citoquinas.

Aunque no se conocen los mecanismos moleculares exactos detrás del envejecimiento, está muy aceptado que detrás de los daños relacionados con este se encuentran la inflamación y el estrés oxidativo. No obstante, no es fácil definir si estos procesos son causa o consecuencia del envejecimiento. Una posibilidad es que con el paso del tiempo de vida de la célula se acumulen daños en su genoma, y que estos daños en el DNA den lugar al envejecimiento por el malfuncionamiento de la célula (Soares et al., 2014). En concreto, el fallo progresivo de las mitocondrias, orgánulo muy presente en el hígado para la producción de energía, resulta no solo en una disminución en la producción de ATP, que puede explicar el cansancio asociado al envejecimiento, sino también a la generación de radicales libres, como las especies reactivas del oxígeno (ROS). Estos radicales libres, se generan, además de en reacciones no enzimáticas, en las reacciones de la cadena respiratoria, que tiene lugar en la membrana interna mitocondrial. El aumento de moléculas oxidantes, junto con una disminución de los sistemas antioxidantes, da lugar a una situación de estrés oxidativo que afecta a diversas moléculas. Por ejemplo, el estado oxidativo se puede comprobar por la presencia de lípidos peroxidados, como el malondialdehído. Otros indicadores de este estado celular son los bajos niveles de enzimas antioxidantes, por ejemplo la glutatión-S-transferasa (GST) o el aumento de aquellas enzimas que generan moléculas oxidantes, como es el caso de la glutatión peroxidasa (GPx).

Ya sea como causa o consecuencia del envejecimiento, con el tiempo las células sufren procesos de inflamación crónica y estrés oxidativo, procesos no independientes a nivel de señalización celular de forma que el aumento de uno da lugar al aumento del otro (Buzoglu et al., 2022), creando un bucle de daño celular. Todo esto conduce a la limitación de la regeneración de los tejidos con aumento de la muerte celular programada, llamada apoptosis. Esto también implica que el envejecimiento celular se caracterizará por un aumento en las proteínas implicadas en la apoptosis, como son BAX o CASP1. El conjunto de inflamación, estrés oxidativo y apoptosis da lugar a un deterioro cada vez mayor del organismo, de forma que las lesiones de sus tejidos son cada vez más difíciles de revertir, que es lo que ocurre en el envejecimiento.

Aunque no es posible detener el envejecimiento, puede retardarse tratando de proteger al organismo de los daños asociados a este proceso. Se ha estudiado cómo la administración de antioxidantes puede mejorar estos daños (De la Fuente et al., 2002). El cannabidiol (CBD) es un antioxidante presente en el cáñamo indio que carece de efectos psicotrópicos. Se han descrito muchos beneficios de esta molécula, por ejemplo como ansiolítico o por su posible participación en la protección frente a enfermedades cardiovasculares. Respecto a esto último, se ha demostrado que el CBD puede aumentar los niveles plasmáticos de HDL y reducir los de LDL oxidados, que son los que pueden acumularse y por tanto suponen riesgo cardiovascular (Fouad et al., 2013, Gallelli et al., 2018). Esto sugiere el potencial que tiene esta molécula para reducir el estrés oxidativo, y por tanto su posible efecto protector del daño asociado al envejecimiento.

## 2. Materiales y métodos

- Modelo animal

Se utilizaron ratas de la cepa Long Evans: 15 de 5 meses de edad (controles jóvenes) y 29 de 15 meses de edad (rata adulta), con un total de n=44. Todas las ratas jóvenes y 15 de las adultas recibieron comida control sin CBD, mientras que el grupo restante de 14 ratas adultas fue alimentado con CBD durante 2 meses. Para su administración, se preparó una solución stock de CBD y harina a concentración 200 mg/100g, con la que se elaboraron galletas que se dosificaban dando 10 mg/Kg de peso/día a las ratas. El sacrificio de los animales se realizó por decapitación con guillotina, y posteriormente el hígado se disecó y se congeló en nitrógeno líquido. Todos los animales recibieron los cuidados establecidos por las pautas de cuidado ético de animales de experimentación de la Unión Europea.

- Análisis de la expresión génica

Se mide la expresión de BAX, NFkB, GST, IL1beta, TNFalfa y CASP1 mediante la técnica de PCR a tiempo real (RT-qPCR). El estudio requiere tres pasos: aislamiento de RNA de las muestras, transcripción reversa y RT-qPCR. En una RT-qPCR cuanto mayor es el número de copias inicial de DNA, menor es el número de ciclos necesarios para alcanzar el umbral (Ct). Los resultados se analizaron en función del método comparativo del parámetro CT para la cuantificación relativa, que compara cada gen con uno de expresión constante, el RNA 18S.

- Aislamiento de RNA: las muestras congeladas fueron pesadas y luego homogeneizadas tres veces en un tampón de lisis (PMSF, pepstatina A, aprotinina y leupeptina en una solución salina tamponada con fosfato con un pH de 7.2 y 0.05% de azida sódica). Los homogenatos fueron congelados en nitrógeno líquido y luego descongelados en un baño de agua a 37°C, seguido de una centrifugación para separar los orgánulos celulares (1h, 119000g). Los sobrenadantes resultantes se congelaron para permitir la formación de agregados macromoleculares, que luego se precipitaron a 3000g.
- Cuantificación de la expresión: Para obtener cDNA se utilizó el StaRT Reverse Transcription kit de AnyGenes®. Tras desnaturalizar 2mmg de cada muestra de RNA incubando a 65°C en H<sub>2</sub>O RNAsas free, se prepara el volumen necesario de StaRT Reaction Mix y se programa el termociclador para el protocolo del fabricante. La RT-qPCR se realizó en placas MicroAmp de 96 pocillos y con el aparato 7500 fast de Applied Biosystems. Para elaborar las Master Mix se utilizó SYBR Green de las casas comerciales Takara (BAX, NFkB, GST) y AnyGenes (IL1b, TNFalfa, CASP1), ROX, cebadores específicos y agua. En el caso de usar Takara se empleó el programa rápido, mientras que para los para AnyGenes el programa fue estándar.

- Análisis de la peroxidación de lípidos

El kit de ensayo de hidroperóxidos de lípidos Calbiochem mide los hidroperóxidos directamente mediante reacciones redox con iones ferrosos. Además, los hidroperóxidos son inestables y reaccionan con los iones ferrosos para producir iones férricos, que se detectan utilizando el ion tiocianato como cromógeno. Las muestras se agitaron con los reactivos FTS 1 y 2 y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después, el sobrenadante se transfirió a una cubeta de cuarzo de 1 mL y se midió la densidad óptica a 500 nm. La cantidad de hidroperóxido de lípidos se obtuvo a partir de la regresión lineal de la curva estándar.

- Análisis estadístico

Todos los resultados se expresan como la media ± SEM. La comparación de las medias se realiza mediante el análisis de varianza de Friedman seguido de la prueba de Wilcoxon de dos colas para datos pareados. Se considera significativo un nivel de confianza del 95% ( $P < 0,05$ ).

### 3. Resultados

- Marcadores de inflamación y oxidación

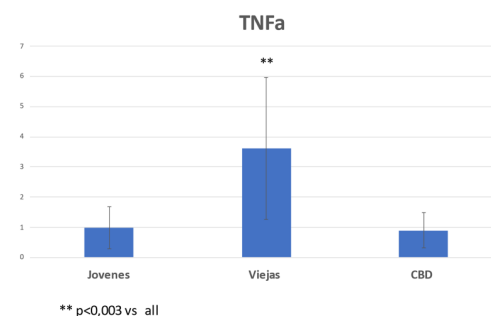
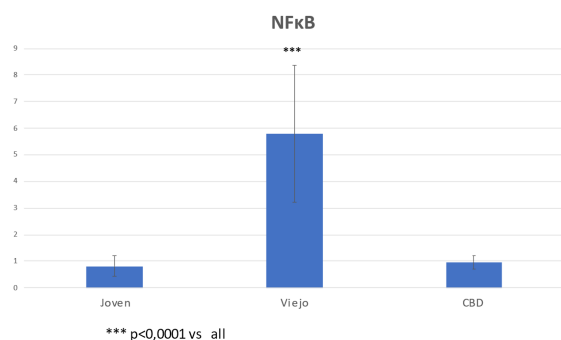


Figura 1. Niveles de expresión del factor de transcripción NFkB, marcador de inflamación en ratas jóvenes (5 meses), adultas (15 meses) y adultas tratadas con CBD (15 meses)

Figura 1. Niveles de expresión de la proteína proinflamatoria TNFa en ratas jóvenes (5 meses), adultas (15 meses) y adultas tratadas con CBD (15 meses)

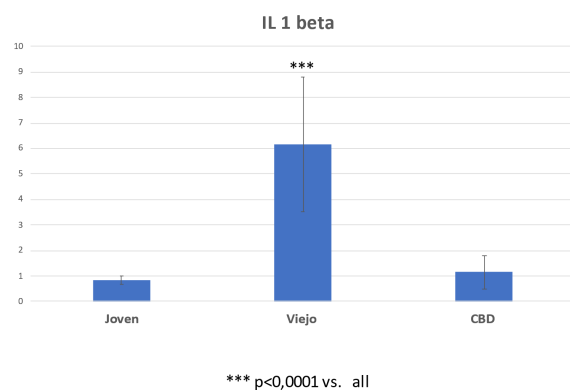


Figura 3. Niveles de expresión de la citoquina IL1b, marcador inflamatorio, en ratas jóvenes (5 meses), adultas (15 meses) y adultas tratadas con CBD (15 meses)

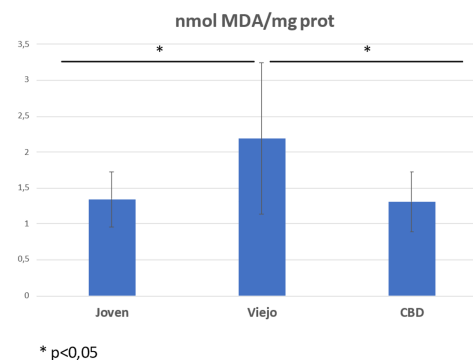


Figura 4. Niveles de MDA, marcador inflamatorio, en ratas jóvenes (5 meses), adultas (15 meses) y adultas tratadas con CBD (15 meses)

NFkB, TNFa, IL1b y MDA se comportan de la misma manera con el envejecimiento. Todas estas moléculas favorecen un estado inflamatorio y oxidativo, por lo que se comprueba que en las ratas adultas estos dos procesos se han visto aumentados por el envejecimiento con respecto a los niveles de las jóvenes. El aumento en la expresión génica de NFkB, TNFa y IL1b es en los tres muy casos significativo ( $p < 0,05$ ). El aumento de los niveles de MDA es también significativo, por lo que la situación de estrés oxidativo en las ratas adultas tiene como consecuencia la peroxidación lipídica.

Por otro lado, se observa que estas moléculas no solamente aumentan con el envejecimiento del organismo, sino que los niveles de las ratas adultas tratadas con CBD son muy similares a los de las ratas jóvenes. Estos resultados indican que la administración de CBD ejerce una función protectora al disminuir los marcadores de inflamación y oxidación.



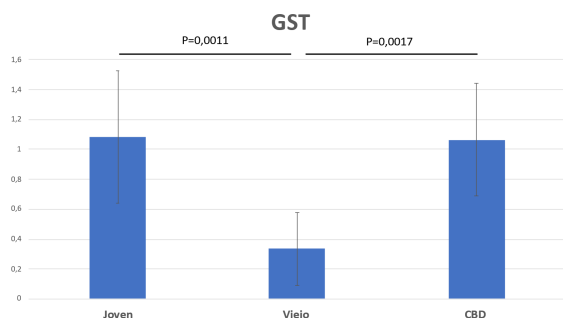


Figura 5. Niveles de expresión de GST, enzima antioxidante, en ratas jóvenes (5 meses), adultas (15 meses) y adultas tratadas con CBD (15 meses)

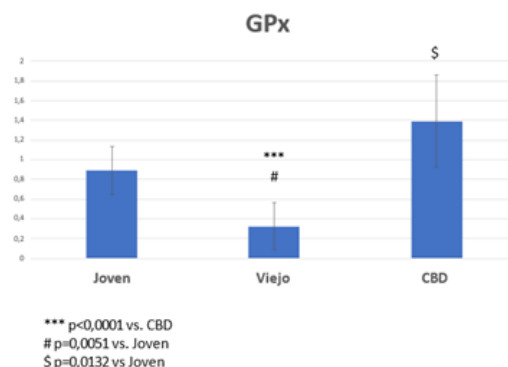


Figura 6. Niveles de expresión GPx, enzima antioxidante, en ratas jóvenes (5 meses), adultas (15 meses) y adultas tratadas con CBD (15 meses)

En el caso de los niveles de expresión de GST y GPx las ratas adultas sin tratar muestran menores niveles que los controles jóvenes. Al tratarse de dos enzimas antioxidantes, esto indica también que con el envejecimiento se favorece un estado de estrés oxidativo. Del mismo modo que antes, la administración de CBD mantiene la expresión al nivel de los controles jóvenes.

- Marcadores de apoptosis

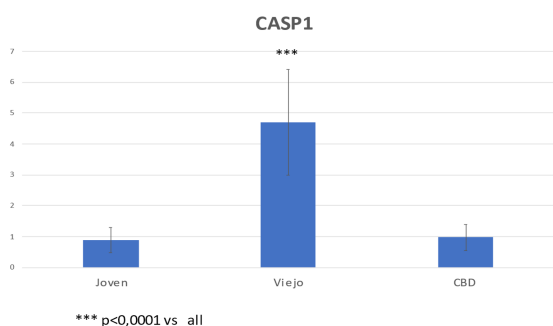


Figura 7. Niveles de expresión de CASP1 en ratas jóvenes (5 meses), adultas (15 meses) y adultas tratadas con CBD (15 meses)

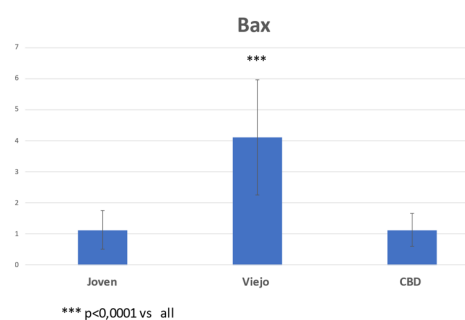


Figura 8. Niveles de expresión de Bax en ratas jóvenes (5 meses), adultas (15 meses) y adultas tratadas con CBD (15 meses)

Tanto la CASP1 como Bax son proteínas implicadas en la apoptosis. Su expresión aumenta de forma significativa con el envejecimiento, como muestran los resultados de las ratas adultas sin tratar al compararlos con los de las ratas jóvenes. De nuevo, las ratas adultas tratadas con CBD muestran prácticamente los mismos niveles de expresión que los controles jóvenes.

#### 4. Discusión

El estrés oxidativo ha sido implicado en la patogénesis de varias alteraciones debido al envejecimiento. La alta formación de ROS aumenta la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa. El citocromo C se mueve desde el espacio intermembrana hacia el citoplasma de la célula, dando lugar a la formación del apoptosoma, que activa una cascada de reacciones proteolíticas que también activa las DNAsas y, en última instancia, causa la muerte celular. El CBD es capaz de bloquear los radicales libres al extinguirlos o transformarlos en compuestos menos activos (Pan et al., 2009, Rajesh et al., 2007). La actividad antioxidante del CBD comienza por activar el factor nuclear Nrf2 (Juknat et al., 2013) que es responsable de la transcripción del varios antioxidantes potentes. El efecto antioxidante más alto del CBD está asociado con su interacción con receptores, que depende de su concentración. La señalización por PPAR $\alpha$  estimula la producción de enzimas antioxidantes como la SOD (Gallelli et al., 2018).

Como se ha visto en los resultados de este estudio, el CBD puede proteger frente al envejecimiento al actuar como antioxidante y por tanto reducir también la apoptosis y la inflamación. Pese a obtenerse resultados muy significativos, resulta importante destacar que en la mayor parte de este estudio se mide expresión génica, que no siempre conlleva un cambio en los niveles proteicos. Por este motivo este estudio avanzará en los próximos meses hacia el análisis de los niveles de estas proteínas mediante técnicas como Western-Blot o ELISA. No obstante, en el caso de MDA sí se está valorando directamente el estado oxidativo celular, ya que la peroxidación de lípidos aumenta cuando se desregula el equilibrio entre oxidantes y antioxidantes, por lo que se espera que los niveles proteicos de los marcadores oxidativos se encuentren elevados también.

## 5. Conclusiones

Con los datos obtenidos, se puede confirmar que el envejecimiento del tejido hepático se caracteriza por un aumento en la inflamación, oxidación y apoptosis. Además, el estudio confirma que el CBD puede actuar reduciendo los niveles de inflamación, oxidación y apoptosis causados por el envejecimiento del hígado en ratas Long Evans. El CBD es por tanto una molécula con gran potencia como protector de los daños causados por el envejecimiento.

## 6. Referencias bibliográficas

Buzoglu, H. D., Burus, A., Bayazit, Y., & Goldberg, M. (2022). Stem Cell and Oxidative Stress-Inflammation Cycle. *Current stem cell research & therapy*, 10.2174/1574888X17666221012151425. Advance online publication.

De la Fuente, M. (2002). Effects of antioxidants on immune system ageing. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56(3), S5-S8.

Fouad, A. A., Albuali, W. H., Al-Mulhim, A. S., & Jresat, I. (2013). Cardioprotective effect of cannabidiol in rats exposed to doxorubicin toxicity. *Environmental toxicology and pharmacology*, 36(2), 347–357.

Gallelli, C. A., Calcagnini, S., Romano, A., Koczwara, J. B., de Ceglia, M., Dante, D., Villani, R., Giudetti, A. M., Cassano, T., & Gaetani, S. (2018). Modulation of the Oxidative Stress and Lipid Peroxidation by Endocannabinoids and Their Lipid Analogues. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 7(7), 93.

Juknat, A., Pietr, M., Kozela, E., Rimmerman, N., Levy, R., Gao, F., Coppola, G., Geschwind, D., & Vogel, Z. (2013). Microarray and pathway analysis reveal distinct mechanisms underlying cannabinoid-mediated modulation of LPS-induced activation of BV-2 microglial cells. *PloS one*, 8(4), e61462.

Rajesh, M., Mukhopadhyay, P., Bátkai, S., Haskó, G., Liaudet, L., Drel, V. R., Obrosova, I. G., & Pacher, P. (2007). Cannabidiol attenuates high glucose-induced endothelial cell inflammatory response and barrier disruption. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 293(1), H610–H619.

Soares, J. P., Cortinhas, A., Bento, T., Leitão, J. C., Collins, A. R., Gaivão, I., & Mota, M. P. (2014). Aging and DNA damage in humans: a meta-analysis study. *Aging*, 6(6), 432–439.

Pan, H., Mukhopadhyay, P., Rajesh, M., Patel, V., Mukhopadhyay, B., Gao, B., Haskó, G., & Pacher, P. (2009). Cannabidiol attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity by decreasing oxidative/nitrosative stress, inflammation, and cell death. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 328(3), 708–714.

**76799: Efectos antiinflamatorios y antioxidantes de los principales metabolitos fenólicos del café en células 3T3-L1. Anti-inflammatory and antioxidant effects of the main colonic coffee phenols metabolites in 3T3-L1 cells****Área de conocimiento:** NUTRICIÓN HUMANA Y DIETÉTICA**Autor(es):** Andrea Sánchez-Medina Díaz**Tutor(es):** Beatriz Irene Sarriá Ruíz**Universidad:** Universidad Complutense de Madrid**Facultad:** Facultad de Veterinaria**Titulación:** Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos**Formato:** Comunicación Oral - Investigación básica**Palabras Clave:** TNF-  $\alpha$ ; 3T3-L1; Metabolitos colónicos del café. TNF- $\alpha$ ; 3T3-L1; Coffee Colonic Metabolites.

La obesidad, se considera la pandemia del siglo XXI, observándose casos incluso a muy temprana edad. Esta enfermedad está asociada con una inflamación de bajo grado localizada principalmente en el tejido adiposo blanco, además de hígado, páncreas, corazón, etc. Esa inflamación se ve favorecida con el aumento de tejido adiposo que hace que se secreten más citoquinas proinflamatorias. Hoy en día, se buscan fuentes naturales de compuestos antiinflamatorios y antioxidantes, propiedades que reúnen los compuestos fenólicos. El café, gracias a su elevado consumo y composición, es la principal fuente de compuestos fenólicos en la dieta occidental. Estudios de biodisponibilidad de café en humanos, han demostrado que, tras la ingesta de este alimento, los metabolitos fenólicos más abundantes son de origen colónico. Para conocer los efectos antiinflamatorios y antioxidantes de los principales metabolitos colónicos del café, se ha puesto a punto un modelo de inflamación/oxidación en células 3T3-L1, usando el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ). Para ello, se determinó la viabilidad celular de 3T3-L1 tras la exposición a distintas concentraciones de TNF-  $\alpha$  durante distintos tiempos, y se analizó la secreción de interleuquina (IL)-6, así como, la producción de especies reactivas de oxígeno y glutatión. Este modelo se ha aplicado para valorar las propiedades antiinflamatorias y antioxidantes de los principales metabolitos fenólicos de origen colónico del café: el ácido dihidrocafeico (DHCA), dihidroferúlico (DHFA) e hidroxihipúrico (HHA) a concentraciones fisiológicas, así como concentraciones más altas (0.5, 1, 5 y 10  $\mu$ M), para valorar si había una respuesta dosis-dependiente. La exposición a 10 ng/mL de TNF-  $\alpha$  durante 24 horas, indujo inflamación/oxidación en las células 3T3-L1. Asimismo, DHCA, DHFA y HHA a las concentraciones estudiadas presentan un efecto antioxidante dosis dependiente, pero no un claro efecto antiinflamatorio, ya que no se ha visto cambios en la producción de IL-6.

Obesity is considered the XXI century pandemic, been seeing even at a very young age. This disease comes along with a low-grade inflammation located principally in the white adipose tissue, in addition to liver, pancreas, heart, etc. Inflammation is favored by the excess of fat in the adipose tissue that increases proinflammatory cytokine secretion. Natural sources of anti-inflammatory and antioxidant compounds are being searched. These properties can be seen with the phenolic compounds. As coffee is one of the most consumed beverages and it's very rich in phenolic compounds with antioxidant properties, it's the main source of antioxidant compounds in the Western diet. Bioavailability coffee studies carried out in humans, have shown that, after coffee consumption, the most abundant group of the phenolic metabolites in plasma and urine are of colonic origin. In order to understand the antioxidant and anti-inflammatory properties of some of the main coffee colonic metabolites, an inflammation/antioxidation model was set up in 3T3-L1 cells using tumoral necrosis factor- $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ). To achieve this, firstly cell viability was determined after exposure to different TNF- $\alpha$  concentrations, at different times, afterwards the amount of interleukin-6 (IL-6) secreted, as well as the reactive oxygen species and glutathione production, were analyzed in 3T3-L1 cells. This model was applied to evaluate the anti-inflammatory and antioxidant properties of the main colonic coffee metabolites: dihydrocaffeic acid (DHCA), dihydroferulic acid (DHFA) and hydroxyhippuric acid (HHA) at physiological and higher concentrations (0.5, 1, 5 y 10  $\mu$ M) according to previous bioavailability studies of coffee, to evaluate if there's a dose-dependent response.

The exposure to 10 ng/mL of TNF- $\alpha$  for 24 hours, induced inflammation/oxidation in 3T3-L1 cells. Moreover, it can be concluded that DHCA, DHFA and HHA at the doses studied, induced dose-dependent antioxidant effects, but the anti-inflammatory effects were not clear, as no changes in IL-6 production were observed.

## **Efectos antiinflamatorios y antioxidantes de los principales metabolitos fenólicos del café en células 3T3-L1. Anti-inflammatory and antioxidant effects of the main colonic coffee phenols metabolites in 3T3-L1 cells**

1486964, Andrea Sánchez-Medina Díaz, [andsan25@ucm.es](mailto:andsan25@ucm.es)

Tutor: Beatriz Irene Sarriá Ruíz, [beasarri@ucm.es](mailto:beasarri@ucm.es)

Afiliaciones: Departamento de Metabolismo y Nutrición. Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Nutrición. Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Departamento de Ciencia de los Alimentos y Nutrición. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.

Resumen: La obesidad, se considera la pandemia del siglo XXI, observándose casos incluso a muy temprana edad. Esta enfermedad está asociada con una inflamación de bajo grado localizada principalmente en el tejido adiposo blanco, además de hígado, páncreas, corazón, etc. Esa inflamación se ve favorecida con el aumento de tejido adiposo que hace que se secreten más citoquinas proinflamatorias. Hoy en día, se buscan fuentes naturales de compuestos antiinflamatorios y antioxidantes, propiedades que reúnen los compuestos fenólicos. El café, gracias a su elevado consumo y composición, es la principal fuente de compuestos fenólicos en la dieta occidental. Estudios de biodisponibilidad de café en humanos, han demostrado que, tras la ingesta de este alimento, los metabolitos fenólicos más abundantes son de origen colónico. Para conocer los efectos antiinflamatorios y antioxidantes de los principales metabolitos colónicos del café, se ha puesto a punto un modelo de inflamación/oxidación en células 3T3-L1, usando el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Para ello, se determinó la viabilidad celular de 3T3-L1 tras la exposición a distintas concentraciones de TNF- $\alpha$  durante distintos tiempos, y se analizó la secreción de interleuquina (IL)-6, así como, la producción de especies reactivas de oxígeno y glutatión. Este modelo se ha aplicado para valorar las propiedades antiinflamatorias y antioxidantes de los principales metabolitos fenólicos de origen colónico del café: el ácido dihidrocafeico (DHCA), dihidroferúlico (DHFA) e hidroxihípúrico (HHA) a concentraciones fisiológicas, así como concentraciones más altas (0.5, 1, 5 y 10  $\mu$ M), para valorar si había una respuesta dosis-dependiente. La exposición a 10 ng/mL de TNF- $\alpha$  durante 24 horas, indujo inflamación/oxidación en las células 3T3-L1. Asimismo, DHCA, DHFA y HHA a las concentraciones estudiadas presentan un efecto antioxidante dosis dependiente, pero no un claro efecto antiinflamatorio, ya que no se ha visto cambios en la producción de IL-6.

Abstract: Obesity is considered the XXI century pandemic, been seeing even at a very young age. This disease comes along with a low-grade inflammation located principally in the white adipose tissue, in addition to liver, pancreas, heart, etc. Inflammation is favored by the excess of fat in the adipose tissue that increases proinflammatory cytokine secretion. Natural sources of anti-inflammatory and antioxidant compounds are being searched. These properties can be seen with the phenolic compounds. As coffee is one of the most consumed beverages and it is very rich in phenolic compounds with antioxidant properties, it is the main source of antioxidant compounds in the Western diet. Bioavailability coffee studies carried out in humans, have shown that, after coffee consumption, the most abundant group of the phenolic metabolites in plasma and urine are of colonic origin. In order to understand the antioxidant and anti-inflammatory properties of some of the main coffee colonic metabolites, an inflammation/antioxidation model was set up in 3T3-L1 cells using tumoral necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). To achieve this, firstly cell viability was determined after exposure to different TNF- $\alpha$  concentrations, at different times, afterwards the amount of interleukin-6 (IL-6) secreted, as well as the reactive oxygen species and glutathione production, were analyzed in 3T3-L1 cells. This model was applied to evaluate the anti-inflammatory and antioxidant properties of the main colonic coffee metabolites: dihydrocaffeic acid (DHCA), dihydroferulic acid (DHFA) and hydroxyhippuric acid (HHA) at physiological and higher concentrations (0.5, 1, 5 y 10  $\mu$ M) according to previous bioavailability studies of coffee, to evaluate if there's a dose-dependent response.

The exposure to 10 ng/mL of TNF- $\alpha$  for 24 hours, induced inflammation/oxidation in 3T3-L1 cells. Moreover, it can be concluded that DHCA, DHFA and HHA at the doses studied, induced dose-dependent antioxidant effects, but the anti-inflammatory effects were not clear, as no changes in IL-6 production were observed.

Palabras clave: TNF- $\alpha$ ; 3T3-L1; Metabolitos colónicos del café.

Keywords: TNF- $\alpha$ ; 3T3-L1; Coffee Colonic Metabolites.

## 1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, la obesidad es considerada una pandemia. Esta enfermedad multifactorial se caracteriza por la acumulación anormal o excesiva de grasa principalmente en el tejido adiposo, lo que favorece un incremento en los niveles circulantes de citoquinas inflamatorias, denominadas adipocinas [1], resultando en una inflamación de bajo grado. Es bien conocido que los compuestos fenólicos, presentan propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antienvjecimiento, etc. En la dieta occidental, el café es el alimento que más aporta estos compuestos fenólicos [2], ya que además de tratarse de una bebida altamente consumida, presenta una alta concentración en estos compuestos. Teniendo esto en cuenta el café que puede jugar un papel importante en la prevención o tratamiento de la obesidad. No obstante, la absorción de los fenoles del café es limitada a nivel del intestino delgado, por lo que la mayoría alcanzan el colon donde son metabolizados por la microbiota colónica [3], siendo el ácido dihidrocafeico (DHCA), dihidroferúlico (DHFA) e hidroxihipúrico (HHA) los metabolitos colónicos más abundantes tanto en sangre como en orina tras la ingesta de café. Teniendo todo esto en cuenta, el principal objetivo de este trabajo es evaluar la capacidad antiinflamatoria y antioxidante de los metabolitos colónicos mayoritarios del café: DHCA, DHFA y el HHA a través de un modelo de inflamación/oxidación puesta a punto en células 3T3-L1.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

Para valorar los efectos de DHCA, DHFA y el HHA, en la inflamación y oxidación, se emplearon células 3T3-L1 de ratón que tienen una morfología similar a la de los fibroblastos. Las células 3T3-L1 empleadas fueron donadas por la Dra. Ángela Martínez Valverde del IIBm Alberto Sols (CSIC-UAM).

Reactivos químicos usados: De BioWhittaker Europe (Lonza, Madrid, España), se adquirió medio modificado de águila Dulbecco (DMEM) y suero fetal de ternero (FCS). DHCA, DHFA, HHA, gentamicina, penicilina, estreptomycin, o-ftalaldialdehído (OPT), GSH y glutatión oxidasa, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), diacetato 2,7-diclorofluoresceína, tampón fosfato salino (PBS) y dodecilsulfato sódico (SDS) fueron comprados de Sigma-Aldrich (Madrid, España); el cristal violeta era de Thermo Fisher Scientific; el agente recombinante Factor de Necrosis Tumoral-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) era de PreproTech (Tebu-bio, Madrid, España); el kit ELISA de IL-6 era de R&D Systems (Madrid, España) y los platos de cultivo celular eran de Falcon (Cajal, Madrid, España).

Cultivo celular: Las células 3T3-L1 se mantuvieron en un incubador humidificado (5% de CO<sub>2</sub>, 95% de aire) a 37°C. Se hicieron crecer en el medio DMEM F-12, suplementado con FCS al 2% y, de gentamicina, penicilina y estreptomycin, 50 mg/L.

Tratamiento proinflamatorio: para poder establecer el modelo de inflamación, se prepararon diluciones de TNF- $\alpha$  a 10 y 20 ng/mL, empleando el medio de cultivo con suero FCS. Las células 3T3-L1 se trataron con estas diluciones a distintos tiempos: 6, 8 y 24 horas. La evaluación de la viabilidad celular y producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células tratadas con TNF-  $\alpha$  se realizó mediante la tinción con cristal violeta (0,2% con etanol) durante 20 minutos y diacetato 2,7-diclorofluoresceína durante 30 minutos, respectivamente. Para ello, las células 3T3-L1 fueron sembradas a baja densidad (10<sup>5</sup> células por pocillo) en platos de 24 pocillos y después fueron tratadas con TNF- $\alpha$  (10 y 20 ng/mL) durante 6 y 24h. Medición de la producción de interluquina-6

(IL-6) en el sobrenadante celular se realizó mediante análisis inmunoenzimático. Para valorar los efectos antiinflamatorios y antioxidantes de los metabolitos DHCA, DHFA y HHA en las células 3T3-L1 expuestas a TNF- $\alpha$  (10 ng/mL, 24 h), las células se cotrataron con TNF junto con DHCA, DHFA y HHA (0.5, 1, 5 y 10  $\mu$ M) durante 24 horas, midiendo en primer lugar la viabilidad celular y la producción de ROS. Para conocer los efectos antioxidantes inducidos por los metabolitos DHCA, DHFA y HHA en las células 3T3-L1 se midió la concentración de glutatión reducido (GSH) (ng/mg de proteína) y para determinar los efectos antiinflamatorios se midió la concentración de IL-6 secretada al medio.

Se empleó el programa SPSS (versión 24.0) para el análisis estadístico, aplicando el análisis de ANOVA de una vía, seguido del test de pares Bonferroni. El límite de significación fue  $p < 0.05$ .

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Establecimiento del modelo de inflamación y de oxidación en las células 3T3-L1.

Las células 3T3-L1 se trataron con TNF- $\alpha$  a las concentraciones de 10 y 20 ng/mL durante 6 y 24 horas, y después se midió la producción de interleuquina-6 (IL-6) (Figura 1). A las 6 horas no observaron cambios en la concentración de IL-6.

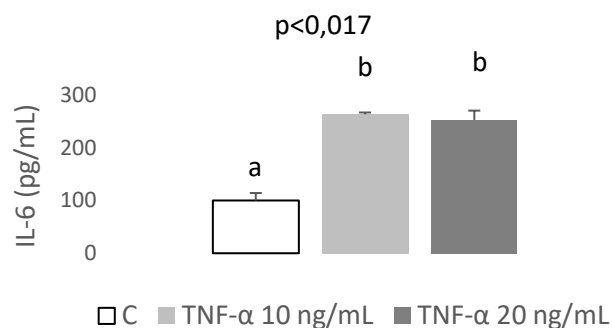


Figura 1. Producción de interleuquina-6 (IL-6) en células 3T3-L1, sometidas a 0 (control, C), o a 10 y 20 ng/mL de TNF- $\alpha$  durante 24 horas.

#### 3.2. Efectos protectores de los metabolitos DHCA, DHFA y HHA a la exposición con TNF- $\alpha$ .

Para descartar que el tratamiento con TNF- $\alpha$  (10ng/mL, 24h) y los metabolitos afectaran negativamente a la viabilidad celular en las células 3T3-L1, se realizó un ensayo con los diferentes metabolitos a las distintas concentraciones estudiadas (Figura 2).

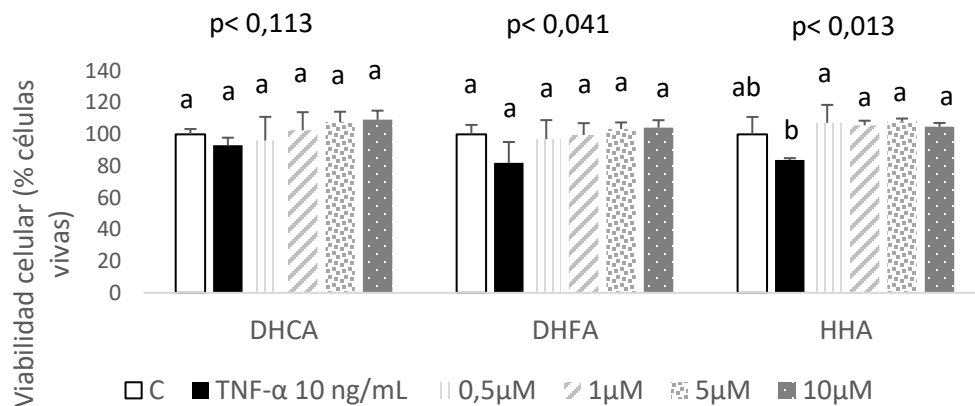


Figura 2. Viabilidad celular en células 3T3-L1 sometidas a 0 (control, C), o a 10 ng/mL de TNF-α junto a los metabolitos DHCA, DHFA o HHA a 0.5, 1, 5 y 10 μM, durante 24 horas.

### 3.3. Efectos protectores de los metabolitos frente a la inflamación

Se realizó el cotratamiento de las células 3T3-L1 con TNF- α a la concentración elegida de 10 ng/mL, así como con los metabolitos DHFA, DHCA y HHA a las concentraciones de 0.5, 1, 5 y 10 μM, midiéndose la producción de IL-6 (Figura 3).

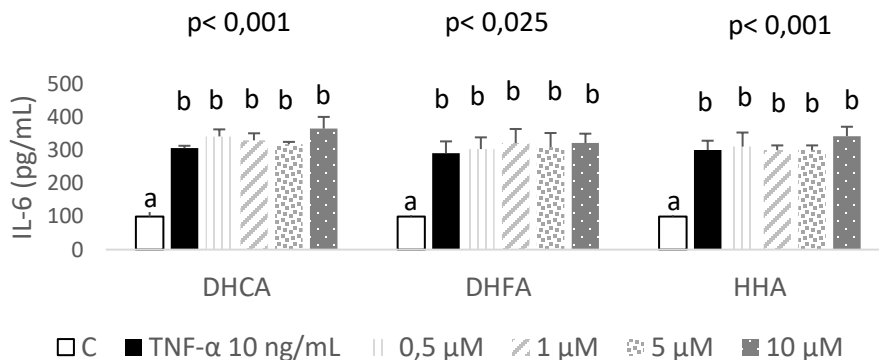


Figura 3. Producción de IL-6 en células 3T3-L1 sometidas a 0 (control, C), o a 10 ng/mL de TNF-α junto a los metabolitos DHCA, DHFA o HHA a 0.5, 1, 5 y 10 μM, durante 24 horas.

### 3.4. Efectos protectores de los metabolitos en respuesta a los biomarcadores de estrés oxidativo

A través de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Figura 4) y glutatión (GSH) (Figura 5), se quiso comparar los efectos obtenidos con la exposición a distintas concentraciones (0.5, 1, 5 y 10 μM) de cada uno de los tres metabolitos (DHCA, DHFA y HHA) sobre el estado de estrés oxidativo de las células.

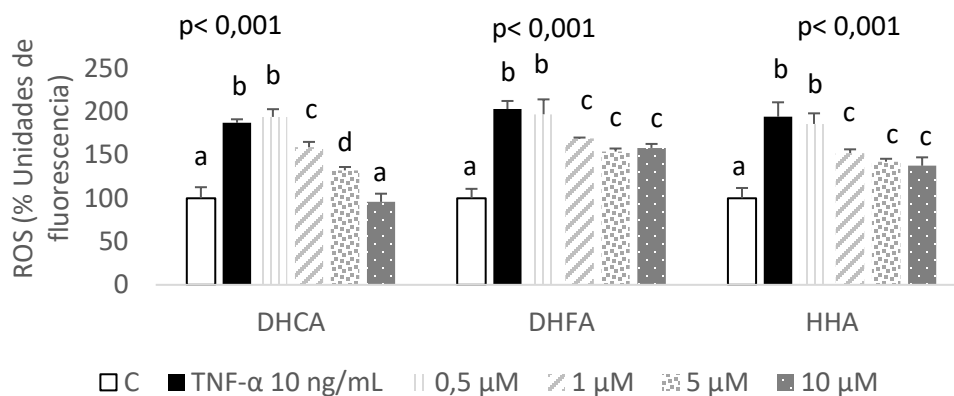


Figura 4. Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células 3T3-L1 sometidas a 0 (control, C), o a 10 ng/mL de TNF-α junto a los metabolitos DHCA, DHFA o HHA a 0.5, 1, 5 y 10 μM, durante 24 h.

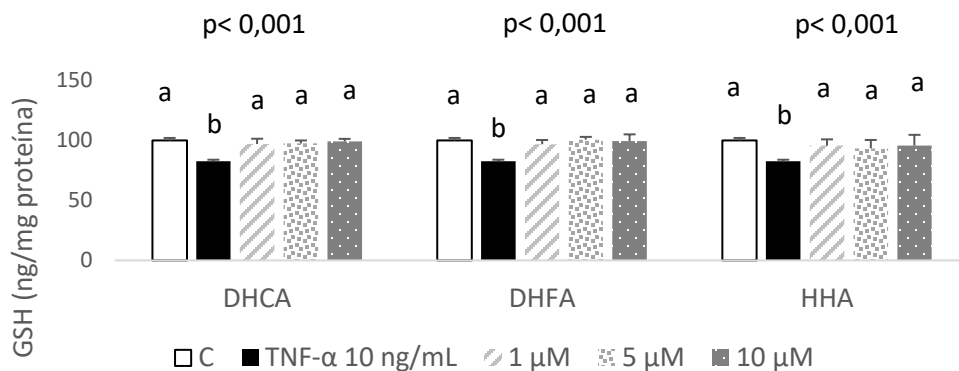


Figura 5. Producción de glutatión reducido (GSH) en células 3T3-L1 sometidas a 0 (control, C), o a 10 ng/mL de TNF-α junto a los metabolitos DHCA, DHFA o HHA a 0.5, 1, 5 y 10 μM, durante 24 h.

#### 4. DISCUSIÓN

La línea 3T3-L1, que deriva de células embriónicas de ratón, se utilizan en investigación sobre tejido adiposo ya que tienen una morfología similar a la de los fibroblastos y, en las condiciones apropiadas, se diferencian en un fenotipo similar al de los adipocitos [4]. Por lo tanto, las células 3T3-L1 se pueden emplear para estudiar los mecanismos celulares implicados en la obesidad, diabetes y desórdenes asociados. Estudios previos con 3T3-L1 usaron otros agentes proinflamatorios, como son el lipopolisacárido, el ácido palmítico o el TNF-α, a distintos tiempos y concentraciones [5]. Sin embargo, en este trabajo se ha empleado el TNF-α, que está menos estudiado como agente proinflamatorio, ya que, atendiendo a los resultados en otros trabajos realizados en otras líneas celulares, se observa que presenta potencial para ser empleado en un modelo de inflamación/oxidación. Otro aspecto novedoso del presente estudio es que se determinó el grado de inflamación mediante la producción de IL-6, a diferencia de otros trabajos que evalúan cambios en la expresión de proteínas implicadas en la inflamación. Las concentraciones y tiempos



que se emplearon fueron seleccionados de acuerdo con estudios anteriores, que describían los efectos de concentraciones de 10 hasta 40 ng/mL, o incluso 50 ng/mL medidos después de 2 hasta 24 horas de exposición [6], o bien una concentración de TNF- $\alpha$  de 10 ng/mL a distintos tiempos 16, 32, o 48 horas [7] o 30 horas [8].

En cuanto a los efectos antioxidantes de los metabolitos estudiados, se pudo observar como a concentraciones más bajas (0.5  $\mu$ M), no hubo diferencias significativas en cuanto a la producción de ROS en comparación con las células tratadas con TNF- $\alpha$  (sin metabolitos). Sin embargo, a las otras concentraciones (1, 5 y 10  $\mu$ M) de DHCA, DHFA y HHA hubo una disminución de ROS, dosis-dependiente, así como de la concentración de GSH, que fue reestablecida a los valores del control. Cabe destacar que DHCA fue el que produjo una mayor protección frente a la oxidación. Por el contrario, el tratamiento con los metabolitos no contrarrestó el aumento en la producción de IL-6 inducido por TNF- $\alpha$ . Habría que ahondar en la investigación de los efectos de DHCA, DHFA y HHA sobre la inflamación a través de la determinación de otras moléculas proinflamatorias.

## 5. CONCLUSIONES

Se ha desarrollado un modelo de inflamación/oxidación en las células 3T3-L1, que consiste en la exposición a TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) durante 24 horas. Los metabolitos colónicos mayoritarios del café: DHCA, DHFA y HHA a distintas concentraciones (0.5, 1. 5 y 10  $\mu$ M) junto con TNF- $\alpha$  (10 ng/mL, 24h) no afectaron a la viabilidad celular en 3t3-L1. Los metabolitos estudiados mostraron efectos antioxidantes a través de reducir la producción de ROS de forma dosis dependiente y la recuperación de los niveles de glutatión reducido, pero no mostraron efectos antiinflamatorios.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Blancas-Flores, G., Almanza-Pérez, J.C., López-Roa, R.I., et al. (2010). La obesidad como un proceso inflamatorio. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 67(2), 88-97.
2. Castro-Barquero, S., Lamuela-Raventós, R.M., Doménech, M. & Estruch, R. (2018). Relationship between Mediterranean dietary polyphenol intake and obesity. *Nutrients*, 10(10), 1523.
3. Gómez-Juaristi, M., Martínez-López, S., Sarria, B., et al. (2018). Bioavailability of hydroxycinnamates in an instant green/roasted coffee blend in humans. Identification of novel colonic metabolites. *Food & Function*, 9(1), 331-343.
4. Clavijo, M.A., Gómez Camargo, D., Gómez Alegría, A. (2007). Adipogénesis in vitro de células 3T3-L1. *Revista Med*, 15(2), 170-176.
5. Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, et al. (2002). Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 290(3), 1084-1089.
6. Wang, S., Sarriá, B., Mateos, R., Goya, L. & Bravo-Clemente, L. (2019). TNF- $\alpha$ -induced oxidative stress and endothelial dysfunction in EA.hy926 cells is prevented by mate and green coffee extracts, 5-caffeoylquinic acid and its microbial metabolite, dihydrocaffeic acid. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 70(3), 267-284.
7. Chang E, Choi JM, Kim WJ, et al. (2014). Restoration of adiponectin expression via the ERK pathway in TNF $\alpha$ -treated 3T3-L1 adipocytes. *Molecular Medicine Report*, 10(2), 905-910.
8. Araki, S., Dobashi, K., Kubo K, et al. (2006). N-acetylcysteine attenuates TNF-alpha induced changes in secretion of interleukin-6, plasminogen activator inhibitor-1 and adiponectin from 3T3-L1 adipocytes. *Life Sciences*, 79(25), 2405-2412.

**77025: Estudio de asociación genética entre Diabetes Mellitus tipo 1 y Enfermedad Celiaca - Genetic association study between Type 1 Diabetes Mellitus and Celiac Disease****Área de conocimiento:** NUTRICIÓN HUMANA Y DIETÉTICA**Autor(es):** Ana Calvo Madueño**Tutor(es):** Ana María López Parra**Universidad:** Universidad Complutense de Madrid**Facultad:** Facultad de Medicina**Titulación:** Grado en Nutrición Humana y Dietética**Formato:** Comunicación Oral - Investigación clínica**Palabras Clave:** Palabras clave: "Diabetes Mellitus tipo I", "Enfermedad Celiaca", "genes HLA", "TagSNP", "enfermedades autoinmunes". - Keywords: "Type 1 Diabetes Mellitus", "Celiac Disease", "HLA genes", "TagSNP", "autoimmune disease".

Antecedentes: Aproximadamente el 8% de los pacientes con Diabetes Mellitus tipo I (DM1) presenta además Enfermedad Celiaca (EC). Se ha observado una mayor prevalencia a ambas enfermedades las personas con determinados perfiles de HLA-DQ. Este trabajo tiene como objetivo determinar si estos marcadores permiten el diagnóstico en casos de la presencia de ambas enfermedades. Para ellos se van a estudiar cuatro cohortes distintas: individuos sin DM1, EC ni ninguna patología autoinmune, individuos con DM1, individuos con EC e individuos con DM1 y EC. Además, se realizará un análisis de su dieta en relación con el consumo de gluten.

Material y métodos: Para analizar el e genotipo de cada individuo se emplearán seis TagSNP, a partir de los cuales se podrán determinar los genotipos DQ2.2, DQ2.5, DQ7 y DQ8.

Resultado: Actualmente se están obteniendo los primeros resultados del genotipado.

Conclusiones: Se espera poder aportar un sistema de diagnóstico genético para ambas enfermedades. Además, se pretende establecer algún tipo de asociación genética en base a mutaciones comunes. Por otra parte, a partir de análisis de las encuestas nutricionales, indicar si sería preciso recomendar la retirada de gluten de la dieta de individuos con DM1 que presenten marcadores genéticos de EC.

Background: Approximately 8% of patients with Type I Diabetes Mellitus (DM1) also have Celiac Disease (CD). A higher prevalence of both diseases has been observed in people with certain HLA-DQ profiles.

This work aims to determine if these markers allow diagnosis in cases of the presence of both diseases. Four different cohorts will be studied for them: individuals without DM1, CD or any autoimmune pathology, individuals with DM1, individuals with CD and individuals with DM1 and CD. In addition, an analysis of your diet will be carried out in relation to the consumption of gluten.

Material and methods: To analyze the genotype of each individual, six TagSNPs will be used, from which the DQ2.2, DQ2.5, DQ7 and DQ8 genotypes can be determined.

Result: The first genotyping results are currently being obtained.

Conclusions: It is expected to be able to provide a genetic diagnosis system for both diseases. In addition, it is intended to establish some type of genetic association based on common mutations. On the other hand, based on the analysis of nutritional surveys, indicate whether it would be necessary to recommend the removal of gluten from the diet of individuals with DM1 who present genetic markers of CD.

## Estudio de asociación genética entre Diabetes Mellitus tipo 1 y Enfermedad Celiaca

### Genetic association study between Type 1 Diabetes Mellitus and Celiac Disease

- Nº identificador del autor: 1480745, Ana Calvo Madueño [anacal04@ucm.es](mailto:anacal04@ucm.es)
  - Tutor: Ana María López Parra, [amlopezparra@med.ucm.es](mailto:amlopezparra@med.ucm.es)
  - Afiliaciones: Dpto. de Medicina Legal, Psiquiatría y Patología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid
  - Resumen (Abstract):
    - Fundamento: Aproximadamente el 8% de los pacientes con Diabetes Mellitus tipo I (DM1) presenta además Enfermedad Celiaca (EC). Se ha observado una mayor prevalencia a ambas enfermedades las personas con determinados perfiles de HLA-DQ. Este trabajo tiene como objetivo determinar si estos marcadores permiten el diagnóstico en casos de la presencia de ambas enfermedades. Para ellos se van a estudiar cuatro cohortes distintas: individuos sin DM1, EC ni ninguna patología autoinmune, individuos con DM1, individuos con EC e individuos con DM1 y EC. Además, se realizará un análisis de su dieta en relación con el consumo de gluten.
    - Material y métodos: Para analizar el e genotipo de cada individuo se emplearán seis TagSNP, a partir de los cuales se podrán determinar los genotipos DQ2.2, DQ2.5, DQ7 y DQ8.
    - Resultado: Actualmente se están obteniendo los primeros resultados del genotipado.
    - Conclusiones: Se espera poder aportar un sistema de diagnóstico genético para ambas enfermedades. Además, se pretende establecer algún tipo de asociación genética en base a mutaciones comunes. Por otra parte, a partir de análisis de las encuestas nutricionales, indicar si sería preciso recomendar la retirada de gluten de la dieta de individuos con DM1 que presenten marcadores genéticos de EC.
  - Background: Approximately 8% of patients with Type I Diabetes Mellitus (DM1) also have Celiac Disease (CD). A higher prevalence of both diseases has been observed in people with certain HLA-DQ profiles. This work aims to determine if these markers allow diagnosis in cases of the presence of both diseases. Four different cohorts will be studied for them: individuals without DM1, CD or any autoimmune pathology, individuals with DM1, individuals with CD and individuals with DM1 and CD. In addition, an analysis of your diet will be carried out in relation to the consumption of gluten.
  - Material and methods: To analyze the genotype of each individual, six TagSNPs will be used, from which the DQ2.2, DQ2.5, DQ7 and DQ8 genotypes can be determined.
  - Result: The first genotyping results are currently being obtained.
  - Conclusions: It is expected to be able to provide a genetic diagnosis system for both diseases. In addition, it is intended to establish some type of genetic association based on common mutations. On the other hand, based on the analysis of nutritional surveys, indicate whether it would be necessary to recommend the removal of gluten from the diet of individuals with DM1 who present genetic markers of CD.
- Palabras clave: “Diabetes Mellitus tipo I”, “Enfermedad Celiaca”, “genes HLA”, “TagSNP”, “enfermedades autoinmunes”.
  - Keywords: “Type 1 Diabetes Mellitus”, “Celiac Disease”, “HLA genes”, TagSNP”, “autoimmune disease”.

## 1. Introducción

La diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) es la responsable de la diabetes en el 10% de la población diabética española, estimándose una prevalencia en la población general del 0,2%. Aproximadamente, el 8% de los pacientes con DM1 presentan además EC. La teoría más aceptada es que la coexistencia de estas dos patologías es debido a que ambas comparten marcadores genéticos, aunque no se ha encontrado una relación causal. (Goodwin, 2019; Martín-Cabrejas et al., 2021)

La EC es una patología autoinmune provocado por la exposición al gluten en personas genéticamente predispuestos. Los síntomas más frecuentes son los intestinales, como diarrea malabsortiva, pérdida de peso, colon irritable y/o estreñimiento, pero también aparecen síntomas extraintestinales, como dermatitis herpetiforme, irritabilidad, depresión, astenia, anemia ferropénica, osteoporosis, artritis, infertilidad, etc.

El gluten es una proteína que se encuentra en cereales como el trigo, el centeno, la cebada, la espelta, el triticale, algunas variedades de avena, así como sus híbridos y derivados. (Husby et al., 2012; Martín-Cabrejas et al., 2021)

El gluten del trigo esta formado por una serie de estructuras proteicas que reciben el nombre de gliadinas, las cuales atraviesan el tracto digestivo prácticamente inalterables debido a que son muy resistentes a las enzimas del estómago, páncreas e intestino. Durante la digestión, las gliadinas atraviesan el epitelio intestinal por las uniones estrechas que se encuentran entre los enterocitos, llegando a la lámina propia, que es donde se desencadena la respuesta inmunitaria (Aboulaghras et al., 2022).

Los principales marcadores genéticos asociados con la predisposición a desarrollar EC son los genes que codifican para las moléculas HLA-DQ2 y HLA-DQ8. El 95% de los pacientes celíacos poseen HLA-DQ2 y el 5% restante poseen HLA-DQ8. (Husby et al., 2012; Monsuur et al., 2008)

Por otra parte, la DM1 también es una enfermedad autoinmune, caracterizada por la destrucción de las células beta productoras de insulina, presentes en el páncreas. Esto conduce a una deficiencia de insulina. La mayoría de estos pacientes presentan los haplotipos HLA-DR3 o HLA-DR4. Además, el 95% de los pacientes con DM1 poseen HLA-DR4 y uno de los alelos de HLA-DQ8, lo que indica la importancia de las moléculas HLA-DQ en el desarrollo de la DM1. (Goodwin, 2019; Ocaña-Pérez, 2016; Vidan-Jeras, 2018)

Los objetivos del presente trabajo son:

Objetivo principal: Determinar si el análisis de marcadores HLA-DQ permiten el diagnóstico en casos de la presencia de ambas enfermedades .

Objetivos secundarios:

1. Valorar la ingesta de gluten presente en la dieta de los individuos con DM1.
2. Determinar los marcadores genéticos HLA que se han asociado con una predisposición genética de EC.
3. Valorar la asociación conjunta de marcadores HLA y consumo de gluten con la presencia de las patologías consideradas.

## 2. Material y métodos

### Revisión bibliográfica

La búsqueda de información de este trabajo se ha realizado fundamentalmente en la base de datos PubMed.

En la estrategia de búsqueda se emplearon las siguientes palabras clave: “celiac disease”, “type 1 diabetes and celiac disease”, “celiac disease and HLA typing”, en la que se incluyeron artículos originales (no revisiones) y revisiones bibliográficas, en inglés, publicados en los años de 2016 a 2023 y excluyéndose estudios en animales.

Además, se añadió información de otras fuentes de internet como la página web de FACE (Federación de Asociaciones de Celiacos de España).

### Reclutamiento de casos y de controles

El presente trabajo, con código 22/422-E\_TFG ha sido aprobado por el Comité de Ética de Investigación del Hospital Clínico San Carlos.

El reclutamiento de casos y de controles fue realizado con la participación de la Asociación de Diabetes de Madrid y FACE (Federación de Asociaciones de Celíacos de España).

Hasta el momento (10/03/23) se han recogido las siguientes muestras de voluntarios estableciéndose cuatro cohortes:

- 86 Individuos de control (ausencia de DM1, ausencia de EC y ausencia de otras patologías autoinmunes).
- 36 Pacientes con DM1
- 15 Pacientes con EC
- 6 Pacientes con DM1 y EC

A cada voluntario se le ha entregado un documento de consentimiento informado explicando el procedimiento del estudio. Una vez que el voluntario estuvo de acuerdo, comprendió, firmó y entregó el consentimiento informado, se procedió a la toma de muestra.

En este documento se incluyeron dos cuestionarios:

- Cuestionario 1: cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos, con el fin de valorar la ingesta de gluten presente en la dieta de los individuos.
- Cuestionario 2: cuestionario que recoge el lugar de nacimiento del voluntario, el lugar de nacimiento de los padres del voluntario y el lugar de nacimiento de los cuatro abuelos (maternos y paternos) del voluntario.

### Recogida y toma de muestras

La recogida y toma de muestras ha sido realizada en el Laboratorio del Grupo de Genética Forense y Genética de Poblaciones de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

La muestra de los participantes ha sido tomada mediante una punción en uno de los dedos de una mano con una lanceta estéril, depositando unas gotas de sangre en una tarjeta FTA.

### Análisis del genotipo

En primer lugar, se ha realizado la extracción de ADN a partir de la muestra de sangre seca depositada en una tarjeta FTA siguiendo el protocolo del kit de extracción de ADN de Biotools (SPEEDTOOLS TISSUE DNA Extraction kit).

A continuación, se llevo a cabo la amplificación de ADN mediante PCR usando seis marcadores TagSNP asociados a haplotipos de HLA, siguiendo un protocolo modificado de (Monsuur et al., 2008). Se han diseñado los oligos que amplifican las Tags SNPs, con el objetivo de mejorar el rendimiento de la PCR a través de la amplificación de fragmentos más cortos.

Después se confirmó la amplificación de los 6 marcadores mediante una electroforesis en gel de agarosa.

Tras ello, se procede a la purificación del ADN mediante la digestión de la enzima Exosap, y posteriormente se envió a secuenciar a la empresa MacroGen donde emplearán secuenciación Sanger.

Por último, para la lectura de los resultados de la secuenciación se emplea el software Mutation Surveyor V4.0.9.

### **3. Resultados**

Actualmente se ha analizado el haplotipo DQ2.5 de 58 individuos, de los cuales 33 son individuos de control, 4 son pacientes con EC y 21 son pacientes con DM1.

Se ha empleado el TagSNP rs2187668 (G) para determinar la presencia del haplotipo DQ2.5. En la Tabla 1 se recogen las frecuencias genotípicas y las frecuencias alélicas obtenidas.

Tabla 1. Frecuencias genotípicas y frecuencias alélicas de DQ2.5.

Frecuencias DQ2.5	Controles	Celiaquía	Diabetes
Frecuencias genotípicas homocigotos (GG)	0,88	0	0
Frecuencias genotípicas homocigotos (AA)	0	0,03	0,03
Frecuencias genotípicas heterocigotos (GA)	1,33	0,09	0,3
Frecuencias alélicas (G)	0,94	0,04	0,15
Frecuencias alélicas (A)	0,06	0,07	0,48

Frecuencias genotípicas y frecuencias alélicas de DQ2.5 de un total de 58 individuos:

- De 33 individuos de control, 4 resultaron ser heterocigotos para DQ2.5.
- De 4 pacientes con EC, 3 de ellos son heterocigotos y uno de ellos homocigoto para DQ2.5
- De 21 pacientes con DM1, 10 de ellos son heterocigotos y uno de ellos homocigoto para DQ2.5

#### **4. Discusión**

El protocolo ha demostrado ser eficaz ya que se han analizado hasta ahora 58 individuos.

Respecto a los genotipos, se espera poder presentar genotipos completos y resultados preliminares durante el congreso dado que no se han terminado de recoger todas las muestras. A pesar de ser resultados preliminares ya se observa una mayor frecuencia del alelo DQ 2.5 en los pacientes respecto a la población sana.

#### **5. Conclusiones**

Se esperan conseguir resultados de esta investigación para obtener más conclusiones respecto a la asociación genética entre la DM1 y la EC así como lograr una conclusión sobre si sería preciso recomendar la retirada de gluten de la dieta de individuos con DM1 que presenten marcadores genéticos de EC.

## 6. Referencias bibliográficas

- Aboulaghras, S., Piancatelli, D., Oumhani, K., Balahbib, A., Bouyahya, A., & Taghzouti, K. (2022). Pathophysiology and immunogenetics of celiac disease. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 528, 74-83. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2022.01.022>
- Goodwin, G. (2019). Type 1 Diabetes Mellitus and Celiac Disease: Distinct Autoimmune Disorders That Share Common Pathogenic Mechanisms. *Hormone Research in Paediatrics*, 92(5), 285-292. <https://doi.org/10.1159/000503142>
- Husby, S., Koletzko, S., Korponay-Szabó, I. R., Mearin, M. L., Phillips, A., Shamir, R., Troncone, R., Giersiepen, K., Branski, D., Catassi, C., Lelgeman, M., Mäki, M., Ribes-Koninckx, C., Ventura, A., Zimmer, K. P., ESPGHAN Working Group on Coeliac Disease Diagnosis, ESPGHAN Gastroenterology Committee, & European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. (2012). European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 54(1), 136-160. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e31821a23d0>
- Martín-Cabrejas, I., Van der Hofstadt, M., Campos-Caamaños, A., & Fernández-Barreña, A. (2021). *Manual de la enfermedad celiaca*. <https://celiacos.org/wp-content/uploads/2021/05/Manual-de-la-EC-1.3-SEEC.pdf>
- Monsuur, A. J., de Bakker, P. I. W., Zhernakova, A., Pinto, D., Verduijn, W., Romanos, J., Auricchio, R., Lopez, A., van Heel, D. A., Crusius, J. B. A., & Wijmenga, C. (2008). Effective Detection of Human Leukocyte Antigen Risk Alleles in Celiac Disease Using Tag Single Nucleotide Polymorphisms. *PLoS ONE*, 3(5), e2270. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002270>
- Ocaña-Pérez, E. (2016). *MOLECULAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD Y ENFERMEDADES ASOCIADAS*. 22, 10.
- Vidan-Jeras, B. (2018). When type 1 diabetes meets celiac disease. *HLA*, 92 Suppl 2, 64-66. <https://doi.org/10.1111/tan.13441>



**76707: EVIDENCIAS CIENTÍFICAS DE LA TERAPIA OCUPACIONAL EN LA RIZARTROSIS. SCIENTIFIC EVIDENCE OF OCCUPATIONAL THERAPY IN RHIZARTHRISIS****Área de conocimiento:** TERAPIA OCUPACIONAL**Autor(es):** Alberto Calderón Rivero, Adrián Roldán Martínez**Tutor(es):** Luis Alfonso Arráez Aybar, Carlos Miquel García de Pereda Notario**Universidad:** Universidad Complutense de Madrid**Facultad:** Medicina**Titulación:** Grado en Terapia Ocupacional**Formato:** Comunicación Oral - Revisiones bibliográficas**Palabras Clave:** Palabras claves: osteoartritis trapeziometacarpiana, rizartrrosis, terapia ocupacional. Key words: trapeziometacarpal osteoarthritis, rhizartrrosis, occupational therapy.

Resumen:

Objetivos: hallar evidencias científicas de la Terapia Ocupacional en la rehabilitación de la osteoartritis o rizartrrosis de la articulación trapeziometacarpiana.

Material y métodos: estudio bibliométrico durante los meses de febrero y marzo de 2023 en la base de datos "PubMed". Los principales criterios de selección son documentos de Terapia Ocupacional que aborden la osteoartritis de la articulación trapecio-metacarpiana, en inglés, castellano o alemán, desde la fecha de su primera publicación hasta marzo del 2023.

Resultados: Se obtuvieron 10 resultados de documentos en total. La calidad metodológica se evaluó mediante la escala PEDro. 2 de 9 artículos escogidos obtuvieron una puntuación igual o superior a 6, indicando alta calidad metodológica.

Conclusiones: evidencias científicas de la Terapia Ocupacional en la osteoartritis de la articulación trapecio-metacarpiana, baja cifra de documentación bibliográfica de Terapia Ocupacional y rizartrrosis, falta de artículos sobre la profesión y su intervención en la patología y escalas de valoración de Terapia Ocupacional.

Abstract:

Objective: find scientific evidence of Occupational Therapy in the rehabilitation of osteoarthritis or rhizartrrosis of the trapeziometacarpal joint.

Material and methods: bibliographic study during the months of February and March 2023 in the "PubMed" database. The main selection criteria are Occupational Therapy documents that approach Trapeziometacarpal Osteoarthritis, in English, Spanish or German, from the date of their first publication until March 2023.

Result: tota result of 10 document results. Methodological quality was assessed using the PEDro scale. 2 of 9 selected articles obtained a score equal to or larger than 6, indicating high methodological quality.

Conclusion: scientific evidence of Occupational Therapy in Osteoarthritis of trapeziometacarpal joint, low quantity of bibliographic documentation of Occupational Therapy and rhizartrrosis, shortage of articles on the profession and its intervention in the pathology and valuation test in Occupational Therapy.

# EVIDENCIAS CIENTÍFICAS DE LA TERAPIA OCUPACIONAL EN LA RIZARTROSIS

## SCIENTIFIC EVIDENCE OF OCCUPATIONAL THERAPY IN RHIZARTHROSIS

**Autores:** Nº 1518697, Alberto Calderón Rivero, [albecald@ucm.es](mailto:albecald@ucm.es)

Nº 1518697, Adrián Roldán Martínez, [adroidan@ucm.es](mailto:adroidan@ucm.es)

**TUTORES:** Luis Alfonso Arráez Aybar, [arraezla@med.ucm.es](mailto:arraezla@med.ucm.es)

Carlos Miquel García de Pereda Notario, [cmperedanotario@ucm.es](mailto:cmperedanotario@ucm.es)

**FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

### **Resumen:**

*Objetivos:* hallar evidencias científicas de la Terapia Ocupacional en la rehabilitación de la osteoartritis o rizartrrosis de la articulación trapeciometacarpiana.

*Material y métodos:* estudio bibliométrico durante los meses de febrero y marzo de 2023 en la base de datos "PubMed". Los principales criterios de selección son documentos de Terapia Ocupacional que aborden la osteoartritis de la articulación trapecio-metacarpiana, en inglés, castellano o alemán, desde la fecha de su primera publicación hasta marzo del 2023.

*Resultados:* Se obtuvieron 10 resultados de documentos en total. La calidad metodológica se evaluó mediante la escala PEDro. 2 de 9 artículos escogidos obtuvieron una puntuación igual o superior a 6, indicando alta calidad metodológica.

*Conclusiones:* evidencias científicas de la Terapia Ocupacional en la osteoartritis de la articulación trapecio-metacarpiana, baja cifra de documentación bibliográfica de Terapia Ocupacional y rizartrrosis, falta de artículos sobre la profesión y su intervención en la patología y escalas de valoración de Terapia Ocupacional.

*Palabras claves:* osteoartritis trapeciometacarpiana, rizartrrosis, terapia ocupacional.

### **Abstract:**

*Objective:* find scientific evidence of Occupational Therapy in the rehabilitation of osteoarthritis or rhizartrrosis of the trapeziometacarpal joint.

*Material and methods:* bibliographic study during the months of February and March 2023 in the "PubMed" database. The main selection criteria are Occupational Therapy documents that approach Trapeziometacarpal Osteoarthritis, in English, Spanish or German, from the date of their first publication until March 2023.

*Result:* tota result of 10 document results. Methodological quality was assessed using the PEDro scale. 2 of 9 selected articles obtained a score equal to or larger than 6, indicating high methodological quality.

*Conclusion:* scientific evidence of Occupational Therapy in Osteoarthritis of trapeziometacarpal joint, low quantity of bibliographic documentation of Occupational Therapy and rhizartrrosis, shortage of articles on the profession and its intervention in the pathology and valuation test in Occupational Therapy.

*Key words:* trapeziometacarpal osteoarthritis, rhizartrrosis, occupational therapy.

## **1. INTRODUCCIÓN**

La articulación trapecio-metacarpiana (ATM) une al trapecio con el I metacarpiano. Es una articulación sinovial compleja situada en la base del pulgar que articula con el escafoides, trapecoide y parte radial de la base del II metacarpiano. El encaje entre ambos componentes

óseos es en forma de silla de montar, otorgándole gran rango de movilidad. Realiza los siguientes movimientos: flexión-extensión, abducción-aducción y oposición. Convierte al primer dedo en un elemento fundamental en tareas manipulativas, posibilitando el pellizco y prensión. Esto separó al hombre (*Homo sapiens*) de su condición antropológica de los antepasados (Kuo, Cooney, An, Lai, Wang y Su, 2009).

Con el paso del tiempo y el sufrimiento de lesiones traumáticas, los elementos musculoesqueléticos se desgastan (ligamento oblicuo anterior, tendones (abductor largo pulgar) y cápsula articular), incrementando el espacio de contacto de superficies óseas y aumentando la inestabilidad articular. Esto y la exposición a grandes esfuerzos, durante el pellizco o el agarre produce la osteoartritis (OA) en la ATM (Pai, Talwalkar y Hayton, 2006).

Los pacientes muestran sintomatología de dolor localizado en la base del pulgar, rigidez y debilidad con deformidad en la aducción-flexión del I metacarpiano compensada el pulgar hacia delante (Bock, Eisenschenk, Lorenzen y Lautenbach, 2020).

Es una de las patologías de mano más comunes entre la población general (8%-12%)(Villafañe, Langford, Alguacil-Diego y Fernández-Carnero 2013). Predomina en mujeres a partir de los 50 años, especialmente postmenopáusicas (33%). En hombres mayores de 55 es un 11% (Pogliacomì, Oldani, Schiavi, Pedrazzini, Vaienti y Calderazzi 2021).

Desde Terapia Ocupacional (TO) se aplican técnicas conservadoras, reservando la cirugía para síntomas incapacitantes y pérdida de función (Pai, Talwalkar y Hayton, 2006).

La OA TMP es de interés para la TO ya que dificulta los tipos de agarre, prensión y pinzas que realiza el pulgar. Afecta a las actividades de la vida diaria (girar la llave de la puerta, sostener una taza de café, abrir frascos o coser) ya que el pulgar contribuye en el 70% de la función de la mano durante la realización de tareas (Arana-Echeverría y Sánchez, 2010).

El objetivo de nuestro trabajo es hallar evidencias científicas de la TO en la rizartrrosis.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

Bases de datos: PubMed

Estrategía de búsqueda: la búsqueda bibliográfica se cerró el 15 de marzo de 2023 en “PubMed”. Para las búsquedas usamos los términos en combinación de operadores booleanos: “Trapeziometacarpal Osteoarthritis” OR “Rhizartrrosis” AND “Occupational Therapy”.

Criterios de selección : reflejados en la Tabla 1.

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
Estudios y artículos publicados desde la fecha de su primera publicación hasta marzo del año 2023	Documentos duplicados
Idioma: inglés, castellano o alemán	
Mencione Terapia Ocupacional, terapeuta ocupacional o terapeuta de mano (título, keywords, abstract o texto completo)	
Relevancia anatomía, biomecánica o fisiopatología para Terapia Ocupacional	
Tratamiento rehabilitador conservador en pacientes con rizartrrosis	

Tabla 1. Criterios de inclusión y exclusión.

## 3. RESULTADOS

Se consideran un total de 10 artículos que cumplen los criterios de inclusión de la Tabla 1 y el diagrama de flujo de la Tabla 2. Descartamos uno por no estar relacionado con TO. Los documentos fueron evaluados con la escala PEDro, instrumento que indica calidad metodológica alta si obtiene una puntuación igual o superior a 6 puntos. De estos 9 documentos solo 2 superaron o igualaron la puntuación de 6 como se refleja en la Tabla 2, Valdes y cols. (2014) y Pogliacomì y cols. (2021).

Términos	N.º artículos
Trapeziometacarpal Osteoarthritis	735
Rhizarthrosis	100
Trapeziometacarpal Osteoarthritis or rhizarthrosis	797
<b>Trapeziometacarpal Osteoarthritis or rhizarthrosis &amp; Occupational Therapy</b>	<b>10</b> (2 revisiones y 8 estudios)

Tabla 2. Diagrama de flujo.

#### 4. DISCUSIÓN

Esta revisión bibliográfica (base de nuestro Trabajo de Fin Grado) ha recabado información sobre la evidencia científica de TO en la rehabilitación de la OA TMC y la eficacia de la misma. En el transcurso de este trabajo, hemos constatado la escasez de referencias bibliográficas en relación a la rizartrrosis, pues no hay muchas publicaciones desde TO.

La revisión sobre la ATM realizada por Pai y cols. (2006) habla de los objetivos del tratamiento desde TO en OA. Estos son: restaurar la funcionalidad del pulgar, reducir el dolor, aumentar la estabilidad, la motilidad, modificando la actividad y la fuerza, con ayuda de férulas. Estas reducen la subluxación en pacientes en estadios bajos, pero no parecen aumentar la fuerza de pellizco o intervenir en el dolor asociados. Al tratarse de una revisión no es posible aplicar la escala PEDro y probar su evidencia científica.

Según Aebischer y cols. (2015) se ha observado una reducción de intervenciones quirúrgicas en rizartrrosis tras terapia manual (ejercicios de estabilización, rango de movimiento y fortalecimiento). Indican que la terapia multimodal (TO y fisioterapia), empleo de férulas, programa de ejercicios, educación en protección articular y estrategias (ergonomía) resultan efectivas. Es una revisión bibliográfica por lo que no se ha podido aplicar la escala PEDro.

Valdes y cols. (2014) realizan un estudio de cohortes aleatoria prospectiva en personas con rizartrrosis, con puntuación de 6 en PEDro. Comentan también que existe evidencia de mejora con educación en protección articular y práctica de ejercicios. Reduce el dolor y aumenta la función. Destacan el papel de las férulas en espiga de neopreno o termoplástico. Ambas producen disminución del dolor, aumento de fuerza de agarre, pellizco y funcionalidad. Concluye que los participantes que utilizaron dispositivo ortopédico personalizado frente a prefabricados, logran una diferencia clínica y estadística significativa (13 puntos escala DASH).

Según Villafañe y cols. (2013), una de las técnicas conservadoras utilizadas actualmente es *Mobilization With Movement*. Se realizan movilizaciones pasivas, activas y se ejerce presión sobre la ATM que reduce el dolor y restablece el alineamiento articular. Otra técnica complementaria es la utilización de cintas kinesiológicas, favoreciendo la circulación linfática/venosa, el alineamiento muscular/articular y reduce inputs de receptores nociceptivos disminuyendo el dolor. Este artículo tiene una puntuación insuficiente en la escala PEDro pero próxima al valor de referencia, por lo que no es demostrable una alta evidencia científica.

Uno de los documentos contiene una guía para la rehabilitación de rizartrrosis por un terapeuta de mano. Bock y cols. (2020) establecen 6 pasos que definen la intervención:

1. Terapia manual: masaje de fricción transversal de los músculos tenares de la mano con intensidad moderada, aplicado dos veces con descanso entre ellas de 1 minuto.
2. Liberación muscular manual: estiramiento dorsal repetitivo de los músculos tenares durante 3 minutos seguidos de un descanso de 1 minuto.
3. Terapia manual: técnica de tracción para el alivio del dolor de grado medio-alto. Se realiza tres veces durante 1 minuto, seguido de un de 1 minuto de descanso

4. Ejercicio de fortalecimiento: 1ª articulación carpometacarpiana en abducción palmar, y la 1ª metacarpofalángica y articulaciones interfalángicas proximales en flexión. Se le pide al paciente que mantenga la oposición del pulgar con la yema del II dedo. Después le pedimos que extienda repetidamente el dedo índice manteniendo la posición del pulgar y vuelva a colocar el dedo índice en oposición con el I dedo, encontrándose con la punta del pulgar tres veces durante 1 minuto.
5. Ejercicio de fortalecimiento: la 1ª articulación carpometacarpiana está en abducción radial y moderada extensión. Se le pide al paciente que mantenga esa posición y realice abducción y aducción alternativa del II dedo durante 2 minutos para fortalecer la musculatura interóseo dorsal.
6. Ejercicio de fortalecimiento en casa: realizar adicionalmente un programa diario de ejercicios en casa idénticos a los párrafos 4 y 5 anteriores. Se explican los dos ejercicios y se proporciona un pictograma de ayuda.

Además de terapia de mano, proponen utilizar ultrasonido terapéutico para reducir el dolor y mejorar la función del pulgar. También influye en las cargas significativas de la enfermedad, como el dolor y el estrés psicoemocional o la pérdida de productividad (Bock, Eisenschenk, Lorenzen y Lautenbach, 2020). No hemos podido valorar la evidencia científica con PEDro ante la insuficiencia de datos, debido a que es un estudio en progreso no finalizado.

Las escalas utilizadas por TO según Pogliacomì y cols. (2021), para evaluar la progresión de los pacientes OA de la ATM son: VAS (dolor), DASH (discapacidad mano), PRWHE (discapacidad y dolor mano), Kapanji (técnica de evaluación neurológica). Este artículo presenta una puntuación de 6 en la escala PEDro, mostrando existencia de evidencia científica.

Destacar la importancia de la continuidad de TO por el paciente en el domicilio durante el proceso rehabilitador. Repartiendo la responsabilidad del proceso.

Un área ocupacional significativa para la TO y para los pacientes es la vuelta a la vida laboral de las personas con rizartrrosis. Hohendorff y cols. (2008) realizan un estudio longitudinal en el que se interviene quirúrgicamente 4 grupos distintos de pacientes según su ocupación laboral: trabajo manual pesado, manual ligero, oficinistas y amas de casa. Se puede esperar una ausencia de trabajo de 8 semanas del 100% de pacientes. El tiempo perdido de trabajo se correlaciona con la severidad de la actividad laboral. Las personas empleadas alcanzaron el 100% de su capacidad laboral después de 16 semanas. Alrededor del 90% de los pacientes pueden volver a trabajar como lo hacían antes de la operación (al mismo nivel) y el 70% comentan un dolor residual en la escala analógica visual (EVA) con un valor de alrededor de 3/10. El grupo de trabajadores manuales ligeros obtuvo una puntuación DASH mayor que el resto, aunque no significativa estadísticamente. A las 8 semanas, todas las actividades del hogar podrían administrarse nuevamente además del trabajo. Sin embargo, las amas de casa pudieron realizar todas las tareas domésticas nuevamente después de 12 semanas (3 meses), pudiendo volver al trabajo doméstico normal. Este resultado muestra que las actividades en el hogar pueden calificarse como actividades manuales más difíciles. El estudio tuvo una puntuación cercana al valor mínimo de validez, según escala PEDro.

## **5. CONCLUSIÓN**

Varias son las conclusiones que podemos extraer de nuestro estudio bibliométrico de la TO en la rizartrrosis. La primera de ellas es la escasez encontrada sobre el tema objeto de estudio. Tan solo 10 artículos de 797 (encontrados en PubMed) que hablan sobre rizartrrosis OR OA de la ATM mencionan a la TO, lo que supone la cifra del 1,25% del total. Este número disminuye al

evaluar metodológicamente con la escala PEDro, obteniendo 2 artículos que aborden la OA desde TO. Es una cifra muy baja que muestra la falta de investigación de TO.

La segunda esclarece las escalas de valoración empleadas en TO para la rehabilitación de rizartrrosis, que son VAS, DASH, PRWHE y Kapandji. Sirviendo como batería de pruebas.

La tercera es que no hemos encontrado artículos que nos proporcionen una guía de intervención de TO con evidencia científica en la rizartrrosis. Hablan de diferentes abordajes o técnicas, pero no de la planificación o procedimiento a seguir por TO. Esto es lo que hemos querido aportar en la discusión de este trabajo, proporcionar una guía de instrucciones que debe seguir la TO para realizar la intervención. La cuarta está ligada con la tercera. Hay pocas publicaciones debido quizás a que pocos terapeutas ocupacionales sienten la llamada de publicar en revistas científicas de reconocimiento internacional sus investigaciones o experiencias. Esto influye de manera directa en la promoción y reconocimiento de la TO entre el resto de profesionales sanitarios. Uno de los objetivos de este trabajo es alentar a todos los graduados o estudiantes de TO a que se introduzcan en la investigación, aportando prestigio y riqueza a esta profesión sociosanitaria.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

Aebischer, B., Elsig, S., & Taeymans, J. (2015). Effectiveness of physical and occupational therapy on pain, function and quality of life in patients with TRAPEZIOMETACARPAL osteoarthritis. A systematic review and meta-analysis. *Hand Therapy*. 21(1), 5–15.

Arana-Echeverría, J.L. y Sánchez, A. (2010). Bases científicas para el diseño de un programa de ejercicios para artrosis de manos. Unidad de Rehabilitación del Hospital Universitario Fundación Alcorcón. España: Madrid.

Bock, M., Eisenschenk, A., Lorenzen, H. y Lautenbach, M. (2020). Study of Medical Ultrasound for Rhizartrrosis (SUR): study protocol for a randomized controlled single-center pilot-trial. *Trials journal*. Vol.21, 1-9.

Hohendorff, B., Staub, L., Kaiser, T. y Von Wartburg, U. (2008). Working ability after tendon interposition arthroplasty for degenerative arthritis of the thumb trapeziometacarpal joint. *Handchir Mikrochir Plast Chir*. Vol. 40, 175-181.

Kuo, L.C., Cooney, W.P., An, K.N., Lai, K.Y., Wang, S.M. y Su F.C. (2009). Effects of age and gender on the movement workspace of the trapeziometacarpal joint. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers*. Vol. 223, 133-142.

Pai, S., Talwalkar, S. y Hayton, M. (2006). Presentation and management of arthritis affecting the trapezio-metacarpal joint. *Acta orthopaedica Belgica*. Vol.72, 3-10.

Pogliacomì, F., Oldani, D., Schiavi, P., Pedrazzini, A., Vaienti, E. y Calderazzi, F. (2021). Long-term results after modified Burton-Pellegrini's technique in 24 cases affected by advanced rhizartrrosis. *Acta bio-medica: Atenei Parmensis*. Vol. 92, 1-7.

Valdes, K., O'Brien, V.H. y Cyr, L.M. (2014). Letter in response to "A prospective randomized comparison of neoprene vs thermoplastic hand-based thumb spica splinting for trapeziometacarpal arthrosis". *Osteoarthritis and cartilage*. Vol. 22 (4), 601-602.

Villafañe, J. H., Langford, D., Alguacil-Diego, I. M., y Fernández-Carnero, J. (2013). Management of trapeziometacarpal osteoarthritis pain and dysfunction using mobilization with movement technique in combination with kinesiology tape: A case report. *Journal of Chiropractic Medicine*. 12(2), 79–86.

**76770: SCREENING VISUAL A PERSONAS CON TRASTORNO DEL ESPECTRO DEL AUTISMO (TEA) / VISUAL SCREENING OF PEOPLE WITH AUTISM SPECTRUM DISORDER (ASD)****Área de conocimiento:** ÓPTICA Y OPTOMETRÍA**Autor(es):** Nuria Rodríguez Pérez-Silva, Favio André Apaza Manrique**Tutor(es):** Guadalupe González Montero, Yolanda Martín Pérez**Universidad:** Universidad Complutense de Madrid**Facultad:** Facultad de Óptica y Optometría**Titulación:** Grado en Óptica y Optometría**Formato:** Comunicación Oral - Investigación clínica**Palabras Clave:** Autismo, screening visual, discapacidad intelectual, examen optométrico.

Propósito: realizar un screening visual a pacientes con TEA en el centro P.A.U.T.A (Psicopedagogía del Autismo y Trastornos Asociados) que nunca habían recibido atención optométrica, adaptando las pruebas a las características de cada paciente. Así como conocer el estado de diferentes aspectos de su función visual y realizar las recomendaciones oportunas en cada caso.

Materiales y métodos: se examinó a 10 pacientes (9 hombres y 1 mujer) con TEA de entre 20 y 40 años. Los procedimientos realizados se adaptaron en función de las necesidades de cada paciente. Se evaluó la AV (agudeza visual) con los tests de Lea, Cardiff y las bolitas de colores, la estereopsis con el test VAC (Vision Assessment Corporation), la refracción objetiva con la técnica de retinoscopia, el punto próximo de convergencia, la motilidad y el cover test con oclusor, estímulos de fijación y barra de prismas. La valoración de salud ocular mediante exploración del polo posterior con oftalmoscopio y el polo anterior con lámpara de hendidura portátil y exploración pupilar con linterna. Previo a la visita se solicitó, tanto a las familias, como a los responsables del centro, que completaran un cuestionario para conocer las características e historia clínica de los participantes.

Resultados: se logró examinar a los 10 pacientes, los cuales, nunca se habían sometido antes a un examen optométrico. Los resultados cuantitativos y cualitativos obtenidos permitieron realizar un diagnóstico y proponer un tratamiento al problema visual que presentaban.

Conclusiones: las personas con TEA requieren un tiempo de preparación previo de desensibilización y más tiempo de examinación en las consultas. Con este screening se demuestra que es posible examinarlos si se les dedica el tiempo necesario. Conocer el problema visual que presentan y proponer un tratamiento que ayude a mejorar su calidad de vida.

Purpose: to perform a visual screening of patients with ASD in the P.A.U.T.A center (Psicopedagogía del Autismo and Trastornos Asociados) who had never received optometric care, adapting the tests to the characteristics of each patient. As well as knowing the status of different aspects of their visual function and making the appropriate recommendations in each case.

Materials and methods: 10 patients (9 men and 1 woman) with ASD aged 20 to 40 years were examined. The procedures performed were adapted according to the needs of each patient. VA (visual acuity) was evaluated with the Lea, Cardiff and colored pellets tests, stereopsis with the VAC (Vision Assessment Corporation) test, objective refraction with the retinoscopy technique, the near point of convergence, motility and cover test with an occluder, a fixation stimuli and the prism bars. The assessment of eye health by examination of the posterior pole with ophthalmoscope and the anterior pole with portable slit lamp and pupillary examination with flashlight. Prior to the visit, both, families and those responsible for the center were asked to complete a questionnaire to know the characteristics and clinical history of the participants.

Results: It was possible to examine the 10 patients, who had never undergone an optometric examination before. The quantitative and qualitative results obtained allowed a diagnosis and a treatment to be proposed to the visual problem they presented.

Conclusions: people with ASD require pre-desensitization preparation time and more examination time in health examinations. With this screening it is demonstrated that it is possible to examine them if the necessary time is dedicated to them. Knowing the visual problem, they have and proposing a treatment that helps improve their quality of life.

## **SCREENING VISUAL A PERSONAS CON TRASTORNO DEL ESPECTRO DEL AUTISMO (TEA)**

### **1. INTRODUCCIÓN**

Los Trastornos del Espectro del Autismo (TEA) son trastornos del neurodesarrollo que se inician en la infancia y perduran durante toda la vida. Se caracterizan por deficiencias en la comunicación social y la presencia de patrones repetitivos y restrictivos de la conducta, intereses o actividades. En España 10 de cada 1000 niños en edad escolar lo presentan <sup>1</sup>. Además de lo mencionado anteriormente, el 65,5% de las personas con TEA presentan discapacidad intelectual <sup>2</sup>, así como dificultades de comunicación, hiperactividad, epilepsia, trastornos de alimentación, fobias, ansiedad,... <sup>3</sup>

Las personas con TEA requieren una evaluación especializada ya que presentan problemas de comunicación, no hablan, no entienden las pruebas, tienen dificultades para moverse, se asustan de los entornos nuevos y, en ocasiones, no suelen tolerar el contacto físico. Estas personas presentan más problemas visuales que el resto de la población, y, además, tienen otros problemas de salud que precisan fármacos del tipo: antidepresivos, antipsicóticos, sedantes, antiépilépticos, ansiolíticos, analgésicos y anticonvulsivos. Algunos de los efectos adversos de estos medicamentos sobre la visión son: diplopia, nistagmus, fotofobia, borrosidad, enrojecimiento ocular y bloqueo pupilar, por ello es importante tenerlo en cuenta a la hora de realizar una revisión optométrica. Así mismo, muchos de ellos producen somnolencia extrema, lo cual dificulta la realización de los distintos exámenes optométricos.

**P.A.U.T.A. (Psicopedagogía del Autismo y Trastornos Asociados)**, es una asociación creada en 1993. Tiene como misión ayudar, tanto a las personas con Trastorno del Espectro del Autismo (TEA), como a sus familias. El objetivo principal del centro es poder desarrollar proyectos de mejora de calidad de vida, así como promover la inclusión de estas personas en el mundo que les rodea. Los trabajadores de PAUTA forman parte de un equipo multidisciplinar con logopedas, psicólogos, terapeutas ocupacionales, médicos y cuidadores. Todos ellos, realizan una labor social muy importante.

**El objetivo del trabajo consistió en realizar un screening visual a 10 pacientes con TEA entre 20 y 40 años en el centro P.A.U.T.A., que nunca habían recibido atención optométrica. Para ello se adaptaron las pruebas a las características de cada paciente, se realizó una desensibilización previa con el fin de obtener una mejor colaboración en la sesión del screening. Con los resultados obtenidos se realizó un diagnóstico y se indicaron las recomendaciones oportunas en cada caso.**

### **2. MATERIAL Y MÉTODOS**

Las pruebas se realizaron en dos salas diferentes, una con baja luminosidad para las pruebas que requerían condiciones de baja iluminación, y el gimnasio, donde los participantes pudieron realizar las pruebas del screening que requerían alta iluminación.

Diferentes pruebas del screening visual se distribuyeron en cuatro puestos o estaciones:

- 1. Evaluación de la agudeza visual, de lejos y cerca, y refracción objetiva**
- 2. Evaluación de la convergencia, mediante la prueba del PPC y del alineamiento ocular,**



mediante Cover Test

3. Evaluación de la amplitud de acomodación (AA), de la visión del color y de la estereopsis
4. Evaluación de la salud ocular mediante observación de medios oculares, fondo de ojo y reacción pupilar

Para medir la **AV**, el material utilizado en cada una de las estaciones y pruebas se seleccionaron específicamente para adaptarse a las capacidades de cada participante. Se registró la AV del OD (ojo derecho) y del OI (ojo izquierdo) en formato decimal.

**Test de LEA (Fig. 1 y 2):** Este optotipo está diseñado con cuatro símbolos diferentes (círculo, cuadrado, casa y corazón) muy parecidos entre sí y su tamaño va disminuyendo en progresión logarítmica.

El test de VL (visión lejana) está diseñado para colocarse a una distancia de tres metros y el de VP (visión próxima) se sitúa a 40 cm. El paciente debe reconocer los símbolos, por tanto, solamente se puede utilizar si tiene comunicación verbal o es capaz de emparejarlos con los iguales.

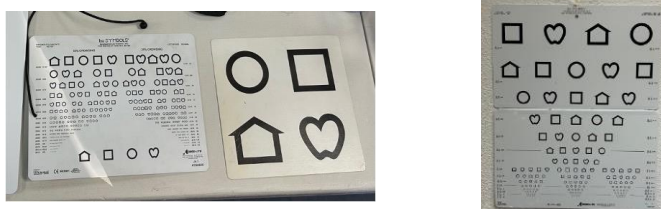


Fig.1 y 2: Test de Lea en diferentes formatos

**Test de Cardiff (Fig. 3 y 4):** Es un test de medida de agudeza visual por mirada preferencial, se coloca a un metro o a 50 cm, y se utiliza cuando los pacientes no tienen comunicación verbal o no saben emparejar los símbolos.

El test se compone de diferentes láminas, cada una asociada a una agudeza visual. En la parte superior o inferior de cada lámina hay un dibujo y según aumenta la dificultad del test, el trazo del dibujo se difumina. El examinador pasa las láminas del cuaderno y observa la dirección de mirada del paciente.

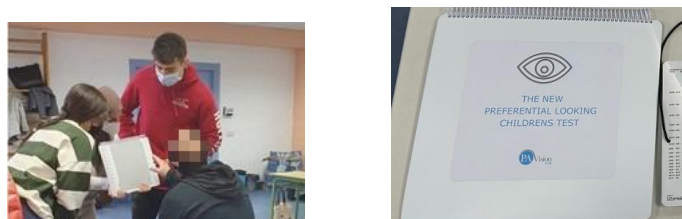


Fig.3 y 4: Test de Cardiff

**Bolas de colores:** Consiste en distinguir pequeñas bolitas de caramelo de diferentes colores. Esta prueba se realiza cuando no se puede utilizar ni el test de LEA ni el Cardiff, y sirve para estimar su visión próxima y la discriminación de las mismas sobre diferentes fondos.

Al paciente se le indicó coger las bolas y se evaluó si eran capaces de ver un objeto tan pequeño.

La **refracción objetiva** se realizó en una habitación adaptada, ya que para su realización era necesaria una baja luminosidad. Se utilizó un retinoscopio, reglas de esquiocopia y como

estímulo de fijación, elementos que llamaran su atención, desde una marioneta, hasta el móvil con vídeos o canciones. También se utilizó el autorrefractómetro portátil. Se registraron los valores en fórmula esferocilíndrica con cilindro negativo en ambos ojos.

Para evaluar el **punto próximo de convergencia** se acercó hacia la nariz del paciente un estímulo que le llame la atención hasta que se observó una pérdida de fijación por parte de uno de los dos ojos, seguidamente se alejó hasta recuperar la fijación con ambos ojos. Se registró: el punto de rotura y el de recobro en cm, y el ojo director.

Para evaluar la **motilidad (Fig. 5)** se utilizaron objetos llamativos (peluches o comida) con el fin de mantener su atención el máximo tiempo posible. El paciente debía seguir con la mirada, sin mover la cabeza, el estímulo presentado. La prueba se comenzó en posición primaria de mirada y, desde esta, se dibujó una "H", explorando de esta manera los distintos campos de acción de los músculos oculomotores. A aquellos sujetos que no comprendieron la realización de la prueba se les sujetó la cabeza para obligar a seguir el estímulo con la mirada. Se comprobaron exhaustivamente las posiciones extremas de mirada. Se registró la suavidad, precisión, extensión y amplitud de los movimientos oculares.



Fig.5: Realización de la prueba de motilidad ocular

Los materiales necesarios para la realización del **cover test** son un ocluser, un estímulo de fijación y las barras de prismas para medir la desviación. Tanto en cerca como en lejos se utilizaron estímulos acomodativos a la distancia adecuada, en VL a unos 3-4 metros y en VP a cuarenta centímetros. Se registró el tipo y magnitud de la desviación.

Se utilizaron estímulos llamativos en visión próxima, oclusores o la misma mano para tapar los ojos y una barra de prismas para medir las desviaciones. En aquellos casos en los que no se pudo realizar el cover test, se midió la desviación mediante la técnica de los reflejos de Hirschberg, con una linterna observando la posición de los reflejos corneales.

La **AA** se estimó de la siguiente manera: se le colocó el estímulo a la distancia estimada por su edad según la fórmula de Hofstetter ( $d = 1/(18 - edad/3)$ ) y seguidamente nos debía señalar el dibujo que había visto mediante las tarjetas emparejadas.

La evaluación de la visión del **color** se realizó con un test de Ishihara simplificado en el que las figuras son un círculo y un cuadrado, se pudo explicar al paciente que indicara cuál era el igual.

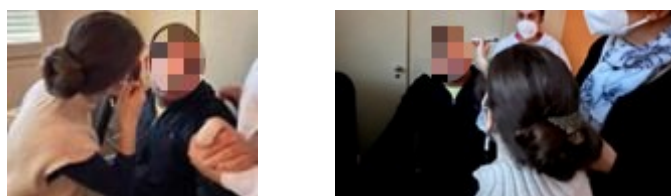
Para evaluar la **estereopsis (Fig. 6)** se utilizó el test VAC (Vision Assessment Corporation). Antes de ponerle las gafas polarizadas al paciente, se hacían unas pruebas para que comprendiera la dinámica del test. Se le enseñaba una tarjeta con una cara que se podía ver a simple vista sin gafas y otra tarjeta sin cara. Se le preguntaba dónde estaba la cara. Una vez comprendido se presentaron las diferentes tarjetas que solo se pueden identificar si existe visión estereoscópica.



*Fig.6: Test de estereopsis VAC*

El **fondo de ojo (Fig. 7)** se realizó en la habitación adaptada. Con la ayuda del oftalmoscopio se revisó el estado de las estructuras externas y el fondo de ojo, anotando la presencia de anomalías, siempre intentando captar la atención del paciente para poder observar rápidamente. Se registró la presencia de cualquier signo compatible con alguna patología ocular.

La **exploración pupilar (Fig. 8)** se realizó de la forma convencional con una linterna, observando los reflejos pupilares, y a la vez se aprovechó para ver si había alguna desviación ocular. Se registró cualquier anomalía en las respuestas pupilares.



*Fig.7 y 8: Realización de la prueba de oftalmoscopia y de la exploración pupilar*

### **3. RESULTADOS**

Se examinó a 10 pacientes, los cuales, nunca se habían sometido a un examen optométrico. Se obtuvieron resultados cuantitativos y cualitativos que permitieron realizar un diagnóstico del problema visual que presentaban

No se obtuvieron resultados fiables de la evaluación de la estereopsis por la complejidad de la prueba y la intolerancia al uso de gafas.

### **4. DISCUSIÓN**

Existen investigaciones que evalúan el estado acomodativo y refractivo de una muestra de pacientes con TEA en edades entre los 6 y 17 años<sup>4</sup>, pero no se ha encontrado ningún artículo ni estudio que evalúe el desarrollo de las posibles ametropías o de los problemas que puedan existir a medida que los pacientes envejecen y empiezan a presentar problemas como presbicia u otro tipo de disfunciones asociadas a la edad.

Según los estudios encontrados, las personas con TEA son más propensas a tener disfunciones de sacádicos y seguimientos, mala fijación, un PPC alejado y una exoforia más alta de lo normal, así como disfunciones acomodativas<sup>4,5</sup>.

Por último, en un trabajo realizado en EEUU que refleja la falta de exámenes visuales en personas con TEA<sup>6</sup>, por eso es de vital importancia realizar un seguimiento de los pacientes evaluados para observar su evolución a lo largo del tiempo<sup>7</sup>.

### **5. CONCLUSIONES**

- ❖ El TEA es un trastorno neurológico con alteraciones visuales y patologías sistémicas asociadas. No en todas las ocasiones reciben la atención sanitaria que precisan debido a la complejidad que supone examinarlos.

- ❖ Las personas con TEA requieren un tiempo de preparación previo de desensibilización y más tiempo de examinación en las consultas, con este screening se demuestra que es perfectamente posible examinarlos si se les dedica el tiempo necesario en lugar de excusarse en el “no colabora”.
- ❖ No se han encontrado muchos estudios optométricos cuyos sujetos de estudio sean personas afectadas con TEA, lo cual indica una falta de interés de la sociedad por este grupo población.
- ❖ Los resultados obtenidos son muy útiles, pues el fin del screening era tener una aproximación del estado visual de las personas evaluadas, y tratar de compensar sus problemas refractivos con el fin de mejorar su calidad de vida, y se ha conseguido con creces.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- <sup>1</sup> Málaga, I., Blanco Lago, R., Hedrera-Fernández, A., Álvarez-Álvarez, N., Oreña-Ansonera, V. A., & Baeza-Velasco, M. (2019). Prevalencia de los trastornos del espectro autista en niños en Estados Unidos, Europa y España: coincidencias y discrepancias. *Medicina (Buenos Aires)*, 79(1), 4-9.
- <sup>2</sup> Melville, C. A., Cooper, S. A., Morrison, J., Smiley, E., Allan, L., Jackson, A., ... & Mantry, D. (2008). The prevalence and incidence of mental ill-health in adults with autism and intellectual disabilities. *Journal of autism and developmental disorders*, 38, 1676-1688.
- <sup>3</sup> Morales, P., Domènech, E., Jané, M. C., & Canals, J. (2013). Trastornos leves del espectro autista en educación infantil: prevalencia, sintomatología co-ocurrente y desarrollo psicosocial. *Revista de psicopatología y psicología clínica*, 18(3), 217-231.
- <sup>4</sup> Anketell, P. M., Saunders, K. J., Gallagher, S. M., Bailey, C., & Little, J. A. (2018). Accommodative Function in Individuals with Autism Spectrum Disorder. *Optometry and vision science: official publication of the American Academy of Optometry*, 95(3), 193–201.
- <sup>5</sup> Coulter, R. A., Bade, A., Jenewein, E. C., Tea, Y. C., & Mitchell, G. L. (2021). Near-point Findings in Children with Autism Spectrum Disorder and in Typical Peers. *Optometry and vision science: official publication of the American Academy of Optometry*, 98(4), 384–393.
- <sup>6</sup> Swanson, M. W., Lee, S. D., Frazier, M. G., Bade, A., & Coulter, R. A. (2020). Vision Screening among Children with Autism Spectrum Disorder. *Optometry and vision science: official publication of the American Academy of Optometry*, 97(11), 917–928.
- <sup>7</sup> Yusta, M. L., Ballesteros, M. P. J., & Arranz, M. M. Screening Visual en Personas con Trastornos del Espectro Autista.

**76829: SESGOS COGNITIVOS Y CATEGORIZACIÓN EN ANIMALES DE CONSUMO****Área de conocimiento:** PSICOLOGÍA**Autor(es):** Nadia Merino Álvarez**Tutor(es):** Laura Pasca García**Universidad:** Universidad Complutense de Madrid**Facultad:** Facultad de Psicología**Titulación:** Grado en Psicología**Formato:** Comunicación Oral - Investigación básica**Palabras Clave:** Animales, paradoja de la carne, categorización, disociación, alimentación. Animals, meat paradox, categorization, dissociation, feeding.

**RESUMEN:** La presente investigación se centra en el estudio de la paradoja de la carne, la cual se entiende como el estado de tensión entre amar a los animales pero al mismo tiempo comerlos. Nos hemos centrado en los mecanismos de categorización cognitiva a través de los cuales agrupamos a cada animal que conocemos. Unos animales tendrían la etiqueta de "comida" mientras que otros tendrían la etiqueta de "no comida". El objetivo fue estudiar la disociación entre un producto cárnico y su origen animal, así como analizar si estas explican la inclusión de productos cárnicos en la alimentación. Específicamente, mediante un diseño experimental (N = 177), se presentaron a un grupo de participantes fotografías de productos cárnicos, mientras que a otro grupo se presentaron imágenes de los animales correspondientes. Mediante una serie de ítems, debieron valorar en qué medida se considera un animal y un alimento, así como el grado de inclusión en su alimentación, el sufrimiento animal e impacto animal causado al consumirlo, y la culpa cuando se consume. Los resultados muestran, en primer lugar, una disociación del origen animal cuando se presenta como producto de alimentación. Este grupo consideró en menor medida que la imagen correspondía a un animal y en mayor medida que corresponde a un alimento. Además, consideran en menor medida que su consumo causa sufrimiento animal. En segundo lugar, se observa que el grado en que se considera animal, comida y la culpabilidad sentida al consumirlo explican en un 66% la varianza del consumo de carne. Por tanto, el presente trabajo pone de manifiesto la existencia de un mecanismo de disociación que puede explicar el hecho de que las personas consuman alimentos cárnicos a pesar de mostrar amor por los animales.

**ABSTRACT:** The present research focuses on the study of the meat paradox, which is understood as the state of tension between loving animals but at the same time eating them. We have focused on the cognitive categorization mechanisms through which we group every animal we meet. Some animals would be labeled "food" while others would be labeled "non-food". The objective was to study the dissociation between a meat product and its animal origin, as well as to analyze whether these explain the inclusion of meat products in the diet. Specifically, using an experimental design (N = 177), one group of participants was presented with photographs of meat products, while another group was presented with images of the corresponding animals. By means of a series of items, they had to evaluate the extent to which they consider themselves an animal and a food, as well as the degree of inclusion in their diet, the animal suffering and animal impact caused when consuming it, and the guilt when consuming it. The results show, in the first place, a dissociation of animal origin when presented as a food product. This group considered to a lesser extent that the image corresponded to an animal and to a greater extent that it corresponds to a food. In addition, they consider to a lesser extent that its consumption causes animal suffering. Secondly, it is observed that the degree to which they consider themselves to be an animal, food, and the guilt felt when consuming it explain 66% of the variance in meat consumption. Therefore, the present study demonstrates the existence of a dissociation mechanism that can explain the fact that people consume meat foods in spite of showing love for animals.

## SESGOS COGNITIVOS Y CATEGORIZACIÓN EN ANIMALES DE CONSUMO

### COGNITIVE BIASES AND CATEGORIZATION IN FOOD ANIMALS

Autor: Nº 1517087 Nadia Merino Álvarez, nadiamer@ucm.es

Tutor: Laura Pasca García, laura.pasca@ucm.es

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID; FACULTAD DE PSICOLOGÍA

**RESUMEN:** La presente investigación se centra en el estudio de la paradoja de la carne, la cual se entiende como el estado de tensión entre amar a los animales pero al mismo tiempo comerlos. Nos hemos centrado en los mecanismos de categorización cognitiva a través de los cuales agrupamos a cada animal que conocemos. Unos animales tendrían la etiqueta de "comida" mientras que otros tendrían la etiqueta de "no comida". El objetivo fue estudiar la disociación entre un producto cárnico y su origen animal, así como analizar si estas explican la inclusión de productos cárnicos en la alimentación. Específicamente, mediante un diseño experimental (N = 177), se presentaron a un grupo de participantes fotografías de productos cárnicos, mientras que a otro grupo se presentaron imágenes de los animales correspondientes. Mediante una serie de ítems, debieron valorar en qué medida se considera un animal y un alimento, así como el grado de inclusión en su alimentación, el sufrimiento animal e impacto animal causado al consumirlo, y la culpa cuando se consume. Los resultados muestran, en primer lugar, una disociación del origen animal cuando se presenta como producto de alimentación. Este grupo consideró en menor medida que la imagen correspondía a un animal y en mayor medida que corresponde a un alimento. Además, consideran en menor medida que su consumo causa sufrimiento animal. En segundo lugar, se observa que el grado en que se considera animal, comida y la culpabilidad sentida al consumirlo explican en un 66% la varianza del consumo de carne. Por tanto, el presente trabajo pone de manifiesto la existencia de un mecanismo de disociación que puede explicar el hecho de que las personas consuman alimentos cárnicos a pesar de mostrar amor por los animales.

**ABSTRACT:** The present research focuses on the study of the meat paradox, which is understood as the state of tension between loving animals but at the same time eating them. We have focused on the cognitive categorization mechanisms through which we group every animal we meet. Some animals would be labeled "food" while others would be labeled "non-food". The objective was to study the dissociation between a meat product and its animal origin, as well as to analyze whether these explain the inclusion of meat products in the diet. Specifically, using an experimental design (N = 177), one group of participants was presented with photographs of meat products, while another group was presented with images of the corresponding animals. By means of a series of items, they had to evaluate the extent to which they consider themselves an animal and a food, as well as the degree of inclusion in their diet, the animal suffering and animal impact caused when consuming it, and the guilt when consuming it. The results show, in the first place, a dissociation of animal origin when presented as a food product. This group considered to a lesser extent that the image corresponded to an animal and to a greater extent that it corresponds to a food. In addition, they consider to a lesser extent that its consumption causes animal suffering. Secondly, it is observed that the degree to which they consider themselves to be an animal, food, and the guilt felt when consuming it explain 66% of the variance in meat consumption. Therefore, the present study demonstrates the existence of a dissociation mechanism that can explain the fact that people consume meat foods in spite of showing love for animals.

**PALABRAS CLAVE:** Animales, paradoja de la carne, categorización, disociación, alimentación. Animals, meat paradox, categorization, dissociation, feeding.

## INTRODUCCIÓN

La inclusión de alimentos cárnicos en la dieta general de la población es elevadamente común. Al mismo tiempo, los seres humanos tienen animales que conviven con ellos en casa a los cuales cuidan y con los que desarrollan un vínculo. En España, los datos desde el 2010 hasta el 2021 reflejan que aproximadamente el 30% de los hogares tenían un perro y el 15% de los hogares tenían un gato. (Orús, 2022). Este trato hacia los animales es totalmente contradictorio, mientras que a unos animales se les cuida y protege, incluso considerándolos parte de la familia, otros se perciben como alimento. Este dilema hacia los animales se conoce como la paradoja de la carne en la cual las personas aman y se comen a los animales (Loughnan et al., 2012).

A pesar de ese amor hacia los animales, el que la sociedad siga usando productos cárnicos en la alimentación ha motivado el estudio de este fenómeno. Uno de los focos de investigación se centra en la motivación y en la disonancia cognitiva como método para comer animales mientras al mismo tiempo se tienen sentimientos de amor y cuidado hacia los mismos (Bratanova et al., 2011; Kunst & Hohle, 2016). Esta disonancia cognitiva, desarrollada por Festinger (1957), pone de manifiesto la motivación como factor clave para gestionar la disonancia. Debido a la incomodidad del proceso, las personas tienen la tendencia a solucionar esa incomodidad. Por un lado, se puede resolver cambiando el comportamiento, haciendo así que fuese acorde a la moral y valores de cada persona. En este caso, dejando de incluir productos de animales en la dieta. Por otro lado, hay personas que no cambian su comportamiento, de ese modo lo que cambia sería su percepción hacia los animales que se consuman (Bratanova et al., 2011). En general se ha investigado cómo la etiquetación y agrupamiento de los animales es distintas categorías cognitivas alivia la tensión de la disonancia cognitiva (Bratanova et al., 2011). En base a los grupos en los que se categorizan a los animales unas conductas son moralmente adecuadas, mientras que otras no lo son. Se justificaría así el consumo de animales categorizados como “animales de consumo”.

Según varias investigaciones, una de las variables que favorece la categorización y el consumo de animales sería la disociación. La disociación sería el proceso por el cual las personas que consumen animales son capaces de ignorar o suprimir el hecho de que el alimento que comen proviene de seres vivos (Kunst & Hohle, 2016). Así pues desasocian el animal vivo del producto cárnico que comen. Earle et al (2019) demostraron que la angustia debido al consumo de carne y la empatía explican los efectos negativos de interrumpir la disociación en la intención de consumir carne. Además, Simon et al (2018) encontraron que muchos participantes de sus estudios separaron los temas relacionados con la cría de animales de sus pensamientos sobre el consumo de carne para poder seguir disfrutando del consumo de carne. De este modo, se observa la tendencia generalizada a valorar la disociación como uno de los procesos cognitivos que mantienen el consumo de carne y explican en parte la paradoja de la carne.

Es de vital importancia entender el por qué se sigue consumiendo carne a pesar de todas las alertas sanitarias y ambientales (IPCC, 2022). La sociedad a pesar de conocer que el consumo de animales es dañino para los seres humanos, para el medio ambiente, para los animales y los ecosistemas, se sigue fomentando y normalizando su consumo. Consideramos de gran relevancia entender los mecanismos que mantienen la conducta de la alimentación cárnica para poder fomentar otros tipos de alimentación más saludables y sostenibles con el medio ambiente y los animales.

Por ello, el objetivo del presente trabajo fue estudiar la disociación entre un producto cárnico y su origen animal, así como analizar si esta explica la inclusión de productos cárnicos en la alimentación.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### *Participantes*

En el presente estudio participaron 176 personas de población general, con una media de edad de 28,55 (DT = 12,753), siendo el 70,1% mujeres, el 23,7% hombres y el 6,2% personas no binarias. Además, entre los participantes, según su estilo de dieta el 17,5% se considera carnívoro, el 64,4% se considera omnívoro, el 12,4% se considera vegetariano y el 5,6% se considera vegano. De este modo se observa que 81,9% se denominan como consumidores de carne y el 18,1% como no consumidores de carne.

### *Instrumento y procedimiento*

En el presente estudio se ha realizado un diseño experimental en el que los participantes fueron asignados aleatoriamente a una de las dos condiciones: imágenes de animales o imágenes de productos cárnicos.

Se elaboraron dos versiones de un cuestionario online que incluye dos fotografías (de animales o de productos cárnicos derivados de los mismos, dependiendo del grupo). Se solicitó valorar cada una de ellas en cuanto ¿en qué medida lo consideras comida?, ¿en qué medida lo consideras un animal?, ¿en qué medida lo incluyes en tu alimentación?, ¿en qué medida consideras que incluirlo en tu alimentación causa sufrimiento animal?, ¿en qué medida consideras que incluirlo en tu alimentación tiene un efecto negativo sobre el medio ambiente?, si lo incluyeras en tu alimentación ¿qué grado de culpa sentirías?. Los participantes debían responder en formato tipo Likert de siete puntos, desde “en absoluto” a “totalmente”.

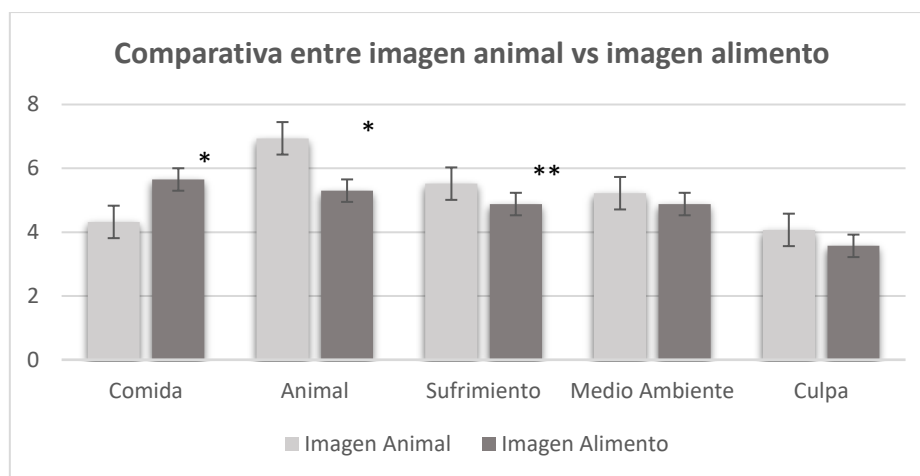
## **RESULTADOS**

Para analizar el primer objetivo del estudio, basado en la disociación entre animal y alimento, se llevó a cabo una prueba t para conocer las diferencias entre las medias en cada una de las variables. Como se observa en la figura 1, en cuanto a la consideración como comida se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $t(175) = -3,989$ ;  $p < ,001$ ) entre la condición de imagen animal ( $M = 4,32$ ;  $DS = 2,24$ ) y la condición imagen de alimento ( $M = 5,65$ ,  $DS = 2,15$ ). Así, se encontraron diferencias en el grado de consideración como animal ( $t(175) = 7,474$ ;  $p < ,001$ ) entre la condición de imagen animal ( $M = 6,94$ ;  $DS = 0,29$ ) y la condición imagen de alimento ( $M = 5,26$ ;  $DS = 2,18$ ). Además, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el grado de sufrimiento animal ( $t(175) = 2,393$ ;  $p = ,018$ ) entre la condición de imagen animal ( $M = 5,52$ ;  $DS = 1,48$ ) y la condición imagen de alimento ( $M = 4,88$ ;  $DS = 2,03$ ). No obstante, no se encontraron diferencias en cuanto al efecto en el medio ambiente ( $t(175) = 1,267$ ;  $p = ,207$ ) ni a la culpabilidad sentida al incluirlo en la alimentación ( $t(175) = 1,568$ ;  $p = ,119$ ).



**Figura 1**

*Diferencia de medias de las distintas variables en base al tipo de imagen visualizada.*

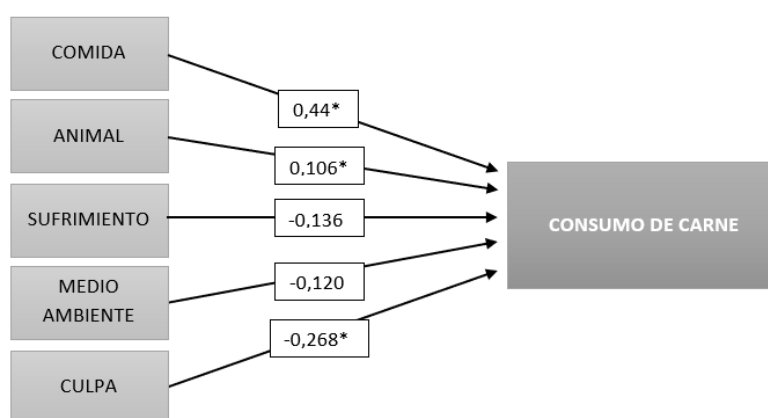


*Nota.* En el gráfico se indica con un asterisco  $p < ,01$  y con doble asterisco  $p < ,05$ .

A continuación se analizaron los datos referentes al segundo objetivo del estudio, analizar si estas variables explican la inclusión de productos cárnicos en la alimentación, para lo que se realizó un análisis de regresión lineal con la variable criterio siendo la inclusión en la alimentación y las variables predictoras: comida, animal, sufrimiento, medio ambiente y culpa. Los datos reflejaron que la varianza es explicada en un 66% con este modelo presentado. En cuanto a los resultados obtenidos (figura 2) se observa que la consideración como comida ( $\beta = 0,440$ ;  $p < ,001$ ), animal ( $\beta = 0,106$ ;  $p = ,028$ ) y la culpa ( $\beta = -0,268$ ;  $p < ,001$ ) son estadísticamente significativas. Mientras que el sufrimiento ( $\beta = -0,136$ ;  $p = ,110$ ) y el impacto en el medio ambiente ( $\beta = -0,120$ ;  $p = ,108$ ) no se incluyen en el modelo.

**Figura 2**

*Variables explicativas del consumo de carne.*



**DISCUSIÓN**

El objetivo de este trabajo fue estudiar en primer lugar la disociación entre un producto cárnico y su origen animal. Kunst y Hohle (2016) hipotetizaron que la carne mientras más procesada estaba más disociación producía. Esto se debía a que la carne procesada estaba más desligada

del animal y por lo tanto era más complicado imaginar que ese alimento provenía de un animal antes vivo. En su estudio utilizaron tres estados distintos de pollo procesado para observar si había diferencias entre los mismos. Encontraron diferencias entre cada condición, siendo la carne más procesada la que mayor disociación obtenía. En este estudio nos planteamos un proceso parecido pero utilizando animales mamíferos, la vaca y el cerdo. Esto se debe a que en general los humanos sienten más empatía y por tanto menos disociación hacia otros primates y mamíferos (Westbury & Neumann, 2008).

Como muestran nuestros resultados, cuando se mostró a los participantes una imagen de un animal, este le percibían más como animal que como comida en comparación con el grupo al que se les mostró la imagen de un alimento altamente procesado. Por el contrario, el grupo al que se le mostró los alimentos altamente procesados percibieron las imágenes más como comida que como animal. Con esos resultados se podría decir que dependiendo del tipo de imágenes, y por tanto el nivel de procesamiento del animal como alimento, se disocia en mayor magnitud las imágenes del alimento procesado que las imágenes del animal vivo, en la línea de los resultados obtenidos por Kunst y Hohle (2016).

Por otro lado el grupo al que fueron mostradas imágenes de animales mostraron más percepción del sufrimiento del animal que el grupo al que se le presentaron las imágenes del alimento altamente procesado. Esto coincide con la idea de que la disociación facilita la desconexión del animal del alimento para poder incluirlo en la dieta sin generar emociones negativas tales como el disgusto (Kunst & Hohle, 2016; Benningstad & Kunst, 2020).

Los resultados aportan evidencia de la existencia de una disociación a la hora de consumir carne que interfiere en percibir el alimento como animales y el sufrimiento de estos en la industria cárnica. Se respaldan así los resultados anteriores obtenidos en otros estudios sobre la disociación (Kunst & Hohle, 2016; Dowsett et al., 2018; Benningstad & Kunst, 2020). Además, según comenta Rothgerber (2014) en este caso la disociación se adopta como estrategia para reducir la disonancia cognitiva asociada a la paradoja de la carne.

Una vez estudiada la disociación se realizó un análisis sobre si esta explica la inclusión de los productos cárnico en la alimentación. Se observó que la percepción como comida, la percepción como animal y el sentimiento de culpa al incluirlo en la alimentación explican dicha inclusión en la alimentación. Se encontró que percibir el alimento como comida aumenta la tendencia a incluir estos productos cárnicos en la dieta, así como percibirlo como animal disminuye su inclusión.

La tercera variable explicativa en este modelo es el sentimiento de culpa al incluir el alimento en la dieta. Según Rothgerber (2020) desde la perspectiva de la disonancia cognitiva personas con alimentaciones vegetarianas, donde no se incluye la carne, reflejan menos culpabilidad por dañar a los animales, el medio ambiente y la salud personal.

## **CONCLUSIONES**

En este trabajo se ha destacado la relevancia de la disociación entre un producto cárnico y su origen animal respecto a la inclusión de los productos cárnicos en la alimentación. Mientras que en la disociación las variables relevantes son la percepción como comida, percepción como animal y el sufrimiento generado, en la inclusión de los productos cárnicos media con mayor intensidad percepción como comida, percepción como animal y la culpa.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Benningstad, N. C., & Kunst, J. R. (2020). Dissociating meat from its animal origins: A systematic literature review. *Appetite*, *147*, 104554. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2019.104554>
- Bratanova, B., Loughnan, S., & Bastian, B. (2011). The effect of categorization as food on the perceived moral standing of animals. *Appetite*, *57*(1), 193-196. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2011.04.020>
- Dowsett, E., Semmler, C., Bray, H., Ankeny, R. A., & Chur-Hansen, A. (2018). Neutralising the meat paradox: Cognitive dissonance, gender, and eating animals. *Appetite*, *123*, 280-288. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2018.01.005>
- Earle, M., Hodson, G., Dhont, K., & MacInnis, C. (2019). Eating with our eyes (closed): Effects of visually associating animals with meat on antivegan/vegetarian attitudes and meat consumption willingness. *Group Processes & Intergroup Relations*, *22*(6), 818-835. <https://doi.org/10.1177/1368430219861848>
- IPPC. (2022). Climate change 2022: Synthesis Report. Contribution of working groups I, II and III to the fifth assessment report of the Intergovernmental panel on Climate Change (Core Writing Team, Pachauri, R. K., & Meyer, L. A., Eds.).
- Kunst, J. R., & Hohle, S. M. (2016). Meat eaters by dissociation: How we present, prepare and talk about meat increases willingness to eat meat by reducing empathy and disgust. *Appetite*, *105*, 758-774. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2016.07.009>
- Loughnan, S., Bratanova, B., & Puvia, E. (2012). The meat paradox: how are we able to love animals and love eating animals. *Mind*, *1*, 15-18.
- Orús, A. (4 de octubre, 2022). *Mascotas: Hogares Con Perros o Gatos en España 2010-2021*. Statista.
- Rothgerber, H. (2014). Efforts to overcome vegetarian-induced dissonance among meat eaters. *Appetite*, *79*, 32-41. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2014.04.003>
- Rothgerber, H. (2020). Meat-related cognitive dissonance: A conceptual framework for understanding how meat eaters reduce negative arousal from eating animals. *Appetite*, *146*, 104511. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2019.104511>
- Simons, J., Hartmann, M., Klink-Lehmann, J., Vierboom, C., & Harlen, I. (2018). Acceptance of animal husbandry in Germany: Drivers and different ways to cope with problems. <http://dx.doi.org/10.22004/ag.econ.277367>
- Westbury, H. R., & Neumann, D. L. (2008). Empathy-related responses to moving film stimuli depicting human and non-human animal targets in negative circumstances. *Biological psychology*, *78*(1), 66-74. <https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2007.12.009>

**77032: ¿Qué son esas voces? Estudio de las bases neurales de las alucinaciones auditivas verbales****Área de conocimiento:** PSICOLOGÍA**Autor(es):** María Hidalgo Corbacho**Tutor(es):** Helena Melero Carrasco**Universidad:** Universidad Complutense de Madrid**Facultad:** Facultad de Psicología**Titulación:** Grado en Psicología**Formato:** Comunicación Oral - Revisiones bibliográficas**Palabras Clave:** Alucinaciones auditivas verbales, redes neurales, esquizofrenia, trastornos psicóticos.

Las alucinaciones constituyen un fenómeno perceptivo que tiene lugar durante el periodo de vigilia sin una fuente externa que lo provoque. Se producen en gran número de personas, entre las que destacan aquellas que sufren esquizofrenia, trastornos psicóticos y determinadas situaciones tales como privación de sueño, aislamiento, síndrome de abstinencia, situaciones de estrés, etc. Esta experiencia ha sido estudiada desde diferentes disciplinas y su etiología permanece incierta. Aunque existen diversos tipos de alucinaciones en función de la modalidad sensorial, el presente artículo se dedicará al estudio de las redes cerebrales implicadas en las alucinaciones auditivas verbales y su comparación tanto con el fenómeno alucinatorio en general como con las bases neurales del procesamiento lingüístico natural. Mediante el uso de técnicas de neuroimagen, se ha podido discernir una alteración de la relación entre la red por defecto y la red de saliencia. Así mismo, se observan activaciones inusuales en diferentes áreas corticales relacionadas con la producción y comprensión del lenguaje. Estos hallazgos pueden explicar cómo se originan las alucinaciones auditivas verbales a nivel neurofisiológico y proporcionar nuevas opciones de intervención.

Hallucinations are a perceptual phenomenon that takes place during the waking period without an external source causing it. They occur in large numbers of people, among which can be outlined those suffering from schizophrenia, psychotic disorders and certain situations such as sleep deprivation, isolation, withdrawal syndrome, stress situations, etc. This experience has been studied from different disciplines and its etiology remains unclear. Although there are various types of hallucinations depending on the sensory modality, this article will be focus on the study of the brain networks involved in auditory verbal hallucinations and their comparison with both the hallucinatory phenomenon in general and the neural bases of the natural linguistic processing. By using neuroimaging techniques, it has been possible to discern an alteration of the relationship between the default mode network and the salience network. Likewise, unusual activations are observed in different cortical areas related to the production and understanding of language. These findings can explain how auditory verbal hallucinations are created at the neurophysiological level, providing new intervention options.

## ¿Qué son esas voces? Estudio de las bases neurales de las alucinaciones auditivas verbales

### What are those voices? Study of neural bases in auditory verbal hallucinations

**Primer autor:** 1495730, María Hidalgo Corbacho, [marihi02@ucm.es](mailto:marihi02@ucm.es)

**Tutora:** Helena Melero Carrasco, [hmelero@ucm.es](mailto:hmelero@ucm.es)

Facultad de Psicología, Universidad Complutense de Madrid

**Resumen:** Las alucinaciones constituyen un fenómeno perceptivo que tiene lugar durante el periodo de vigilia sin una fuente externa que lo provoque. Se producen en gran número de personas, entre las que destacan aquellas que sufren esquizofrenia, trastornos psicóticos y determinadas situaciones tales como privación de sueño, aislamiento, síndrome de abstinencia, situaciones de estrés, etc. Esta experiencia ha sido estudiada desde diferentes disciplinas y su etiología permanece incierta. Aunque existen diversos tipos de alucinaciones en función de la modalidad sensorial, el presente artículo se dedicará al estudio de las redes cerebrales implicadas en las alucinaciones auditivas verbales y su comparación tanto con el fenómeno alucinatorio en general como con las bases neurales del procesamiento lingüístico natural. Mediante el uso de técnicas de neuroimagen, se ha podido discernir una alteración de la relación entre la red por defecto y la red de saliencia. Así mismo, se observan activaciones inusuales en diferentes áreas corticales relacionadas con la producción y comprensión del lenguaje. Estos hallazgos pueden explicar cómo se originan las alucinaciones auditivas verbales a nivel neurofisiológico y proporcionar nuevas opciones de intervención.

**Abstract:** Hallucinations are a perceptual phenomenon that takes place during the waking period without an external source causing it. They occur in large numbers of people, among which can be outlined those suffering from schizophrenia, psychotic disorders and certain situations such as sleep deprivation, isolation, withdrawal syndrome, stress situations, etc. This experience has been studied from different disciplines and its etiology remains unclear. Although there are various types of hallucinations depending on the sensory modality, this article will be focus on the study of the brain networks involved in auditory verbal hallucinations and their comparison with both the hallucinatory phenomenon in general and the neural bases of the natural linguistic processing. By using neuroimaging techniques, it has been possible to discern an alteration of the relationship between the default mode network and the salience network. Likewise, unusual activations are observed in different cortical areas related to the production and understanding of language. These findings can explain how auditory verbal hallucinations are created at the neurophysiological level, providing new intervention options.

**Palabras clave:** alucinaciones auditivas verbales, redes neurales, esquizofrenia, trastornos psicóticos.

**Key words:** auditory verbal hallucinations, neural networks, schizophrenia, psychotic disorders.

## 1. Introducción

Las alucinaciones se definen como percepciones transitorias, intrusivas, e inintencionales, que se producen durante los estados de vigilia en ausencia de estímulos sensoriales externos (Lefebvre et al., 2016). Las experiencias alucinatorias pueden ocurrir en cualquier modalidad sensorial, pudiendo ser visuales, olfatorias, táctiles, (...) o combinadas (Bohlken et al., 2017).

Este artículo se centrará en el análisis de las alucinaciones auditivas, concretamente de tipo verbal. Existen otras alucinaciones auditivas, tales como las musicales, aunque las más comunes en este ámbito son las verbales (68% de los casos frente a 32%) (Blom, 2015). Las alucinaciones auditivas verbales (AAV) son sonidos con contenido lingüístico experimentados durante la vigilia en ausencia de una fuente externa. Las AAV las sufren pacientes con determinados cuadros psicóticos tales como esquizofrenia (entre un 60 y 83%), trastorno límite de personalidad (46%), trastorno bipolar (23%), trastorno depresivo mayor (41%) y entre un 10%-15% de la población sana. En personas sin patología, estas experiencias pueden deberse a estados de estrés, bajo estado de ánimo, privación del sueño, aislamiento, síndrome de abstinencia, o consumo de drogas, entre otras. Resultan disruptivas para las personas que las sufren, pudiendo provocar ansiedad, pánico, episodios depresivos, necesidad urgente de escape, conllevando en algunos casos problemas conductuales y pérdida de la noción de la realidad (Chuanjun et al, 2019).

Existen distintos tipos de explicación para este fenómeno, ya que puede ser abordado por diferentes disciplinas: farmacología, psiquiatría, filosofía, etc. Desde la psicología se estudian diversas dimensiones. Por un lado, se analiza la fenomenología de la experiencia a través de entrevistas o cuestionarios. Por otro lado, se examina el ámbito cognitivo mediante modelos basados en procesos cognitivos y cómo estos pueden dar lugar a alucinaciones. Por último, se puede estudiar desde una perspectiva neurofisiológica, recopilando datos sobre el funcionamiento de las redes neurales a través de técnicas de neuroimagen. Esta tecnología nos brinda información estructural (resonancia magnética -RM-, tomografía axial computarizada -TAC-, etc.) o funcional (resonancia magnética funcional -RMf-, la electroencefalografía -EEG-, la magnetoencefalografía -MEG-, tomografía computarizada por emisión de fotón único -SPECT-, etc.) del sistema nervioso gracias a las propiedades de los distintos tejidos que lo conforman. Las técnicas funcionales permiten estudiar la relación funcional entre diferentes áreas, proporcionando información sobre las redes neurales (conjuntos de áreas corticales, núcleos y otras regiones del encéfalo relacionadas entre sí que trabajan de manera conjunta). La mejor forma para observar estas redes es obtener datos en estado de reposo (*resting-state*), es decir, sin exigirle a las/los pacientes que realicen ninguna tarea específica. Atendiendo a la diversidad de datos y maneras de estudiar las alucinaciones y, en concreto, las AAV, se realiza una revisión de los datos recientes que aporta la neurociencia cognitiva al entendimiento de este fenómeno.

## 2. Metodología

Para la ejecución del artículo se ha realizado una búsqueda avanzada en PubMed empleando las siguientes palabras clave: auditory hallucinations, auditory verbal hallucinations, brain network in hallucinations, language network. Los artículos han sido filtrados cronológicamente, empleando únicamente los posteriores al 2015, obteniendo 127,17 resultados. No se pretende realizar una revisión exhaustiva, sino destacar los hallazgos recientes más relevantes para el

estudio del fenómeno. Se han excluido los artículos de casos únicos, patologías concretas a excepción de la esquizofrenia y los que no explicaran un correlato neural, obteniendo 8 estudios.

### **3. Resultados**

#### **3.1. Alucinaciones sin atender a la modalidad sensorial**

Antes de examinar la información sobre las AAV, se analizarán las hipótesis explicativas neurocientíficas sobre el fenómeno alucinatorio sin especificar su modalidad sensorial.

Desde una perspectiva cognitiva, se plantea la existencia de alteraciones en la codificación predictiva. El cerebro genera predicciones sobre la información que recibe basándose en su conocimiento y experiencias previas (procesamiento top-down). Después, en función de los errores de predicción cometidos, actualiza la información. El procesamiento bottom-up hace referencia a perceptos nuevos, generando representaciones mentales novedosas, recombina características del input sensorial. Si las expectativas creadas por el procesamiento top-down son activadas sin un input sensorial establecido por el procesamiento bottom-up y no se frenan dichas expectativas, se pueden dar alucinaciones (de Boer et al., 2019).

A nivel neurofisiológico, estudios como el de Kim et al. (2019) han encontrado un correlato neuroanatómico que respalda la anterior hipótesis. Mediante mapeo de lesiones en áreas que pertenecen a las redes neurales más estudiadas, los autores detectaron activaciones anómalas en el surco temporal superior y en la vermis cerebelosa. En esta red se incluyen la corteza cingulada anterior y la ínsula anterior (Kim et al., 2019). Los resultados se obtuvieron en personas con lesiones cerebrales, por lo que no se deberían generalizar a otras poblaciones.

Continuando con el punto de vista neurofisiológico, parece existir un patrón de redes neurales implicado en la experimentación de alucinaciones. Lefebvre et al. (2016) llevaron a cabo un estudio de RMf en estado de reposo en pacientes con esquizofrenia para medir los cambios funcionales durante los diferentes estados en el proceso alucinatorio. Sus resultados sugerían un modelo cuatripartito compuesto por tres redes cerebrales (red por defecto, red ejecutiva central y red de saliencia) y una región de interés, el hipocampo izquierdo. La red por defecto, que se activa principalmente cuando no hay demandas específicas del entorno, está formada principalmente por la corteza cingulada posterior, la corteza prefrontal ventromedial, la corteza temporal medial y la corteza parietal lateral. Otros autores incluyen específicamente en esta red el giro angular bilateral (Marino et al., 2022). En la red ejecutiva central, responsable de tareas demandantes de esfuerzo cognitivo, se incluyen la corteza prefrontal dorsolateral bilateral y las cortezas parietales posteriores. Por último, la red de saliencia, encargada de detectar e integrar información relevante del entorno y del medio interno, estaría compuesta por la ínsula anterior, el núcleo estriado y la corteza cingulada anterior. La relación entre la red por defecto y la red ejecutiva central es mutuamente excluyente. La encargada del cambio de una red a otra podría ser la red de saliencia, y, en especial, la ínsula, quien detecta estímulos o eventos salientes y orienta los recursos a la red adecuada (Lefebvre et al., 2016). En la esquizofrenia, la ínsula sufre alteraciones estructurales y funcionales, lo que puede provocar un procesamiento de estímulos deficitario y dañar la interacción entre la red por defecto y la ejecutiva central, dando paso a alucinaciones.

Las alucinaciones también están vinculadas a cambios en el hipocampo izquierdo, quien se activa unos segundos antes de que se produzca la alucinación. Por tanto, el inicio de este fenómeno podría estar relacionado con las modulaciones de las conexiones entre el hipocampo izquierdo y la red de saliencia. La extinción de las alucinaciones se produce gracias a la mediación de la red de saliencia, quien refuerza la actividad en la red ejecutiva central, tomando el control sobre las mismas (Lefebvre et al., 2016).

### 3.2. Alucinaciones auditivas verbales

Aunque los resultados descritos muestran un patrón explicativo del fenómeno tanto a nivel cognitivo como neurofisiológico, diversos estudios indican que, en función de la modalidad sensorial, se producen procesos y activaciones distintas.

A nivel cognitivo, el estudio de Boer et al. (2019) muestra que, mediante inducción de un procesamiento top-down a través de una tarea de identificación oral de palabras, los sujetos que padecen AAV cometen más errores predictivos que aquellos sin alucinaciones o con fenomenología manifestada en otra modalidad sensorial. Así, se observa una diferenciación en el procesamiento de información según el dominio sensorial involucrado. Además, cuanto más recientes son las AAV, más errores cometen los sujetos. El experimento se realizó con población no clínica y con una muestra numerosa y heterogénea.

Autor	Técnica empleada	Población	Regiones de interés
Blom, 2015	Revisión bibliográfica, incluye RMf durante la experiencia consciente de AAV y SPECT	Sujetos con trastornos psicóticos con AAV y población sin diagnóstico específico con AAV	Preactivación antes de las AAV en el giro parahipocampal, ínsula anterior, giro temporal medial derecho, lóbulo frontal izquierdo y giro temporal medial derecho. Activación de la corteza auditiva primaria, ínsula anterior, área de Broca, opérculo frontal, giro precentral, giro temporal medial y superior, lóbulo parietal inferior bilateral, corteza cingulada anterior, hipocampo y región parahipocampal.
Chuanjun et al., 2019	Revisión bibliográfica	Pacientes con esquizofrenia con AAV y población sin diagnóstico con AAV	Conectividad funcional reducida entre Broca y Wernicke y entre lóbulos temporales y frontales. Anormalidades en la activación de la ínsula, córtex cingulado anterior, giro angular, giro frontal inferior, giro parahipocampal.
Kim et al., 2019	Revisión bibliográfica	Personas con AAV	Conectividad entre el cerebelo, surco temporal superior y núcleo dentado del cerebelo.
Marino et al., 2022	RMf en estado de reposo. Amplitud fraccional de fluctuaciones de baja frecuencia	Pacientes con esquizofrenia con y sin AAV y población sana	Red por defecto: diferencia significativa en la amplitud de las fluctuaciones de baja frecuencia en el giro angular izquierdo y menor activación en corteza cingulada posterior en esquizofrenia con AAV. Menor activación en el área frontal inferior en esquizofrenia con AAV.

Tabla 1. Resumen de los estudios analizados.

En el plano neurofisiológico, se evidencian numerosas áreas cerebrales implicadas en las AAV y que no forman parte del patrón alucinatorio general. En la tabla 1 se puede observar un resumen de los hallazgos de los estudios explorados. Cabe destacar que las mediciones hechas tanto por Blom et al. (2015) como por Chuanjun et al. (2019) se llevaron a cabo tanto en sujetos con trastornos psiquiátricos como en participantes sin etiqueta diagnóstica específica que padecen AAV y, en ambos casos, se describieron las mismas vías y áreas involucradas.



Un área importante a resaltar es el giro angular bilateral. Estas áreas forman parte de la red por defecto (DMN) y están relacionadas con la monitorización del lenguaje interno, el procesamiento del lenguaje, la memoria autorreferencial, la generación de frases y la lectura (Marino et al., 2022). Si se comparan pacientes con esquizofrenia y AAV y personas sin AAV, tanto con esquizofrenia como sanas, se encuentra una diferencia significativa en la amplitud de las fluctuaciones de baja frecuencia en el giro angular izquierdo, revelando correlación significativa con la ocurrencia de alucinaciones. Este giro se encuentra a su vez conectado funcionalmente con la ínsula. La implicación de la ínsula y su relación con el giro angular ponen de manifiesto la contribución de la red de saliencia, así como de la red por defecto en la ocurrencia de AAV (Marino et al., 2022). Otras áreas también implicadas en estas redes son la corteza cingulada anterior y posterior, las zonas temporales y regiones parietales.

Por otro lado, otra de las hipótesis planteadas y complementaria a los datos anteriores es la incapacidad de los sujetos para reconocer los propios pensamientos como lenguaje interno e identificarlos erróneamente como alucinaciones. Mediante EEG y MEG en pacientes con trastornos psicóticos, se demostró que hay anomalías en la conexión entre las áreas frontales implicadas en la generación de pensamientos y las regiones temporales involucradas en la recepción y comprensión del lenguaje, por lo que el pensamiento autogenerado se identifica como lenguaje externo al propio individuo (van Lutterveld y Ford, 2012, citado por Blom, 2015). Además, mediante estudios con RM se ha comprobado que pacientes con esquizofrenia y AAV tienen menor integridad de la sustancia blanca en el fascículo arcuato (conector del giro temporal superior y giro frontal inferior) y patrones de conectividad anómala en el fascículo uncinado (conector de regiones límbicas temporales con el giro frontal inferior y el orbitofrontal), las radiaciones talámicas o las fibras fronto-occipitales (McCarthy-Jones et al., 2015; Ćurčić-Blake et al., 2013 citados por Bohlken et al., 2017). La diferencia hallada en la amplitud de las fluctuaciones del giro angular izquierdo (centro importante de conexión entre centros lingüísticos anteriores y posteriores) y la conectividad reducida entre las áreas de Broca y de Wernicke también respaldan esta hipótesis (Marino et al., 2022; Chaunjun et al., 2019).

#### **4. Discusión**

Como hemos visto, en el plano neurofisiológico, existe acuerdo entre los autores al señalar un funcionamiento anómalo entre las redes por defecto y de saliencia, con importante implicación de estructuras como la ínsula y la corteza cingulada anterior (red de saliencia) o la corteza cingulada posterior y regiones temporales (red por defecto). Así mismo, existen regiones específicas implicadas de forma consistente en las AAV, como el área de Broca, la corteza auditiva primaria, giros temporales superior y medial, el giro angular, así como alteraciones de la conexión entre lóbulos frontales y temporales. Además, aunque en su mayoría los resultados han sido observados en sujetos con esquizofrenia, los estudios con poblaciones psiquiátricas diferentes o con sujetos sin etiqueta diagnóstica con AAV muestran características similares.

Atendiendo a las áreas destacadas, se puede asumir la participación activa de la red neural del lenguaje en la creación de las AAV. Cuando el input auditivo llega al sistema nervioso, este se recibe en las cortezas auditivas primarias de ambos hemisferios. Después, se realiza el análisis espectral en la parte posterior del giro temporal superior y, en el surco temporal superior, el fonológico. Desde este punto, la información pasa a la doble ruta, en la que se define una red dorsal fonológica formada por la corteza facial motora, corteza premotora ventral, área de Broca, ínsula, área de Wernicke, giro temporal superior, giro frontal inferior, giro supramarginal y, a nivel subcortical, principalmente el fascículo longitudinal superior y una red

ventral semántica compuesta por el giro temporal inferior y superior, giro fusiforme, giro frontal inferior, giro angular izquierdo, planum temporale y el fascículo frontooccipital inferior como tracto primordial (Hodgson et al., 2021). Como se puede observar, gran número de las estructuras implicadas en el proceso lingüístico forman parte a su vez de la red neural de las AAV y se dan alteraciones en su activación o conectividad en este fenómeno, respaldando la hipótesis acerca de la incapacidad de reconocer los pensamientos autogenerados como lenguaje interno.

## 5. Conclusiones

En vista de los resultados, aunque en las AAV se encuentra un patrón cerebral similar al descrito por Lefebvre et al. (2016), especialmente en lo que respecta al funcionamiento de la red por defecto y la de saliencia, los estudios enfocados al análisis particular de las AAV revelan un substrato neural único en este fenómeno. En él, se ven involucradas áreas y redes responsables de la producción y comprensión del lenguaje, afirmando que el contenido lingüístico está siendo creado durante la experiencia alucinatoria.

Estos hallazgos permiten comenzar a crear nuevos enfoques de intervención para estas/os pacientes, así como en otras poblaciones que sufren este problema, más allá de los farmacológicos, de manera que se puedan realizar cambios en la dinámica de las redes involucradas. Así, técnicas como la estimulación magnética transcraneal, el neurofeedback o la terapia cognitivo-conductual permitirían entrenar a las/los pacientes en el control consciente de la red ejecutiva central y de sus pensamientos y lenguaje interno, pudiendo cesar así las AAV.

## 6. Referencias bibliográficas

- Blom, J. D. (2015). Auditory hallucinations. *Handbook of clinical neurology*, 129, 433-455.
- Bohlken, M. M., Hugdahl, K., & Sommer, I. E. C. (2017). *Auditory verbal hallucinations: neuroimaging and treatment*. *Psychological Medicine*, 47(2), 199-208.
- Chuanjun, Z., Deguo, J., Chuanxin, L., Xiaodong, L., Jie, L., Guangdong, C., ... & Jingjing, Z. (2019). *Understanding auditory verbal hallucinations in healthy individuals and individuals with psychiatric disorders*. *Psychiatry research*, 274, 213-219.
- de Boer, J. N., Linszen, M. M., de Vries, J., Schutte, M. J., Begemann, M. J., Heringa, S., ... & Sommer, I. E. (2019). *Auditory hallucinations, top-down processing and language perception: a general population study*. *Psychological medicine*, 49(16), 2772-2780.
- Hodgson, V. J., Ralph, M. A. L., & Jackson, R. L. (2021). *Multiple dimensions underlying the functional organization of the language network*. *Neuroimage*, 241.
- Kim, N. Y., Hsu, J., Talmasov, D., Joutsa, J., Soussand, L., ... & Fox, M. D. (2019). *Lesions causing hallucinations localize to one common brain network*. *Molecular Psychiatry*, 26(4), 1299-1309.
- Lefebvre, S., Demeulemeester, M., Leroy, A., Delmaire, C., Lopes, R., Pins, D., ... & Jardri, R. (2016). *Network dynamics during the different stages of hallucinations in schizophrenia*. *Human brain mapping*, 37(7), 2571-2586.
- Marino, M., Spironelli, C., Mantini, D., Craven, A. R., Ersland, L., Angrilli, A., & Hugdahl, K. (2022). *Default mode network alterations underlie auditory verbal hallucinations in schizophrenia*. *Journal of Psychiatric Research*, 155, 24-32.

**77106: ¿Existe la conservación del número en el ámbito musical? / Does conservation of number exist in music?****Área de conocimiento:** PSICOLOGÍA**Autor(es):** Álvaro Arboledas Lorite, Isabel Orts Redondo, Raúl Romero Sánchez**Tutor(es):** Carla Sebastián Enesco**Universidad:** Universidad Complutense de Madrid**Facultad:** Facultad de Psicología**Titulación:** Grado en Psicología**Formato:** Comunicación Oral - Investigación básica**Palabras Clave:** Conservación, número, música, audición, desarrollo cognitivo**RESUMEN**

La capacidad de distinguir apariencia y realidad, e identificar qué cambios afectan a la Identidad de los objetos y cuáles sólo a su apariencia, es uno de los logros fundamentales en el desarrollo cognitivo durante la niñez. En concreto, una de las últimas habilidades en desarrollarse se refiere a las llamadas nociones de conservación. La conservación de una propiedad supone la comprensión de que ciertas transformaciones realizadas a un objeto no alteran dicha propiedad. Evidencia previa ha constatado que los niños menores de 5 años no conservan la identidad cuantitativa de los objetos; evalúan, por ejemplo, cambios de disposición espacial como cambios de cantidad. Sin embargo, estos estudios se han realizado casi exclusivamente en la modalidad sensorial viso-espacial, habiendo escasa investigación acerca de la auditiva. Ello nos motivó a investigar este asunto en el caso de la música, por ser de las clases de objetos sonoros más particulares y complejos que podemos identificar.

Por tanto, en este estudio exploratorio se desarrolla y aplica una tarea de conservación del número auditivo-musical a dos grupos (niños de 6 a 8 años y jóvenes adultos de 20 a 25 años), para abordar dos objetivos: 1) Evaluar si podría considerarse la existencia de una noción de conservación del número en la percepción sonoro-musical análoga a la documentada en modalidad visual; para ello, se midieron las diferencias en la noción de conservación musical propuesta en función de la edad al realizarse transformaciones a unas melodías presentadas. 2) Valorar si una mayor complejidad melódica pudiese facilitar la identificación de la melodía y, en consecuencia, favorecer la conservación del número.

Nuestros resultados parecen apuntar a la posible existencia de una noción de conservación auditivo-musical (existieron diferencias entre grupos) pero no parecen apoyar que sea afectada por distintos niveles de complejidad melódica.

**ABSTRACT**

The ability to distinguish appearance and reality, and to identify which changes affect the essence of objects and which only their appearance, is one of the fundamental achievements in cognitive development during childhood. In particular, one of the last skills to develop concerns the so-called notions of conservation. The conservation of a property implies the understanding that certain transformations made to an object do not alter that property.

Previous evidence has found that children under 5 years of age do not conserve the quantitative identity of objects; they evaluate, for instance, changes in spatial arrangement as changes in quantity. However, these studies have been conducted almost exclusively in the visuospatial sensory modality, with little research on the auditory modality. This motivated us to investigate this issue in the case of music, as it is one of the most particular and complex kinds of sound objects that we can identify.

Therefore, in this exploratory study a task of auditory-musical conservation of number is developed and applied to two groups (children aged 6 to 8 years and young adults aged 20 to 25 years), to address two objectives: 1) To evaluate whether the existence of a notion of conservation of number in sound-musical perception analogous to that documented in visual modality could be considered; for this purpose, the differences in the notion of musical conservation proposed as a function of age were measured when transformations were made to some melodies presented. 2) To assess whether a greater melodic complexity could facilitate the identification of the melody and, consequently, favor the conservation of the number.

Our results seem to point to the possible existence of a notion of auditory-musical conservation (there were differences between groups) but do not seem to support that it is affected by different levels of melodic complexity.

## ¿Existe la conservación del número en el ámbito musical?

### Does conservation of number exist in music?

Álvaro Arboledas Lorite [alarbonate@ucm.es](mailto:alarbonate@ucm.es)

Isabel Orts Redondo [isaborts@ucm.es](mailto:isaborts@ucm.es)

Raúl Romero Sánchez [raurom01@ucm.es](mailto:raurom01@ucm.es)

Carla Sebastián Enesco [carla.sebastian@psi.ucm.es](mailto:carla.sebastian@psi.ucm.es)

Facultad de Psicología. Universidad Complutense de Madrid

#### **RESUMEN**

La capacidad de distinguir apariencia y realidad, e identificar qué cambios afectan a la Identidad de los objetos y cuáles sólo a su apariencia, es uno de los logros fundamentales en el desarrollo cognitivo durante la niñez. En concreto, una de las últimas habilidades en desarrollarse se refiere a las llamadas nociones de conservación. La conservación de una propiedad supone la comprensión de que ciertas transformaciones realizadas a un objeto no alteran dicha propiedad.

Evidencia previa ha constatado que los niños menores de 5 años no conservan la identidad cuantitativa de los objetos; evalúan, por ejemplo, cambios de disposición espacial como cambios de cantidad. Sin embargo, estos estudios se han realizado casi exclusivamente en la modalidad sensorial viso-espacial, habiendo escasa investigación acerca de la auditiva. Ello nos motivó a investigar este asunto en el caso de la música, por ser de las clases de objetos sonoros más particulares y complejos que podemos identificar.

Por tanto, en este estudio exploratorio se desarrolla y aplica una tarea de conservación del número auditivo-musical a dos grupos (niños de 6 a 8 años y jóvenes adultos de 20 a 25 años), para abordar dos objetivos: 1) Evaluar si podría considerarse la existencia de una noción de conservación del número en la percepción sonoro-musical análoga a la documentada en modalidad visual; para ello, se midieron las diferencias en la noción de conservación musical propuesta en función de la edad al realizarse transformaciones a unas melodías presentadas. 2) Valorar si una mayor complejidad melódica pudiese facilitar la identificación de la melodía y, en consecuencia, favorecer la conservación del número.

Nuestros resultados parecen apuntar a la posible existencia de una noción de conservación auditivo-musical (existieron diferencias entre grupos) pero no parecen apoyar que sea afectada por distintos niveles de complejidad melódica.

#### **ABSTRACT**

The ability to distinguish appearance and reality, and to identify which changes affect the essence of objects and which only their appearance, is one of the fundamental achievements in cognitive development during childhood. In particular, one of the last skills to develop concerns the so-called notions of conservation. The conservation of a property implies the understanding that certain transformations made to an object do not alter that property.

Previous evidence has found that children under 5 years of age do not conserve the quantitative identity of objects; they evaluate, for instance, changes in spatial arrangement as changes in quantity. However, these studies have been conducted almost exclusively in the visuospatial sensory modality, with little research on the auditory modality. This motivated us to investigate this issue in the case of music, as it is one of the most particular and complex kinds of sound objects that we can identify.

Therefore, in this exploratory study a task of auditory-musical conservation of number is developed and applied to two groups (children aged 6 to 8 years and young adults aged 20 to 25 years), to address two objectives: 1) To evaluate whether the existence of a notion of conservation of number in sound-musical perception analogous to that documented in visual modality could be considered; for this purpose, the differences in the notion of musical conservation proposed as a function of age were measured when transformations were made to some melodies presented. 2) To assess whether a greater melodic complexity could facilitate the identification of the melody and, consequently, favor the conservation of the number.

Our results seem to point to the possible existence of a notion of auditory-musical conservation (there were differences between groups) but do not seem to support that it is affected by different levels of melodic complexity.

**Palabras clave:** Conservación, número, música, audición, desarrollo cognitivo.

**Key words:** Conservation, number, music, audition, cognitive development.

## 1. Introducción.

Uno de los logros fundamentales en el desarrollo cognitivo durante la niñez es distinguir entre apariencia y realidad, e identificar qué cambios afectan a la identidad de los objetos y cuáles sólo a su apariencia (Piaget e Inhelder, 1967). En los dos primeros años de vida, el bebé adquiere aspectos básicos de la noción de objeto (lo que se denomina permanencia del objeto), del tipo “mi madre sigue existiendo, aunque no la vea”, o “si se esconde un pato de goma tras un cojín, tiene que reaparecer un pato y no un oso de juguete”. Durante la niñez temprana, comienzan también a entender que una persona, y en general los seres vivos, sigue siendo ella misma aunque cambie su apariencia (peinado, forma de vestir, etc.) y que por el contrario, el cambio de apariencia de un objeto inanimado (ej., una cafetera) puede resultar en un cambio de identidad (y convertirse en un jarrón para las flores). Durante esta etapa evolutiva temprana, se dice por tanto que los y las niñas adquieren la noción de identidad *cuantitativa*.

El último logro relacionado con la distinción entre apariencia y realidad se refiere a las llamadas nociones de conservación, y tiene que ver con la identidad *cuantitativa* de los objetos. Así, hay transformaciones de la materia que no implican cambios en su cantidad o número. Si modificamos la distribución espacial de una serie de 8 galletas colocadas en fila, por ejemplo, separándolas unas de otras, el número de elementos no se ve afectado. Este aspecto de la comprensión del mundo es tan básico para el adulto que resulta sorprendente que los niños tarden años en adquirirlo. Típicamente, los menores de 5 años piensan que esta transformación conlleva un aumento de la identidad cuantitativa de las galletas, aun cuando han observado que no se ha añadido ni quitado ningún elemento. Esta dificultad se debe a que a estas edades, los niños se dejan llevar por las apariencias perceptivas, centrándose en un aspecto saliente pero irrelevante (ahora la fila de galletas ocupa más) e ignorando otros importantes (el valor cardinal del conjunto se mantiene igual). En este caso, se dice que el niño es aún *no conservador* (vs. conservador cuando ya es capaz de entender la invarianza, en este caso, del número). Este ejemplo corresponde a la conservación del número, una de las nociones de conservación más tempranas en construirse, pero hay otras, como por ejemplo, la del área o del volumen que suponen un largo periodo de adquisición y hasta bien entrada la adolescencia no conservan (Piaget e Inhelder, 1967).

La mayoría de la investigación en conservación se ha realizado en la modalidad sensorial visual, siendo llamativo el relativo bajo interés en otras modalidades sensoriales. Una de las clases de objetos más particulares y complejos que podemos identificar son los sonidos y en particular, la música. A diferencia de los objetos físicos, los estímulos sonoros son sucesos temporales que, una vez se perciben auditivamente, desaparecen. De esto se deriva que cualquier transformación de un estímulo sonoro (afecte o no a la identidad cuantitativa del mismo) no se pueda observar. Algunos autores (ej., Serafin, 1980) apuntan que esta característica puede dificultar la adquisición de la noción de conservación para los estímulos musicales. No obstante, la investigación previa es escasa y los pocos estudios que exploran cómo se desarrolla la noción de conservación musical presentan ciertas limitaciones. Por ejemplo, Pflederer (1964) usó como estímulos fragmentos musicales relativamente complejos que además eran potencialmente conocidos por los participantes (p. ej., fragmentos de obras de música clásica o de canciones infantiles populares de EEUU). Esto presenta al menos dos problemas. Por un lado, una dificultad excesiva de los estímulos podría dificultar el desarrollo de la tarea por la implicación de otras limitaciones cognitivas distintas a las estudiadas. Por otro

lado, que los fragmentos formaran parte del acervo popular podría estar añadiendo variables de confusión en la evaluación de los participantes. Por su parte, Hargreaves & North (2000) abordó parte de estos problemas, pero sus técnicas de transformación de los estímulos dependía demasiado de las capacidades visuales de los participantes. Por todo ello, consideramos necesario realizar investigación nueva que utilice analogías adecuadas entre las tareas de conservación con objetos físicos y auditivos (Fig. 1) con el fin de evaluar el desarrollo de la noción de conservación musical.

Por ello, este estudio opta por usar estímulos mucho más sencillos (en comparación a los usados en los estudios ya citados), pues tienen la ventaja de poder delimitar bien las variables a manipular. Por su sencillez, se encuentran a medio camino entre lo que podríamos considerar estímulos musicales y estímulos meramente auditivos. Para acotar aún más, este estudio se centra en la conservación del número porque 1) está estrechamente ligada con la capacidad de identificación de objetos más rudimentaria y 2) es la más intuitivamente traducible al terreno sonoro-musical. Nuestros estímulos test (véase Fig. 1) son pseudo-**melodías** breves formadas a partir de la concatenación de lo que, en el contexto de este estudio, hemos llamado **Elementos sonoros-musicales (ESMs)**. Cada ESM es una agrupación perceptiva de una o más notas musicales (sucesión de tonos puros de distinta frecuencia). Los ESMs constituyen las unidades perceptivas básicas *identificables y distinguibles* (por similitud, repetición, y contigüidad temporal), que serían análogas a cada una de las monedas en tareas clásicas de conservación del número. Una razón por la que este tipo de estímulos pueden considerarse “musicales” es que se usan las doce notas musicales del sistema de afinación (o temperamento) igual. Este sistema divide de manera equidistante la octava en 12 sonidos (notas) que coinciden con las notas que encontraríamos en un piano (Michels, 1985, p. 17).

El presente es un estudio exploratorio en el que se aplica una tarea de conservación del número auditivo-musical desarrollada para abordar dos objetivos principales. En primer lugar, estamos interesados en averiguar si, en línea con las tareas clásicas, se encuentran diferencias en función de la edad (VI) en la noción de conservación musical (VD) cuando se realizan transformaciones de las melodías presentadas (modificaciones de sus características en términos de ritmo o número de ESM); y si, en vista de lo anterior, podría considerarse la existencia de una noción de conservación del número en la percepción sonoro-musical análoga a la documentada en modalidad visual, pudiendo así clasificar a los sujetos en conservadores o no conservadores. En segundo lugar, se explora si una mayor complejidad melódica (número de notas y diferencia *en* y *entre* los ESM), pudiese facilitar la identificación de la melodía y, en consecuencia, favorecer la conservación.

## 2. Método.

### 2.1 Participantes.

Se entrevistaron participantes correspondientes a dos grupos de edad: niños (n = 3 ; edad media 7,66 años) y, jóvenes adultos universitarios (n = 3; edad media 22 años). Todos los participantes afirmaron verbalmente estar de acuerdo en formar parte de este estudio en el momento de la entrevista. En el caso de los menores de edad, se contó además con el consentimiento parental escrito previo a su participación.

## 2.2 Procedimiento.

Tras un periodo de familiarización con los estímulos, se le presentó a cada sujeto tres tareas compuestas por 5 ensayos cada una. En cada ensayo, se presentaron parejas de melodías de manera secuencial. La primera de ellas fue el **estímulo en estado inicial**, *sin transformar*; siempre el mismo para cada tarea. La segunda fue el **estímulo test (ETest)**, que podía aparecer *con o sin transformación*. Las transformaciones podían ser de dos tipos: de ritmo o de número. En las transformaciones de ritmo, lo que varía es la duración total de la melodía, es decir, el tiempo que transcurre entre la primera nota y la última. En las de número, en cambio, varía el número de EMSs que forman la melodía, que en algunos ensayos era uno más que en el Estado inicial (5 notas) y en otros, uno menos (3 notas).

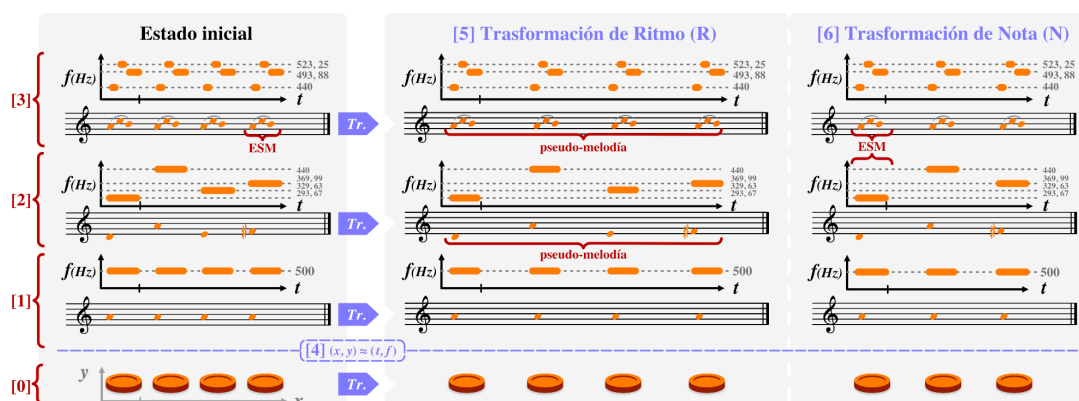
Tras la escucha de cada pareja de melodías, los sujetos debían contestar si habían escuchado mayor, menor o igual número de EMSs (“notas” o “grupitos” según conviniese) en ET respecto al estímulo en estado inicial.

Cada tarea siguió el mismo patrón de ensayos (mismas transformaciones en igual orden). La división del experimento en tres tareas distintas tiene como objetivo evaluar la pregunta de investigación 3. Las tareas difieren entre sí en los EMSs que constituyen las melodías, las cuales son progresivamente más complejas:

- **Tarea 1 (T1).** Cada melodía está compuesta por varios *ESMs iguales*: en estado inicial, (ver [1], Figura 1), una misma nota (frecuencia de 500 Hz) repetida cuatro veces.
- **Tarea 2 (T2).** Cada melodía está compuesta por varios *ESMs distintos*: en estado inicial, (ver [2], Figura 1), cuatro notas distintas (con frecuencias de 293, 329, 369 y 440 Hz).
- **Tarea 3 (T3).** Cada melodía está compuesta por varios *ESMs iguales*: en estado inicial (ver [3], Figura 1), cuatro grupos de tres notas distintas (con frecuencias de 440, 493 y 523 Hz).

Para evitar el efecto *priming*, se utilizó el mismo set de notas dentro de cada tarea, pero distinto de una tarea a otra.

**Figura 1. Diseño de los estímulos y transformaciones análogas a la tarea clásica de conservación del número.**



*Nota.* [4] Analogía realizada entre una tarea de conservación del número visual [0] y nuestra tarea: dos dimensiones visuales (espaciales) son interpretadas como dos visuales – a saber: *frecuencia* (nota) y *tiempo* (ritmo). [5 y 6] Las transformaciones realizadas en función de dicha analogía; en [5] se conserva la identidad cuantitativa y [6] la altera (no la conserva). [1][2][3]



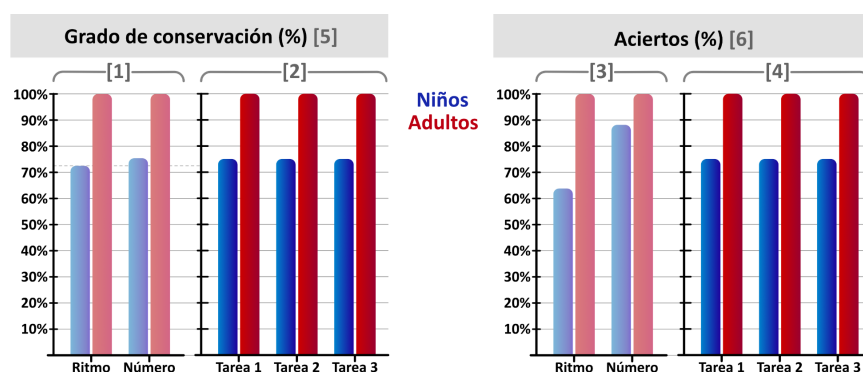
Ejemplos de la Tareas 1, 2 y 3 y [0] de tarea visual de conservación de número con fichas.

### 3. Resultados

Se realizaron comparaciones entre niños y adultos según sus puntuaciones en dos variables: 1) según la *proporción de aciertos* (Ver [6], Figura 2); es decir, aquellos ensayos en los que los sujetos identificaron correctamente si hubo o no conservación del número. Las puntuaciones de aciertos incluyen aciertos fortuitos. Y 2) El *grado de conservación* (Ver [5], Figura 2), es la variable más relevante, que se obtuvo descontando de las puntuaciones de aciertos aquellos que eran fortuitos (esto se hizo mediante una serie de preguntas de control a los sujetos).

Se encontraron diferencias entre las puntuaciones de los dos grupos de edad en cada una de las condiciones, siendo los adultos los que las realizaron con mayor eficacia, mientras que los niños reflejaron un menor grado de conservación y una menor proporción de aciertos a la hora de identificar las transformaciones. Las gráficas [5] y [6] desglosan estos resultados según tareas, mostrando que no hay diferencias de grado de conservación ni de aciertos entre ellas. Salvo en el caso de [3], no encontramos diferencias entre las transformaciones de ritmo y número en ninguna de las condiciones.

**Figura 2. Resultados principales de la tarea de conservación del número en música.**



*Nota.* [1] y [3] muestran puntuaciones medias en las transformaciones de ritmo y número para niños y adultos. [2] y [4] muestran puntuaciones medias de niños y adultos en cada una de las tres tareas.

### 4. Discusión y conclusiones

El presente estudio planteó como objetivo principal evaluar si existe o no conservación del número en el ámbito musical. Para ello, se compararon las respuestas de un grupo de niños 7,66 años de media y las de un grupo de adultos de media 22 años en un experimento compuesto de tres tareas, en las que difieren los llamados en este estudio EMSs, pero se mantienen constantes los tipos de transformaciones o variaciones de las melodías durante los ensayos.

En cuanto a nuestra primera pregunta de investigación, se podría decir que, en general, los resultados van en línea con lo esperado de una tarea de conservación clásica: los adultos obtienen sistemáticamente mayor o igual puntuación que el grupo de niños en conservación y en aciertos netos en *todas* las tareas y en *todos* los tipos de transformaciones. Esto mismo es lo

que cabría esperar en una tarea de conservación del número visual, lo que apuntaría a que quizás se puede hablar de conservación del número sonoro-musical, como capacidad cognitiva, de forma análoga a la viso-espacial.

En cuanto a nuestra segunda pregunta, no hemos observado diferencias entre T1, T2, y T3; lo cual podría indicar que la conservación del número no se ve afectada por los diferentes grados de complejidad que hemos estipulado, independientemente de la complejidad estimular de los ESM en sí; o al menos eso podría deducirse dentro del rango de edades manejado y los niveles de complejidad expuestos. Así ocurrió en todos los casos excepto uno, el del segundo participante, un niño que, a pesar de ser un curso menor que los otros dos, acertó *todos* los ensayos de las tareas 1 y 2; e interpretamos que es conservador. Con respecto a los otros dos niños, ante la disparidad de respuestas obtenidas podemos deducir que se encuentran en transición. En cuanto a los resultados de los adultos, los cuatro participantes acertaron en todos los ensayos de las tres tareas. Por ello interpretamos que todos los adultos son conservadores.

Si se quisiera replicar este estudio, sería recomendable tener en cuenta, y a ser posible solucionar, las limitaciones presentadas a continuación:

En primer lugar, dado que nuestra noción de transformación sonoro-musical necesariamente implica comparación entre representaciones mentales separadas temporalmente, es posible que las tasas de error que observamos en las respuestas de los niños sean mayores que las de los adultos por una limitación de memoria operativa. Sobre esto sería también recomendable investigar más a fondo, por ejemplo, en adultos con déficits en este tipo de memoria o en niños que presenten mayores capacidades en este aspecto.

En segundo lugar, disponer de una muestra más grande, en la que estén representados diversos grupos de edad. Se debería, además, formar grupos de personas con y sin formación musical previa, con el fin de contrastar con mayor evidencia la influencia de la edad y la formación musical.

## 5. Referencias bibliográficas

- Hargreaves, D. J., & North, A. C. (2000). Effects of Stimulus Transformation Mode on “Music Conservation” Responses in Schoolchildren. *Bulletin of the Council for Research in Music Education*, 147, 72–76. <http://www.jstor.org/stable/40319390>
- Michels, U., Mames, L., & Vogel, G. (1985). *Atlas de música* (v. 1). Alianza. <https://books.google.es/books?id=Pjl0nwEACAAJ>
- Pflederer, M. (1964). The responses of children to musical tasks embodying Piaget's principle of conservation. *Journal of Research in Music Education*, 1
- Piaget, J. e Inhelder, B. (1967). *Psicología del niño* (ed. renovada). Ediciones Morata, 2016.
- Serafine, M. L. (1980). Piagetian Research in Music. *Bulletin of the Council for Research in Music Education*, 62, 1–21. <http://www.jstor.org/stable/40317589>

**76648: La toxicidad por aminoglucósidos como un factor limitante en aves. Aminoglycosides toxicity as a limiting factor in birds****Área de conocimiento:** VETERINARIA**Autor(es):** Sandra Hernández García**Tutor(es):** Casilda Rodríguez Fernández, Fernando González González**Universidad:** Universidad de Extremadura.**Facultad:** Facultad de Veterinaria.**Titulación:** Grado en Veterinaria**Formato:** Comunicación Oral - Revisiones bibliográficas**Palabras Clave:** Aminoglucósidos, aves, gentamicina, toxicidad, amikacina, aminoglycosides, birds, gentamicin, toxicity, amikacin.

Resumen: los aminoglucósidos son antimicrobianos bactericidas, relevantes en el emergente marco de las resistencias antimicrobianas e incluidos en las categorías D y C de la clasificación establecida en la Unión Europea para el uso de antimicrobianos en veterinaria, sin embargo, no están exentos de toxicidad. Por ello, se ha realizado una revisión crítica de los principales efectos adversos, que son un importante factor limitante de su uso, en contraposición a las ventajas antimicrobianas que ofrecen en medicina aviar. El uso de los aminoglucósidos en aves está limitado no por su ototoxicidad a nivel de las células ciliadas de la membrana basilar aviar, puesto que esta alteración es reversible (al contrario que en mamíferos), sino por la gravedad de su nefrotoxicidad, que puede llegar a provocar la muerte del animal. También, pueden originar bloqueo neuromuscular con muerte fulminante cuando alcanza concentraciones plasmáticas elevadas. Para posibilitar un uso racional de estos antibióticos en aves, se requieren estudios más amplios que permitan establecer regímenes de dosis seguros y basados en la modelización farmacocinética/farmacodinámica dirigida a velar por la seguridad y la eficacia antimicrobiana reduciendo el riesgo de resistencias, teniendo en cuenta que la amikacina es el aminoglucósido que parece ser más seguro dentro de este grupo.

Abstract: aminoglycosides are bactericidal antimicrobials, relevant in the emerging framework of antimicrobial resistance, and included in categories D and C in the classification established in the European Union for the use of antimicrobials in veterinary medicine. However, these are not exempt from toxicity. For this reason, a critical review of the main adverse effects has been carried out, as it is an important limiting factor for their use, in opposition to the antimicrobial advantages that they offer in avian medicine. The use of aminoglycosides in birds is not limited by their ototoxicity affecting the hair cells of the basilar papilla, since this alteration is reversible (unlike in mammals); however, nefrotoxicity can be severe and lead to the death of bird. Also, they can cause neuromuscular blockade with fulminant death when it reaches high plasmatic concentrations. To enable rational use of these antibiotics in birds, further studies are required to establish safe dosage regimens, based on pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling aimed at ensuring safety and antimicrobial efficacy by reducing the risk of resistance, considering that amikacin is the aminoglycoside that appears to be the safest within this group.

## La toxicidad por aminoglucósidos como un factor limitante en aves.

### Aminoglycosides toxicity as a limiting factor in birds.

1513654 Sandra Hernández García (1) [shernandjl@alumnos.unex.es](mailto:shernandjl@alumnos.unex.es)

Casilda Rodríguez Fernández (2) [rodfermc@vet.ucm.es](mailto:rodfermc@vet.ucm.es)

Fernando González González (2), (3) [fegonz04@ucm.es](mailto:fegonz04@ucm.es) [fgonzalez@grefa.org](http://fgonzalez@grefa.org)

Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura (1).

Tutores: Facultad de Veterinaria UCM (2) y GREFA (3).

**Resumen:** los aminoglucósidos son antimicrobianos bactericidas, relevantes en el emergente marco de las resistencias antimicrobianas e incluidos en las categorías D y C de la clasificación establecida en la Unión Europea para el uso de antimicrobianos en veterinaria, sin embargo, no están exentos de toxicidad. Por ello, se ha realizado una revisión crítica de los principales efectos adversos, que son un importante factor limitante de su uso, en contraposición a las ventajas antimicrobianas que ofrecen en medicina aviar. El uso de los aminoglucósidos en aves está limitado no por su ototoxicidad a nivel de las células ciliadas de la membrana basilar aviar, puesto que esta alteración es reversible (al contrario que en mamíferos), sino por la gravedad de su nefrotoxicidad, que puede llegar a provocar la muerte del animal. También, pueden originar bloqueo neuromuscular con muerte fulminante cuando alcanza concentraciones plasmáticas elevadas. Para posibilitar un uso racional de estos antibióticos en aves, se requieren estudios más amplios que permitan establecer regímenes de dosis seguros y basados en la modelización farmacocinética/farmacodinámica dirigida a velar por la seguridad y la eficacia antimicrobiana reduciendo el riesgo de resistencias, teniendo en cuenta que la amikacina es el aminoglucósido que parece ser más seguro dentro de este grupo.

**Abstract:** aminoglycosides are bactericidal antimicrobials, relevant in the emerging framework of antimicrobial resistance, and included in categories D and C in the classification established in the European Union for the use of antimicrobials in veterinary medicine. However, these are not exempt from toxicity. For this reason, a critical review of the main adverse effects has been carried out, as it is an important limiting factor for their use, in opposition to the antimicrobial advantages that they offer in avian medicine. The use of aminoglycosides in birds is not limited by their ototoxicity affecting the hair cells of the basilar papilla, since this alteration is reversible (unlike in mammals); however, nefrotoxicity can be severe and lead to the death of bird. Also, they can cause neuromuscular blockade with fulminant death when it reaches high plasmatic concentrations. To enable rational use of these antibiotics in birds, further studies are required to establish safe dosage regimens, based on pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling aimed at ensuring safety and antimicrobial efficacy by reducing the risk of resistance, considering that amikacin is the aminoglycoside that appears to be the safest within this group.

**Palabras clave:** aminoglucósidos, aves, gentamicina, toxicidad, amikacina.

**Key words:** aminoglycosides, birds, gentamicin, toxicity, amikacin.

## 1. Introducción

El número de enfermedades infecciosas emergentes, tanto en humanos como en organismos no humanos, ha aumentado durante las últimas 3 décadas, particularmente en la interfaz humano-doméstica-vida silvestre (Robles-Fernández et al., 2022). Asimismo, las resistencias a antimicrobianos conforman un desafío urgente para la salud mundial, tanto humana como veterinaria, estando las aves silvestres implicadas en este problema (Wang et al., 2017). Teniendo en cuenta un uso prudente y racional de los antimicrobianos, los aminoglucósidos en aves silvestres estarían dentro de los fármacos de primera elección, en base a la categorización de antimicrobianos para su uso en veterinaria, ya que en España están incluidos en las categorías D (espectinomycin) y C (resto de aminoglucósidos).

Los aminoglucósidos son inhibidores de la síntesis proteica que actúan sobre la subunidad 30S de los ribosomas bacterianos, provocando una lectura anormal de ARNm y produciendo proteínas anómalas. Otras acciones de estos fármacos se dan sobre la cadena de transporte de electrones (afectando al metabolismo energético), el ADN (provocando su ruptura), y las membranas celulares (dañándolas) (Pagkalis et al., 2011). Estos actúan como antibióticos bactericidas, principalmente frente a patógenos aerobios Gram-negativos y *Staphylococcus spp.*, representando una opción terapéutica relevante contra enfermedades producidas por *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter spp.* o *Staphylococcus aureus*, siendo algunas de estas bacterias catalogadas como resistentes a muchos tratamientos [Organización Mundial de la Salud OMS, 2023]. En el uso clínico de estos antimicrobianos debemos tener en cuenta que, desafortunadamente, la mayoría de los regímenes de dosificación empleados se basan en trabajos farmacocinéticos (PK), no integrados con parámetros farmacodinámicos (PD) como la CIM (Concentración Inhibitoria Mínima), lo que hace que no sepamos si alcanzan los puntos de corte  $C_{max}/CIM$  necesarios para asegurar su eficacia antimicrobiana, evitando la emergencia de resistencias (Soh et al., 2022). La principal limitación en el uso de aminoglucósidos se debe a la producción de toxicidad, saturable y acumulativa, que afecta principalmente al riñón (nefrotoxicidad), al oído (ototoxicidad), y produce bloqueo neuromuscular. En veterinaria se usan ampliamente en el tratamiento local de infecciones y, a pesar de sus efectos secundarios, se utilizan de forma sistémica en infecciones graves y/o resistentes. El objetivo de este trabajo es hacer una revisión crítica de la información disponible, enfocada al análisis de los principales efectos adversos, en contraposición a las ventajas que ofrecen dentro de las posibilidades antimicrobianas en medicina aviar.

## 2. Material Y Métodos

La información se ha recogido mediante motores de búsqueda, bases de datos y recursos como las guías del PRAN (Plan Nacional Resistencia Antibióticos) o formularios de referencia. Se han utilizado como criterios de búsqueda los términos: “AMINOGLYCOSIDES”, “BIRDS”, “OTOTOXICITY”, “NEPHROTOXICITY” y “INFECTIOUS DISEASES”.

### 3. Resultados

Los aminoglucósidos son utilizados principalmente frente a infecciones producidas por bacterias Gram-negativas aerobias, ya que su capacidad de acción es dependiente de oxígeno, mostrándose eficaces también contra patógenos multirresistentes. De hecho, representan una opción terapéutica atractiva contra bacilos fermentadores Gram-negativos, incluyendo *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter spp.* (Pagkalis et al., 2011). También tienen acción antimicrobiana frente a algunos microorganismos Gram-positivos (*Staphylococcus spp.*). Poseen un efecto bactericida, que es dosis-dependiente frente a bacterias Gram- negativas y parcialmente dosis-dependiente frente a grampositivas. Sus efectos terapéuticos, así como los adversos, van a estar íntimamente relacionados por tanto con la dosis de fármaco administrada. Aunque existen diferentes aminoglucósidos aprobados para su uso en animales de producción (en general buscando una acción local: tras administración oral indirecta, cutánea, intramamaria, ...) o de compañía, sólo existen dos especialidades aprobadas para aves ornamentales, y estas están dirigidas a un tratamiento local (neomicina para uso cutáneo, y gentamicina para uso digestivo, en agua de bebida) [Plan Nacional Resistencia Antibióticos, 2023].

En medicina aviar, la amikacina y la gentamicina son los dos aminoglucósidos más comúnmente utilizados y estudiados, ya que la amikacina es el fármaco de esta familia que menos efectos adversos produce, y la gentamicina el que tiene un coste más económico. La primera parece ser segura en aves exóticas ya que, a diferencia de la segunda, es escasa la información y se considera menos tóxica. (Soh et al., 2022). Sin embargo, esa mayor seguridad no debe evitar una vigilancia del grado de hidratación y del funcionamiento renal del ave tratada, evitando el cotratamiento con otros fármacos nefrotóxicos (Sánchez-Migallón et al., 2023). En cambio, sí están ampliamente descritos efectos adversos notables de diversa índole para la gentamicina, tanto en la administración por vía intramuscular (IM) como intravenosa (IV) (Soh et al., 2022). Así, en ratoneros (*Buteo jamaicensis*), la administración de gentamicina IV, produce depresión (en grado variable), ataxia, disnea, alteración de parámetros bioquímicos (proteínas totales, BUN, albúmina, ácido úrico, AST, ALP), cristales de urato en riñones y alteraciones hepáticas (superficie moteada y hemorragias petequiales focales) tras la necropsia, gota visceral y aerosaculitis caseosa focal. Todos los individuos del grupo expuesto a dosis más altas (20 mg/kg q12h durante 6 días) murieron, apareciendo en algunos casos muerte súbita tras la inyección, posiblemente a causa del bloqueo neuromuscular producido por la gentamicina (Bird et al., 1983; Soh et al., 2022).

#### 3.1. Nefrotoxicidad.

Tras la infusión intravenosa de aminoglucósidos, estos apenas tienen afinidad por las proteínas plasmáticas, siendo su principal vía de eliminación la filtración glomerular. Esto implica que las dosis administradas van a ser extensamente filtradas, produciendo la consecuente toxicidad renal. Penetran en las células epiteliales del túbulo proximal renal, uniéndose a la membrana luminal. El complejo de transporte epitelial megalina-cubilina permite su internalización, formando un endosoma que, se unirá al lisosoma celular (fusión endosoma-lisosoma). En este punto, se une a fosfolípidos ácidos, promoviendo la inhibición de

fosfolipasas y la acumulación de cuerpos mieloides. Como resultado se produce una distensión lisosomal y finalmente la ruptura, liberándose las hidrolasas lisosomales y los aminoglucósidos al citosol. Esto dará lugar a importantes alteraciones celulares, como la imposibilidad mitocondrial de producir ATP, efectos lesivos sobre el retículo endoplasmático (incapacitando la síntesis proteica y la acción de los transportadores de membrana), impidiendo así la reabsorción tubular. Estas alteraciones finalizan con apoptosis celular. La disminución en la reabsorción de agua y electrolitos, producida por el déficit funcional de las células, origina una diuresis osmótica con la consecuente activación del eje renina-angiotensina-aldosterona, lo que reduce aún más la TFG (Tasa de Filtración Glomerular) (Boyer et al., 2013).

En palomas domésticas (*Columba livia*) se valoró el daño renal ocasionado por la exposición a gentamicina (15 mg/kg, IM, cada 12 h durante 6 d) mediante gammagrafía utilizando  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA (Tecnecio 99m - ácido dimercaptosuccínico) (Marshall et al., 2003) Aunque la gentamicina no produjo diferencias relevantes en las imágenes de gammagrafía, sí redujo la captación de  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA por el parénquima renal. Como hallazgo histológico destaca la presencia de gránulos citoplasmáticos eosinofílicos en las células tubulares y la presencia de células epiteliales necróticas o regenerativas. Los efectos tóxicos de la gentamicina afectan a la función lisosomal de las células de los túbulos contorneados proximales del riñón como se aprecia tras la tinción PAS (Periodic Acid-Schiff) ya que produce fenómenos de autofagocitosis celular, y acumulo lisosomal de material PAS positivo (Marshall et al., 2003). En ratoneros de cola roja (*Buteo jamaicensis*), el tratamiento con gentamicina también origina un aumento en el tamaño y número de gránulos citoplasmáticos PAS positivos en las células epiteliales del túbulo proximal de las nefronas renales. La microscopía electrónica reveló que estos gránulos PAS positivos eran en realidad lisosomas que contenían grandes inclusiones laminares (cuerpos mieloides) (Bird et al., 1983). En estudios realizados en aves (paloma y ratonero) se aprecian diferencias con la información publicada para mamíferos (perro y ser humano) en la cuantificación radiológica de la nefrotoxicidad inducida por gentamicina (Bird et al., 1982; Marshall et al., 2003). Los autores atribuyen estas diferencias a varios factores específicos de la anatomo-fisiología aviar: la presencia mayoritaria de nefronas de tipo reptiliano (70-90% de nefronas son de tipo reptiliano, aunque su proporción varía entre especies y es el reflejo de las adaptaciones ambientales), que carecen de asas de Henle y túbulos contorneados, y la existencia de nefronas de tipo mamífero que poseen asas de Henle de mayor diámetro que en mamíferos. Finalmente, destacan que la secreción en los túbulos proximales de las aves ocurre mediante mecanismos de transporte activo, diferentes a los que ocurren en mamíferos (Marshall et al., 2003). Sin embargo, no queda claro en el estudio los argumentos expuestos para justificar esas diferencias en base a estas particularidades.

El riesgo de toxicidad renal disminuye bastante cuando utilizamos regímenes que incrementan el intervalo entre dosis, y más aún si realizamos la dosificación basándonos en los datos de monitorización farmacocinética personalizada de un paciente (Pagkalis et al., 2011).

### **3.2. Ototoxicidad.**

Los aminoglucósidos entran desde la endolinfa a las células ciliadas auditivas mediante endocitosis apical o canales de transducción mecano-eléctrica (Pagkalis et al., 2011). El sistema auditivo de las aves cuenta con capacidad para generar nuevas células ciliadas como reemplazo de otras que han sido dañadas por mecanismos traumáticos o tóxicos. Junto con

esta regeneración celular podemos observar la casi completa restauración de la audición perdida en casos de lesión. En el proceso de regeneración se produce la aparición de nuevos haces de estereocilios, que experimentan una secuencia de desarrollo muy similar a la acontecida durante la embriogénesis, mostrando finalmente la morfología correspondiente a su localización en el gradiente tonotópico de la membrana basilar (Cotanche et al., 1994). Si examinamos la membrana basilar inmediatamente después de la administración de un fármaco con características ototóxicas, vemos el mosaico del epitelio sensitivo interrumpido en la zona más proximal. La extensión de la lesión va a depender de la dosis administrada y la duración del tratamiento. Tras 5 días post-administración de gentamicina (50 mg/kg durante 5-10 días), se observa una pérdida de la totalidad de células ciliadas en la membrana basilar proximal (en torno al 12,5%), llegando este daño a extenderse más allá del 60% de la misma si prolongamos el tratamiento hasta 4 semanas. Los aminoglucósidos alcanzan un nivel máximo de ototoxicidad concentración-dependiente, no pudiendo agravarse los daños a partir de ciertas dosis. En cuanto a la recuperación celular de la membrana basilar, se han observado signos significativos de recuperación incluso al 5º día durante el tratamiento con gentamicina, apareciendo haces de células inmaduras en el área proximal de la membrana basilar allá donde se habían perdido por completo las células preexistentes. Esto indica que las células progenitoras son capaces de continuar con su ciclo celular, así como las nuevas células ciliadas son capaces de afrontar sus fases tempranas de diferenciación, incluso en presencia de gentamicina. La recuperación se lleva a cabo desde la parte más distal de la membrana basilar, avanzando progresivamente hacia el extremo proximal en un periodo de recuperación de aproximadamente 20 semanas. Esta recuperación estructural va acompañada de la funcional, recuperándose la capacidad auditiva perdida. Bajo nuestro conocimiento, no existe información disponible sobre el daño vestibular de los aminoglucósidos en aves. A diferencia de mamíferos, la ototoxicidad inducida por aminoglucósidos en aves es reversible.

Además de estos efectos tóxicos a nivel ótico y renal, existen evidencias de que la gentamicina puede producir bloqueo neuromuscular, provocando la muerte del animal, como se encuentra recogido en un estudio realizado en ratoneros de cola roja (*Buteo jamaicensis*) (Bird et al., 1983). En dicho estudio, las aves fueron divididas en dos grupos sometidos a distintas dosis de gentamicina, administrada por vía intravenosa (Grupo 1: 10 mg/kg q12h durante 4 días; Grupo 2: 20 mg/kg q12h durante 6 días). Todos los individuos del grupo 2 murieron, y en este mismo grupo aparecieron signos de debilidad y apnea tras la inyección, atribuidos al bloqueo neuromuscular inducido por la gentamicina. Además, en algunos ejemplares esto produjo también la muerte súbita. Esto se produce cuando alcanza elevadas concentraciones, siendo en la administración IV rápida donde existe un mayor riesgo (Soh et al., 2022).

#### **4. Conclusiones**

A pesar de su excelente espectro de actividad, y de ser una alternativa de primera elección por su inclusión en las categorías C (Cautela) y D (Prudencia) de la clasificación de antimicrobianos para su uso veterinario, el empleo de aminoglucósidos en aves está limitado no por su ototoxicidad a nivel de las células ciliadas de la membrana basilar aviar, puesto que esta alteración es reversible en aves al contrario que en mamíferos, sino por la gravedad de su



nefrotoxicidad, que puede llegar a provocar la muerte del animal. También es importante tener en cuenta la posibilidad de que produzcan un bloqueo neuromuscular con muerte fulminante cuando se alcanzan elevadas concentraciones plasmáticas. Para posibilitar un uso racional de estos antibióticos en aves, se requieren estudios más amplios que permitan establecer regímenes de dosis seguros y basados en la modelización farmacocinética/farmacodinámica dirigida a velar por la eficacia antimicrobiana reduciendo el riesgo de resistencias, teniendo en cuenta que la amikacina es el aminoglucósido que parece ser más seguro dentro de este grupo.

## 5. Bibliografía

- Bird, J. E., Walser, M. M., y Duke, G. E. (1983). Toxicity of gentamicin in red-tailed hawks. *American Journal of Veterinary Research*, 44(7), 1289–1293.
- Boyer, A., Gruson, D., Bouchet, S., Clouzeau, B., Hoang-Nam, B., Vargas, F., Gilles, H., Molimard, M., Rogues, A. M., & Moore, N. (2013). Aminoglycosides in septic shock: An overview, with specific consideration given to their nephrotoxic risk. *Drug Safety*, 36, 217–230. <https://doi.org/10.1007/s40264-013-0031-0>
- Cotanche, D. A., Lee, K. H., Stone, J. S., & Picard, D. A. (1994). Hair cell regeneration in the bird cochlea following noise damage or ototoxic drug damage. *Anatomy and Embryology*, 189(1), 1–18. <https://doi.org/10.1007/BF00193125>
- Marshall, K. L., Craig, L. E., Jones, M. P., & Daniel, G. B. (2003). Quantitative renal scintigraphy in domestic pigeons (*Columbia livia domestica*) exposed to toxic doses of gentamicin. *American Journal of Veterinary Research*, 64(4), 453–462. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2003.64.453>
- Pagkalis, S., Mantadakis, E., Mavros, M. N., Ammari, C., & Falagas, M. E. (2011). Pharmacological considerations for the proper clinical use of aminoglycosides. *Drugs*, 71(17), 2277–2294. <https://doi.org/10.2165/11597020-000000000-00000>
- Robles-Fernández, Á. L., Santiago-Alarcon, D. y Lira-Noriega, A. (2022). Wildlife susceptibility to infectious diseases at global scales. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(35). <https://doi.org/10.1073/PNAS.2122851119>
- Sanchez-Migallon, D., Beaufrère, H., Welle, K.R., Heatley, J., Visser, M., Harms, C.A. (2023). Birds. Antimicrobial Agents Used in Birds. En J.W. Carpenter y C.A. Harms (Eds.), *Carpenter's Exotic Animal Formulary* (6ª edición. pp. 405-423). Elsevier.
- Soh, H. Y., Tan, P. X. Y., Ng, T. T. M., Chng, H. T., & Xie, S. (2022). A Critical Review of the Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Safety Data of Antibiotics in Avian Species. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 11(6). <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS11060741>
- Wang, J., Ma, Z. B., Zeng, Z. L., Yang, X. W., Huang, Y., & Liu, J. H. (2017). The role of wildlife (wild birds) in the global transmission of antimicrobial resistance genes. *Zoological Research*, 38(2), 55–80. <https://doi.org/10.24272/J.ISSN.2095-8137.2017.003>

**77078: Efecto del orujo de uva en piensos de gallinas sobre calidad y conservación del huevo/ Effect of grape pomace in hen feed on egg quality and preservation****Área de conocimiento:** VETERINARIA**Autor(es):** INÉS LÁZARO BLANCO**Tutor(es):** Susana Chamorro Francisco, María Beatriz Herranz Hernández**Universidad:** Universidad Complutense de Madrid**Facultad:** Facultad de Veterinaria**Titulación:** Grado en Veterinaria**Formato:** Comunicación Oral - Investigación básica**Palabras Clave:** Polyphenols, Grape pomace, Egg quality, Haugh units, Egg shelf-live/Polifenoles, Orujo de uva, Calidad de huevo, Unidades Haugh, Conservación

La uva y sus subproductos asociados, poseen gran variedad de polifenoles, siendo una fuente de compuestos bioactivos con capacidad antioxidante.

El objetivo de este estudio es determinar el efecto de la inclusión de orujo de uva al 5% en dietas de gallinas ponedoras, sobre determinados parámetros de calidad interna y externa del huevo, así como, sobre su conservación.

Se formularon 2 piensos de gallinas en harina, isoproteicos, isoenergéticos e isofibrosos, que solo diferían en la adición o no de un 5% de orujo de uva. El experimento duró 6 semanas. En las 3 últimas, se recogieron los huevos y se realizó un análisis de la calidad interna del huevo (Unidades Haugh y color de la yema mediante escala Roche) en huevos frescos (28 huevos/tratamiento), a 15 días (19 huevos/tratamiento), a 21 días (21 huevos/tratamiento) y a 31 días (22 huevos/tratamiento). También, estudiamos la calidad externa, por medio del espesor de cáscara, en 54 huevos/tratamiento; y la fuerza de rotura, en 22 huevos/ tratamiento.

En las unidades Haugh, se observó una reducción con el tiempo y una tendencia a aumentar con la dieta de orujo. Respecto al color, se observó un efecto significativo del tiempo de conservación, de la dieta y de la interacción entre ambos. En este sentido, el efecto de la dieta, se produjo con diferente intensidad en función del tiempo. En la calidad externa, se observó un efecto de la dieta en el espesor de la cáscara, siendo menor en la de orujo. Sin embargo, este efecto no se correlacionó con una menor fuerza de rotura.

La aplicación del orujo de uva mejoró la calidad interna de los huevos frescos, su conservación hasta los 21 días y no tuvo efecto sobre el peso medio de los huevos. Sin embargo, empeoró la calidad de la cáscara.

Grapes and their associated by-products have a wide variety of polyphenols, being a source of bioactive compounds with antioxidant capacity.

The aim of this study is to determine the effect of the inclusion of 5% grape pomace in laying hen diets on certain internal and external egg quality parameters, as well as on egg preservation.

Two isoproteic, isoenergetic and isofibrous hen diets were formulated, which only differed in the addition or not of 5% grape pomace. The experiment lasted 6 weeks. In the last 3 weeks, the eggs were collected and an analysis of the internal egg quality (Haugh Units and yolk colour) was carried out on fresh eggs (28 eggs/treatment), at 15 days (19 eggs/treatment), at 21 days (21 eggs/treatment) and at 31 days (22 eggs/treatment). We also studied external quality by shell thickness in 54 eggs/treatment and breaking strength in 22 eggs/treatment.

In the Haugh units, a reduction was observed over time and a tendency to increase with the pomace diet. Regarding colour, a significant effect of storage time, diet and the interaction between the two was observed. In this sense, the effect of the diet was produced with different intensity depending on the time. In the external quality, an effect of diet on the thickness of the shell was observed, being lower in the pomace shell. However, it is not related to the breaking strength, on which there is no effect.

The application of grape pomace improved the internal quality of fresh eggs, their shelf life up to 21 days and had no effect on the average egg weight. However, it worsened the shell quality.



## Efecto del orujo de uva en piensos de gallinas sobre calidad y conservación del huevo

### Effect of grape pomace in hen feed on egg quality and preservation



**Autora:** **Inés Lázaro Blanco**, [ineslaza@ucm.es](mailto:ineslaza@ucm.es), Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, Nº identificador: 1503364.

**Tutora 1:** **Susana Chamorro Francisco**, [schamorr@ucm.es](mailto:schamorr@ucm.es), Departamento de Fisiología Animal, Facultad de Ciencias Biológicas, UCM.

**Tutora 2:** **María Beatriz Herranz Hernández**, [herranzh@vet.ucm.es](mailto:herranzh@vet.ucm.es), Sección departamental de Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, UCM.

#### Resumen:

La uva y sus subproductos asociados, poseen gran variedad de polifenoles, siendo una fuente de compuestos bioactivos con capacidad antioxidante.

El objetivo de este estudio es determinar el efecto de la inclusión de orujo de uva al 5% en dietas de gallinas ponedoras, sobre determinados parámetros de calidad interna y externa del huevo, así como, sobre su conservación.

Se formularon 2 piensos de gallinas en harina, isoproteicos, isoenergéticos e isofibrosos, que solo diferían en la adición o no de un 5% de orujo de uva. El experimento duró 6 semanas. En las 3 últimas, se recogieron los huevos y se realizó un análisis de la calidad interna del huevo (Unidades Haugh y color de la yema mediante escala Roche) en huevos frescos (28 huevos/tratamiento), a 15 días (19 huevos/tratamiento), a 21 días (21 huevos/tratamiento) y a 31 días (22 huevos/tratamiento). También, estudiamos la calidad externa, por medio del espesor de cáscara, en 54 huevos/tratamiento; y la fuerza de rotura, en 22 huevos/ tratamiento.

En las unidades Haugh, se observó una reducción con el tiempo y una tendencia a aumentar con la dieta de orujo. Respecto al color, se observó un efecto significativo del tiempo de conservación, de la dieta y de la interacción entre ambos. En este sentido, el efecto de la dieta, se produjo con diferente intensidad en función del tiempo. En la calidad externa, se observó un efecto de la dieta en el espesor de la cáscara, siendo menor en la de orujo. Sin embargo, este efecto no se correlacionó con una menor fuerza de rotura.

La aplicación del orujo de uva mejoró la calidad interna de los huevos frescos, su conservación hasta los 21 días y no tuvo efecto sobre el peso medio de los huevos. Sin embargo, empeoró la calidad de la cáscara.

**Palabras clave:** polifenoles, calidad de huevo, orujo de uva, Unidades Haugh, conservación.

#### Abstract:

Grapes and their associated by-products have a wide variety of polyphenols, being a source of bioactive compounds with antioxidant capacity.

The aim of this study is to determine the effect of the inclusion of 5% grape pomace in laying hen diets on certain internal and external egg quality parameters, as well as on egg preservation.

Two isoproteic, isoenergetic and isofibrous hen diets were formulated, which only differed in the addition or not of 5% grape pomace. The experiment lasted 6 weeks. In the last 3 weeks, the eggs were collected and an analysis of the internal egg quality (Haugh Units and yolk colour) was carried out on fresh eggs (28 eggs/treatment), at 15 days (19 eggs/treatment), at 21 days (21 eggs/treatment) and at 31 days (22 eggs/treatment). We also studied external quality by shell thickness in 54 eggs/treatment and breaking strength in 22 eggs/treatment.

In the Haugh units, a reduction was observed over time and a tendency to increase with the pomace diet. Regarding colour, a significant effect of storage time, diet and the interaction between the two was observed. In this sense, the effect of the diet was produced with different intensity depending on the time. In the external quality, an effect of diet on the thickness of the shell was observed, being lower in the pomace shell. However, it is not related to the breaking strength, on which there is no effect.

The application of grape pomace improved the internal quality of fresh eggs, their shelf life up to 21 days and had no effect on the average egg weight. However, it worsened the shell quality.

**Key words:** polyphenols; grape pomace; egg quality; antioxidant activity; laying hens.

## 1. Introducción

La uva y los subproductos asociados a la producción de vino, poseen una gran variedad de polifenoles, siendo una importante fuente de compuestos bioactivos con capacidad antioxidante y esto está generando un importante interés en la nutrición humana y animal. Trabajos previos han puesto de manifiesto que los polifenoles, son capaces de interactuar con los radicales generados durante el metabolismo de la vitamina E, reciclando nuevamente el alfa tocoferol en plasma y en tejidos de las aves. Otros estudios recientes, demuestran que es posible reducir la oxidación e incrementar la fertilidad de huevos mediante la incorporación de polifenoles de uva en la dieta de gallinas (Kara et al 2016, Barbe et al 2020) y recientemente, se han identificado metabolitos de uva en plasma de gallinas. Estos resultados sugieren que determinados polifenoles podrían transferirse también al huevo y ejercer allí su efecto antioxidante (Chamorro S. et al 2021).

Históricamente, los polifenoles han sido considerados factores antinutritivos debido a que la utilización de ingredientes ricos en estos compuestos (como sorgo, faba...) en piensos, se asociaba con efectos negativos en el crecimiento de los animales. Esto puede deberse a que los polifenoles más polimerizados, especialmente los taninos condensados, pueden agregarse y precipitar las proteínas de la dieta y se ha demostrado que dificultan la utilización de estos macronutrientes, mediante la formación de complejos tanino-proteína endógenas (Chamorro S. et al, 2013).

Por otro lado, Chamorro, S. et al. (2017) observaron una reducción significativa de la concentración plasmática de hierro en las aves alimentadas con dietas que incluían  $\alpha$ -tocoferol u orujo de uva, con respecto a las aves control; lo que demuestra que los polifenoles, tienen la capacidad de quelar minerales.

De esta forma, los polifenoles pueden interferir en la absorción de las proteínas, afectando a la calidad interna del huevo; y pueden quelar el calcio, afectando a su calidad externa.

El objetivo de este estudio es determinar el efecto de la inclusión de orujo de uva al 5% en dietas de gallinas ponedoras, sobre determinados parámetros de calidad del huevo, así como, sobre su conservación. Para ello, se analizó la calidad interna del huevo, midiendo parámetros como la altura del albumen y las unidades Haugh, para analizar la calidad proteica de la clara, y el color de la yema, en huevos frescos y, a 15,21 y 30 días de conservación. También se estudió la calidad externa de los huevos, mediante los parámetros de fuerza de rotura (N) y espesor (mm) de la cáscara.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Subproducto de uva

El subproducto de uva (orujo integral) consiste en una mezcla de semilla y hollejo y se obtuvo en fresco inmediatamente tras el descube y separación mecánica de escobajos. Las uvas fueron obtenidas en la Sociedad Cooperativa de bodegas Roquesan (Quemada, Burgos). El orujo se secó en estufa a 50 °C durante 4 días y posteriormente se molió a 1mm en un molino de la marca "Royal Triumph". En las muestras de orujo se determinó la composición nutritiva en % de materia seca (%MS) que fue del 3,5% de humedad; 7,5% de extracto etéreo; 10,4% de proteína; 25,3% de fibra; 5,1 % de ceniza; 65,4% de  $\alpha$ -tocoferol (ppm); y 17,1% de  $\gamma$ -tocopherol (ppm).

### 2.2. Formulación y elaboración de los piensos

Se formularon dos piensos experimentales en harina, cubriendo las necesidades nutricionales de las gallinas según la Normas de FEDNA (2018). Se igualó su contenido en energía, proteína y fibra, y únicamente diferían en la incorporación o no de orujo de uva (5%). Para que ambas dietas fueran isofibrasas, en la dieta control se añadió paja en sustitución del orujo de uva. En ninguno de los piensos se añadieron colorantes ni antioxidantes. Los ingredientes y composición nutritiva de los piensos de gallina se muestran en la **Tabla 1**.

**Tabla 1.** Ingredientes y composición química (%) de los piensos experimentales

%	Control, C	Control + 5% Orujo
Maiz	50.1	46.9
Harina Soja	29.5	29.3
Trigo	0	0
Aceite Girasol	5.4	6.31
Orujo Uva	0	5
Paja	2.5	0
Carbonato Cálcico	9.3	9.3
Fosfato monocálcico	1.2	1.2
DL Metionina	0.22	0.21
L lisina 50	0	0
Celita	1	1
Corrector VM	0.5	0.5
Sal	0.3	0.3
<b>Composición química, % materia seca</b>		
Energía Met, kcal/kg	2738	2732
PB,	16.6	16.9
EE	7.6	8.6
FB	3.5	3.5
Met + Cys dig	0.66	0.65
Lys dig	0.77	0.77
thr dig	0.51	0.51

Trp dig	0.17	0.17
Ca	3.86	3.89
Ptotal	0.61	0.60
Pdisponible	0.37	0.37
Linoleico	3.96	4.49

### 2.3. Animales y manejo

La prueba experimental se realizó en la Granja Docente de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid. Cumpliendo con el Real Decreto 3/2002, de 11 de enero, las jaulas tienen una superficie mínima de 750 cm<sup>2</sup> y se sitúan a un metro del suelo.

Un total de 20 gallinas híbridas blancas comerciales de 28 semanas de edad, alojadas en 5 jaulas (4 gallinas por jaula) con las mismas condiciones ambientales, fueron utilizadas en la prueba experimental. El experimento duró 6 semanas en las cuales, un grupo de gallinas (3 jaulas, 12 gallinas en total) fueron alimentadas con el pienso suplementado con 5% de orujo, mientras que el otro grupo (2 jaulas, 8 gallinas en total) se alimentó con el pienso control (sin orujo). Durante las 3 últimas semanas, se recogieron diariamente los huevos, se contaron, se marcaron, se pesaron, se conservaron en una cámara de refrigeración a 4°C y se estudiaron los parámetros de calidad del huevo, así como, su peso y su conservación.

### 2.4. Parámetros de calidad del huevo

Para estudiar la calidad interna de los huevos, se analizó, en primer lugar, las Unidades Haugh (U.H) que representan una medida precisa y objetiva para determinar la calidad proteínica del albumen del huevo y se considera el sistema más utilizado internacionalmente para la determinación de la frescura del huevo. Para calcularlo, necesitamos un micrómetro con trípode para medir la altura del albumen en milímetros, una balanza para pesar los huevos y una calculadora para realizar esta fórmula:  $UH = 100 \times \log (h - (1,7 \times P^{0,37}) + 7,57)$ , en la que la “h” es la altura del albumen denso y la “P” es el peso del huevo.

Otro parámetro que indica la calidad interna, es el color de la yema que, en este caso, ha sido medido mediante la escala Roche.

Estas dos mediciones se determinaron al mismo tiempo en huevos frescos a 0 días (28 huevos por tratamiento), a 15 días (19 huevos por tratamiento), a 21 días (21 huevos por tratamiento) y a 31 días (22 huevos por tratamiento).

Por otro lado, se estudió la calidad externa de los huevos, analizando el espesor de la cáscara en milímetros, para ello se secaron las cáscaras en una estufa a 80°C durante 2 días y se midió su espesor, siempre en el mismo punto de la pared lateral derecha de los huevos, con un calibre digital. Esta prueba se realizó en una media de 54 huevos por tratamiento. El último parámetro de calidad externa que se midió, fue la Fuerza de Rotura, mediante un texturómetro *TA.HDPlus (Stable Micro Systems Ltd., Godalming, UK)* provisto con el software *TextureAnalyser (versión 6.1.13.0)*. El estudio se realizó en una media de 22 huevos por tratamiento.

### 2.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el modelo glm del programa estadístico SAS, siendo la unidad experimental el huevo. Para el estudio de las Unidades Haugh y del color (escala de Roche), se analizó el efecto de la dieta y del tiempo (efectos principales), así como, su interacción. Para el resto de parámetros (espesor y fuerza de rotura de la cáscara) la dieta fue el efecto principal.

### 3. Resultados

El efecto de la dieta sobre la calidad interna del huevo y su conservación a lo largo del tiempo, se analizó por medio de las Unidades Haugh y el color de la yema por la escala Roche, tal y como se observa en la **Tabla 2**. Se observó una reducción ( $P < .0001$ ) de las Unidades Haugh con el tiempo y una tendencia ( $P = 0.06$ ) a incrementar estas unidades en los huevos de las gallinas que habían consumido orujo de uva, frente a las que habían consumido el pienso control (de 85,9 U.G de media en los controles a 87.8 U. G en los huevos suplementados con orujo). No se observó interacción entre el tiempo y el tratamiento.

Respecto al color de la yema medida por escala Roche, se observó un efecto significativo del tiempo de conservación ( $P_{\text{tiempo}} < .0001$ ), de la dieta ( $P_{\text{dieta}} = 0,0084$ ), así como, de la interacción entre ambos ( $P_{\text{tiempo} \times \text{dieta}} = 0,0044$ ). En este sentido, el efecto del consumo de orujo sobre el color, se produjo con diferente intensidad en función del tiempo.

**Tabla 2:** Efecto de la dieta, de la conservación y de la interacción de ambos en las unidades Haugh, en la altura del albumen y en el color de la yema, medido por la escala Roche.

	Día 0		15 días		21 días		30 días		SEM <sup>1</sup>	Ptiempo	Pdieta	Ptiempo*dieta
	O	C	O	C	O	C	O	C				
altura albumen	10,0	9,43	8,95	8,95	8,27	7,43	5,28	5,32	0,04	<.0001	<b>0,0447</b>	0,1998
peso huevo	63,0	63,3	62,6	63,4	64,2	63,9	64,0	63,3	0,45	0,5822	0,9688	0,8736
Haugh unit	98,4	95,1	93,6	93,3	89,8	85,1	69,3	69,9	0,70	<.0001	<b>0,06</b>	0,2207
color yema(R)	8,6	8,00	10,5	9,56	9,89	9,29	9,65	10,1	0,11	<.0001	<b>0,0084</b>	<b>0,0044</b>

<sup>1</sup>: n, número medio de huevos por tratamiento. Día 0 (28 huevos por tratamiento), Día 15 (19 huevos por tratamiento), día 21 (21 huevos por tratamiento) y día 31 (22 huevos por tratamiento). O: orujo, C: control. R: El color de la yema se midió con la escala Roche.

El efecto de la dieta sobre la calidad externa del huevo se estudió por medio de los parámetros de espesor de cáscara y fuerza de rotura, tal y como se puede ver en las **Tablas 3 y 4**. Se observó un efecto de la dieta en el espesor de la cáscara, siendo significativamente más finas las de los huevos de gallinas suplementadas con orujo de uva (36,1 mm respecto a 42,4 mm de los huevos de la dieta control,  $P < .0001$ ). Sin embargo, esta disminución del grosor de la cáscara, no está relacionada con la fuerza de rotura, en la que no hay diferencias significativas entre ambos tratamientos.

**Tabla 3:** Efecto de la dieta en el espesor de la cáscara de los huevos.

	CONTROL	ORUJO	SEM <sup>1</sup>	Pdieta
Espesor(mm)/Peso(g)	0,67	0,57	0,014	<.0001
Espesor (mm)	42,4	36,1	0,86	<.0001
Peso (g)	63,5	63,2	0,29	0,6807

<sup>1</sup>: n, número medio de huevos por tratamiento: 54 huevos por tratamiento.

**Tabla 4:** Efecto de la dieta en la Fuerza de Rotura de la cáscara.

	CONTROL	ORUJO	SEM <sup>1</sup>	Pdieta
Fuerza (N)	46,4	44,9	1,5	0,5557
Área F-T 1:1	440,7	407,4	15,56	0,2104
Número de picos	92,6	81,9	3,84	0,0644
Peso (g)	64,2	62,6	0,86	0,3355

<sup>1</sup>: n, número medio de huevos por tratamiento: 22 huevos por tratamiento.

#### 4. Discusión.

En este ensayo, la suplementación con orujo de uva no afectó al peso medio de los huevos. Resultados similares fueron reportados por algunos autores en los que se usaron dosis similares de orujo de uva (5% de orujo de uva) como en el trabajo de Tufarelli et al (2022).

Sin embargo, otros autores mostraron efectos tanto positivos como negativos sobre el peso del huevo utilizando dosis similares de orujo de uva. En este sentido, en el trabajo de Romero et al. (2022), la incorporación de un 3 y 6 % de orujo de uva, así como, de un 0.5% de extracto de uva, dieron lugar a una reducción del peso del huevo. Por el contrario, Kaya et al. (2016) reportaron un incremento en el peso del huevo con una suplementación de un 4 % de orujo de uva. Diferencias en el tipo de polifenoles presentes en los distintos orujos, podrían explicar estas discrepancias.

Para estudiar el efecto de la inclusión de orujo de uva, sobre parámetros de calidad interna del huevo, en este trabajo determinamos las Unidades Haugh y el color de la yema de los huevos frescos, así como su estabilidad da lo largo de 15,21 y 30 días. Nuestros resultados mostraron que la incorporación de orujo de uva en las dietas de gallinas, incrementó la altura del albumen y el valor de Unidades Haugh. Las Unidades Haugh es un parámetro que se usa para determinar la calidad interna y vida útil del huevo. En este sentido un valor mayor se asocia con una mayor calidad proteínica del huevo basada en la altura de la clara (albúmina). Resultados similares fueron obtenidos por Romero et al. (2022), quienes observaron un incremento de estas unidades en gallinas alimentadas con distintas fuentes de polifenoles (orujo de uva y extracto). Tal y como esperábamos, en nuestro trabajo encontramos que el tiempo de almacenaje tuvo un efecto negativo sobre las Unidades Haugh. Igualmente, observamos que el efecto negativo del tiempo fue menor en los huevos de las gallinas que habían consumido orujo frente a las que no. Reis et al (2019) concluyeron, de forma similar que las Unidades Haugh en los huevos de gallinas alimentadas con un 2 y un 3% de harina de orujo de uva, respectivamente, fueron inferiores a las del grupo de control en los días 21 y 30 de almacenamiento. Esto sugiere un efecto protector de los polifenoles con capacidad de mejorar la vida útil de los huevos hasta los 21 días.

En cuanto al color de la yema, es un índice que no tiene valor nutricional, pero es muy importante para la aceptación del consumidor y puede verse afectado por la dieta de las gallinas. En nuestro estudio, no obtenemos valores de la escala Roche muy altos, porque no se añadieron colorantes ni antioxidantes. Excepto a los 30 días, observamos que la dieta con orujo, siempre presenta una puntuación mayor que la dieta control, al igual que les sucedió a Romero et al (2022). En cuanto al tiempo de conservación, vemos que este disminuye el color de la yema. Según Omri, B. et al. (2019) el almacenamiento redujo el color de la yema de los huevos correspondientes al tratamiento con 4,5% de semillas de lino. La estabilidad de estos antioxidantes puede verse afectada durante un largo periodo de almacenamiento, estando sometidos a reacciones de degradación (químicas, enzimáticas y físicas) que pueden provocar la pérdida de pigmentos.

Siguiendo esta teoría, esperaríamos que la medición de color de los huevos frescos fuese la más alta, por lo que sospechamos que hubo una percepción de color diferente ese día y eso es lo que ha causado que haya tanta diferencia entre este grupo (día 0) y los demás. Además, la utilización de escala Roche es una medida más subjetiva que está sujeta a limitaciones, como la percepción de la persona o la luz del día.



Por último, la dieta con orujo, está relacionada con una disminución en el espesor de la cáscara, pero no hay efecto en la fuerza de rotura, que se mantiene sin diferencias significativas entre los dos grupos. Este efecto negativo del orujo sobre la calidad externa, no se observó en otros trabajos previos, como el Romero et al (2022). Es importante indicar que el número de huevos en los que se realizó la fuerza de rotura fue bastante inferior que los analizados en el espesor, por lo que sería conveniente aumentar los datos para este estudio en un futuro, y así, confirmar que esa reducción en el espesor de la cáscara no tiene un efecto negativo en la calidad de la misma. Este efecto podría deberse a la capacidad de los polifenoles de quelar los minerales, lo que disminuye la absorción de calcio intestinal.

## 5. Conclusiones

- La aplicación del orujo de uva en el pienso de gallinas ponedoras, mejoró la calidad interna de los huevos frescos presentando mejores valores de Unidades Haugh y color de yema.
- La dieta de orujo de uva, tiende a reducir el efecto negativo del tiempo sobre las Unidades Haugh y del color; aumentando, así, la vida útil de los huevos hasta los 21 días.
- Respecto a la calidad externa, el consumo de orujo de uva se asoció a un menor espesor de la cáscara de los huevos. Sin embargo, no hay efecto en la fuerza de rotura, por lo que, este hallazgo no afecta negativamente a la calidad externa del huevo.
- No hubo efecto en el peso medio de los huevos.

## 6. Bibliografía

- Chamorro, S., Viveros, A., Centeno, C., Romero, C., Arija, I., & Brenes, A. (2013). Effects of dietary grape seed extract on growth performance, amino acid digestibility and plasma lipids and mineral content in broiler chicks. *Animal: an international journal of animal bioscience*, 7(4), 555–561. <https://doi.org/10.1017/S1751731112001851>
- Kara, K., Kocaoğlu Güçlü, B., Baytok, E., & Şentürk, M. (2016). Effects of grape pomace supplementation to laying hen diet on performance, egg quality, egg lipid peroxidation and some biochemical parameters. *Journal of Applied Animal Research*, 44(1), 303-310.
- Omri, B., Alloui, N., Durazzo, A., Lucarini, M., Aiello, A., Romano, R., ... & Abdouli, H. (2019). Egg yolk antioxidants profiles: Effect of diet supplementation with linseeds and tomato-red pepper mixture before and after storage. *Foods*, 8(8), 320.
- Reis, J. H., Gebert, R. R., Barreta, M., Boiago, M. M., Souza, C. F., Baldissera, M. D., ... & Da Silva, A. S. (2019). Addition of grape pomace flour in the diet on laying hens in heat stress: Impacts on health and performance as well as the fatty acid profile and total antioxidant capacity in the egg. *Journal of thermal biology*, 80, 141-149.
- Romero C, Arija I, Viveros A, Chamorro S. Productive Performance, Egg Quality and Yolk Lipid Oxidation in Laying Hens Fed Diets including Grape Pomace or Grape Extract. *Animals* (Basel). 2022 Apr 21;12(9):1076. doi: 10.3390/ani12091076. PMID: 35565504; PMCID: PMC9100342.
- Tufarelli, V., Baghban-Kanani, P., Azimi-Youvalari, S., Hosseintabar-Ghasemabad, B., Slozhenkina, M., Gorlov, I., ... & Laudadio, V. (2022). Effect of dietary flaxseed meal supplemented with dried tomato and grape pomace on performance traits and antioxidant status of laying hens. *Animal Biotechnology*, 33(7), 1525-1532.

**76738: Presencia de comportamientos repetitivos anormales como medida de bienestar en perros de refugio. Presence of abnormal repetitive behaviors as a measure of welfare in shelter dogs.****Área de conocimiento:** VETERINARIA**Autor(es):** Cintia Gabriel Molina, Laura Germán Jiménez**Tutor(es):** Ana D'Ors de Blas, Sebastián Sánchez-Fortún Rodríguez**Universidad:** Universidad Complutense de Madrid**Facultad:** Facultad de Veterinaria**Titulación:** Grado en Veterinaria**Formato:** Comunicación Oral - Investigación clínica**Palabras Clave:** Perros, estrés, cortisol, refugio, estereotipias. Dogs, stress, cortisol, shelter, stereotypic movements.

El bienestar de los perros alojados en refugios es una preocupación creciente por ser entornos con características que propician el estrés, que al generar comportamientos patológicos condiciona la posible adopción de los animales. Durante mucho tiempo se ha considerado la aparición de movimientos repetitivos o estereotipias como signos clínicos propios de dicho estrés, pero su origen multifactorial y diferencias individuales hacen que esta extrapolación no sea tan sencilla. En este trabajo se estudió la frecuencia y el tipo de movimientos repetitivos presentes en una muestra de 19 perros confinados en un Centro de Protección Animal, comparándolas con sus valores de cortisol en suero, sus puntuaciones en un test emocional estandarizado y con sus datos poblacionales (edad, sexo, tiempo en el refugio). Un solo animal obtuvo valores de cortisol compatibles con estrés de los cinco que presentaron movimientos repetitivos. No existieron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de cortisol de machos y hembras, por edades de los animales ni por el tiempo de estancia en el refugio. Los parámetros subjetivos del test WAP fueron variables, encontrándose diferencias significativas en algunos de ellos (ansiedad, inseguridad) y no en otros (alerta). Los resultados apuntan a que no todos los movimientos repetitivos, especialmente si son de tipo inducido, correlacionan con estrés, y que, aunque su presencia puede evidenciar carencias de bienestar animal, funcionan más como mecanismos de regulación o comportamientos aprendidos en función del entorno y sus condiciones individuales.

Welfare in shelter dogs is a growing concern because such environments have characteristics that are favorable to stress. Furthermore, by triggering pathological behaviours it conditions the possible adoption of the animals. The occurrence of repetitive movements or stereotypies has long been considered as clinical signs of such stress, but its multifactorial origin and individual differences make this extrapolation not so simple. In this work the frequency and type of repetitive movements present in a sample of 19 long-staying dogs in an animal shelter were studied by comparing with their serum cortisol values, scores in a standardized emotional test and population data (age, sex, time in the shelter). Only one animal had cortisol values consistent with stress out of the five that showed repetitive movements. There were no statistically significant differences between the cortisol values of males and females, by age of the animals or by the time spent in the shelter. The subjective parameters of the WAP test were variable, finding significant differences in some of them (anxiety, insecurity) and not in others (alertness). The results suggest that not all repetitive movements, especially if they are induced, correlate with stress, and that, although their presence may be evidence of a lack of animal welfare, they function more as regulatory mechanisms or learned behaviours depending on the environment and individual conditions.

## **Presencia de comportamientos repetitivos anormales como medida de bienestar en perros de refugio.**

### ***Presence of abnormal repetitive behaviors as a measure of welfare in shelter dogs***

1504984 Cintia Gabriel Molina ([cintiaga@ucm.es](mailto:cintiaga@ucm.es))

1504989 Laura Germán Jiménez ([lgerma01@ucm.es](mailto:lgerma01@ucm.es))

Tutora 1: Ana D'Ors de Blas ([anadors@ucm.es](mailto:anadors@ucm.es))

Tutor 2: Sebastián Sánchez-Fortún Rodríguez ([fortun@ucm.es](mailto:fortun@ucm.es))

Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid (UCM)

#### **Resumen**

El bienestar de los perros alojados en refugios es una preocupación creciente por ser entornos con características que propician el estrés, que al generar comportamientos patológicos condiciona la posible adopción de los animales. Durante mucho tiempo se ha considerado la aparición de movimientos repetitivos o estereotipias como signos clínicos propios de dicho estrés, pero su origen multifactorial y diferencias individuales hacen que esta extrapolación no sea tan sencilla. En este trabajo se estudió la frecuencia y el tipo de movimientos repetitivos presentes en una muestra de 19 perros confinados en un Centro de Protección Animal, comparándolas con sus valores de cortisol en suero, sus puntuaciones en un test emocional estandarizado y con sus datos poblacionales (edad, sexo, tiempo en el refugio). Un solo animal obtuvo valores de cortisol compatibles con estrés de los cinco que presentaron movimientos repetitivos. No existieron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de cortisol de machos y hembras, por edades de los animales ni por el tiempo de estancia en el refugio. Los parámetros subjetivos del test WAP fueron variables, encontrándose diferencias significativas en algunos de ellos (ansiedad, inseguridad) y no en otros (alerta). Los resultados apuntan a que no todos los movimientos repetitivos, especialmente si son de tipo inducido, correlacionan con estrés, y que, aunque su presencia puede evidenciar carencias de bienestar animal, funcionan más como mecanismos de regulación o comportamientos aprendidos en función del entorno y sus condiciones individuales.

#### **Abstract**

Welfare in shelter dogs is a growing concern because such environments have characteristics that are favorable to stress. Furthermore, by triggering pathological behaviours it conditions the possible adoption of the animals. The occurrence of repetitive movements or stereotypies has long been considered as clinical signs of such stress, but its multifactorial origin and individual differences make this extrapolation not so simple. In this work the frequency and type of repetitive movements present in a sample of 19 long-staying dogs in an animal shelter were studied by comparing with their serum cortisol values, scores in a standardized emotional test and population data (age, sex, time in the shelter). Only one animal had cortisol values consistent with stress out of the five that showed repetitive movements. There were no statistically significant differences between the cortisol values of males and females, by age of the animals or by the time spent in the shelter. The subjective parameters of the WAP test were variable, finding significant differences in some of them (anxiety, insecurity) and not in others (alertness). The results suggest that not all repetitive movements, especially if they are induced, correlate with stress, and that, although their presence may be evidence of a lack of animal welfare, they function more as regulatory mechanisms or learned behaviours depending on the environment and individual conditions.

Palabras clave: *Perros, estrés, cortisol, refugio, estereotipias*

Keywords: *Dogs, stress, cortisol, shelter, stereotypic movements*

## **Introducción**

El estrés es un factor que compromete el bienestar de cualquier animal confinado, pero no existe ningún método simple para evaluarlo, aunque sería muy útil para controlar el bienestar animal y medir la eficacia de intervenciones específicas (Jones y col., 2014).

Los problemas de comportamiento suelen ser elementos indeseables que dificultan la adopción, lo que conlleva un incremento en la duración de estancia en los refugios (Southland y col., 2019). En estancias largas, el impacto del estrés crónico exacerba los comportamientos problemáticos y, por tanto, hace que los animales sean cada vez menos adoptables (Edinboro y col., 2005). Es por ello por lo que los refugios necesitan incrementar sus esfuerzos para identificar, y en su caso reducir, los niveles de estrés de su población canina.

La presencia de personas desconocidas, entorno no habitual, nuevos ruidos y olores, horarios irregulares y una interacción social limitada son factores que inducen estrés en los perros que llegan a un refugio (Newbury y col., 2010). Y aunque las respuestas individuales tienen una gran variabilidad, en general esta situación induce la aparición de problemas fisiológicos y de comportamiento, como pueden ser movimientos repetitivos (MR), lamido del suelo, alteraciones cutáneas, etc. (Kogan y col., 2012).

Se suele definir un MR o estereotipia como un patrón de movimiento sin función ni objetivo que se repite al menos dos veces seguidas. Suelen aparecer en ambientes donde concurren otros indicadores de falta de bienestar animal (Mason, 1991). Sin embargo, es frecuente que los individuos que presenten este tipo de comportamiento no sean los que peor están en términos de bienestar, ya que pueden actuar como mecanismos de adaptación o liberación de estrés (Denham y col. 2014). Hasta el 46% de los perros confinados en cheniles (perros de trabajo, de caza o en refugios) pueden presentar MR (Hiby 2005) pero estos difieren según el momento del día y la presencia/ausencia del observador. Pueden clasificarse en saltos en el aire o contra la pared (los más frecuentes), giros pivotando sobre las extremidades traseras, círculos, circuitos de paseo o combinaciones entre estos (Denham y col. 2014). Mason (1991) hace distinción entre dos tipos de MR: inducidos (MRI) y propiamente estereotípicos (MRE) en función de que se produzcan como respuesta a un estímulo externo (presencia de personas, comida o sonidos asociados a ella, otros animales...) o se produzcan también en ausencia de este.

Numerosos estudios han documentado la existencia de estrés en refugios a través del comportamiento de los perros y sus niveles de cortisol (Beerda y col., 1998; Rooney y col., 2007; Jones y col., 2014) en diferentes muestras biológicas como saliva (Beerda y col., 2000) o plasma (Beerda y col., 1999). En situaciones de estrés, se activa el eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal (HPA), lo que provoca el estado de alerta y la expresión de conductas de estrés, a través de la liberación de hormonas entre las que se encuentra el cortisol, principal glucocorticoide en la especie canina (Glenk y col., 2014).

El objetivo de este estudio es estudiar la presentación de MR en perros de refugio y evaluar su presencia como valor predictivo para el estrés, comparándola con datos de cortisol en suero y marcadores emocionales estandarizados.

## **Material y Métodos**

El estudio ha sido realizado sobre un total de 19 perros alojados en un Centro de Protección Animal de la Comunidad de Madrid y seleccionados de forma aleatoria. Se trató de animales de ambos sexos, de 1 a 10 años y periodos de permanencia en el centro de entre 6 meses y 5 años. Las extracciones de sangre fueron realizadas por personal cualificado siempre a la misma hora, y se procesaron de inmediato para evitar errores en el análisis. Para medir la concentración cuantitativa de cortisol en suero se utilizó un kit comercial de inmunoensayo de fluorescencia (cCortisol, Vcheck, Bionote) según instrucciones del fabricante.

Los datos de los animales se recogieron mediante entrevista con el personal del centro y consulta de su base de datos de trabajo. También se realizaron cuestionarios siguiendo los criterios del protocolo Welfare Assesment Protocol for Shelter Dogs (WAP) (Barnard y col. 2014). Se consideraron estereotípicos (MRE) los MR que se producían también en ausencia de estímulos (interacción visual y auditiva amistosa con personas desconocidas para el animal) e inducidos (MRI) los que se produjeron una o más veces durante 5 minutos de tiempo de interacción.

Finalmente, para procesar los resultados se ha empleado la herramienta Excel del paquete informático Office (Microsoft Co., Redmond, WA, USA) y se ha practicado el análisis estadístico ANOVA de una vía para la obtención del grado de significación estadística, considerando  $p < 0.05$  como significativo mediante la herramienta Graphpad Prism v.8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## **Resultados**

<b>MR</b>	<b>SEXO</b>	<b>EDAD</b>	<b>ESTANCIA</b>	<b>CORTISOL (<math>\mu\text{g}/\text{dl}</math>)</b>
<b>MRE</b>	<b>M</b>	<b>2 años y 10 meses</b>	<b>&gt; 1 año</b>	<b>2.49</b>
<b>MRE</b>	<b>M</b>	<b>3 años y 8 meses</b>	<b>&gt; 1 año</b>	<b>28.05</b>
<b>MRI</b>	<b>H</b>	<b>6 años y 11 meses</b>	<b>&gt; 1 año</b>	<b>2.17</b>
<b>MRI</b>	<b>H</b>	<b>3 años y 1 mes</b>	<b>&gt; 1 año</b>	<b>2.99</b>
<b>MRI</b>	<b>M</b>	<b>1 año y 3 meses</b>	<b>&lt; 1 año</b>	<b>1.90</b>
-	<b>H</b>	<b>6 años y 7 meses</b>	<b>&gt; 1 año</b>	<b>&lt;1</b>
-	<b>M</b>	<b>2 años y 10 meses</b>	<b>&gt; 1 año</b>	<b>3.05</b>
-	<b>M</b>	<b>6 años</b>	<b>&gt; 1 año</b>	<b>1.10</b>
-	<b>H</b>	<b>6 años y 1 mes</b>	<b>&gt; 1 año</b>	<b>2.62</b>
-	<b>H</b>	<b>5 años y 9 meses</b>	<b>&gt; 1 año</b>	<b>2.75</b>
-	<b>H</b>	<b>5 años y 2 meses</b>	<b>&gt; 1 año</b>	<b>3.11</b>
-	<b>M</b>	<b>6 años y 1 mes</b>	<b>&gt; 1 año</b>	<b>1.54</b>
-	<b>M</b>	<b>4 años y 6 meses</b>	<b>&gt; 1 año</b>	<b>1.10</b>
-	<b>H</b>	<b>4 años y 5 meses</b>	<b>&gt; 1 año</b>	<b>&lt;1</b>
-	<b>M</b>	<b>13 años Y 1 mes</b>	<b>&gt; 1 año</b>	<b>3.60</b>
-	<b>M</b>	<b>7 años y 7 meses</b>	<b>&lt; 1 año</b>	<b>2.91</b>
-	<b>H</b>	<b>1 año y 6 meses</b>	<b>&lt; 1 año</b>	<b>6.65</b>
-	<b>H</b>	<b>4 años y 6 meses</b>	<b>&lt; 1 año</b>	<b>3.47</b>

**Tabla 1.** Datos poblacionales y valores de cortisol de los animales en relación a su presentación de movimientos repetitivos.

En la Tabla 1 se muestra la presentación de MR en relación con los valores de cortisol y otras variables poblacionales.

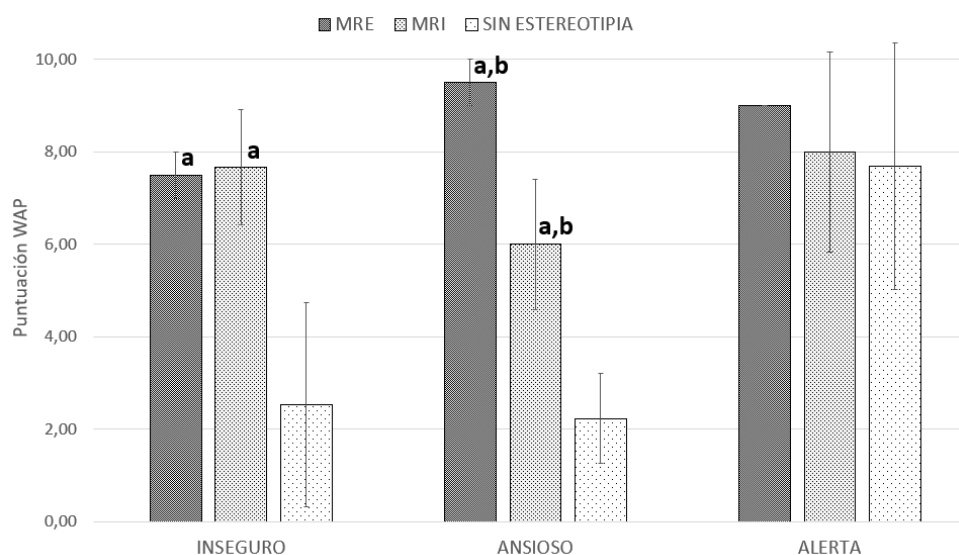
Sólo 1 de los 19 perros (5,26%) presentó valores elevados de cortisol en plasma compatibles con estrés. Otros 16 perros (84,21%) presentaron valores dentro del rango de normalidad de cortisol basal, y por último en 2 animales (10,52%) se obtuvieron valores

anormalmente bajos, candidatos a realizar pruebas adicionales para confirmar o descartar hipoadrenocorticismo, lo que no es parte del objetivo de este trabajo.

Cinco de los perros (26,31%), 2 hembras y 3 machos, presentaban MR de diversa consideración y presentaciones, en 2 de los casos (10,52%) MRE y en los otros 3 (15,79%) MRI. En ambos casos de MRE se trataba de animales jóvenes (2-3 años) que han pasado la mayor parte de su vida en el centro. Uno de ellos presentó valores de cortisol compatibles con estrés.

Si exceptuamos el valor alterado para no sesgar el resto, no existieron diferencias estadísticamente significativas ( $p=3074$ ) entre los valores de cortisol de machos y hembras ( $2.21\pm 0.84$  y  $2.87\pm 1.67$  ng/dL, respectivamente) ni por edades de los animales ( $2.68\pm 1.36$  y  $1.83\pm 1.08$  ng/dL en menores y mayores de 5 años, respectivamente), aunque la diferencia resulta ligeramente significativa ( $p=0.0368$ ) al analizar el tiempo de estancia en el refugio ( $2.19\pm 0.88$  y  $3.73\pm 2.05$  ng/dL para estancias mayores y menores de 1 año, respectivamente).

En cuanto a los parámetros emocionales de estrés WAP (Barnard y col. 2014), se produjeron diferencias estadísticamente significativas entre los animales que no presentaron MR y los que sí en los parámetros de inseguridad y ansiedad, mientras el parámetro de alerta, sin diferencias estadísticamente significativas ( $p=8861$ ), fue superior a 7 en todos los grupos. También hubo diferencias entre MRE y MRI en el parámetro de ansiedad, como se puede apreciar en la Figura 1.



**Figura 1. Valores medios y desviación típica de algunos parámetros del WAP para estrés.**

**a: Diferencias estadísticamente significativas entre animales con y sin MR.**

**b: Diferencias estadísticamente significativas entre MRE y MRI**

## **Discusión**

Se considera que en perros sin patología adrenal los niveles basales de cortisol pueden fluctuar entre  $<1$  y  $18.58$   $\mu\text{g/dL}$  (recomendándose test de estimulación con ACTH para detectar hipoadrenocorticismo en los animales que presentan valores inferiores a  $2$   $\mu\text{g/dL}$ ) (Bovens y col.,2008). No obstante, se ha descrito que los animales crónicamente estresados pueden presentar menor respuesta adrenal ante un estrés agudo (Beerda y col. 1999) por lo que sería interesante profundizar en este aspecto en futuras investigaciones.

Si bien es importante tener en cuenta que los valores de cortisol que corresponden a estrés en perros son menores que los valores basales de otras especies (Hennesy, 2001), los obtenidos en la muestra se corresponden más con valores basales normales de perros que viven en un domicilio (9,6 +/- 1,2 ng/mL) que con los perros que llevan menos de 28 días en un refugio (26,5 +/- 4,7ng/mL) según Bovens y col. (2008) en todos los casos excepto uno. Estos autores también encontraron que se producía un decrecimiento tiempo-dependiente en los niveles de cortisol en sus animales de estudio, lo que coincide con los hallazgos de valores ligeramente mayores en los perros que llevan menos de un año en el refugio. Pero es una tendencia leve, puesto que ya se ha producido una aclimatación que minimiza este estrés por situación nueva.

En el caso del único animal que presentó valores anormales de cortisol, el MR evidenciado era MRE y de tipo salto contra la pared, al igual que el otro animal que también presentaba MRE, este en valores dentro de rango. Es obvio que los datos son insuficientes para establecer conclusiones, pero se ha evidenciado que en los animales con MRE la respuesta frente al estrés puede ser atípica, mientras que en los MRI pueden ser comportamientos aprendidos que se han reforzado externamente de forma involuntaria (Denham y col. 2014)

La variabilidad obtenida en los diferentes parámetros del test emocional, que viene dada por la subjetividad de su metodología (Barnard y col. 2014), hace que, si bien aporta información interesante para la valoración del bienestar, necesita ser valorada en un conjunto de pruebas más amplio, que incluya también medidas objetivas como parámetros sanitarios y variables fisiológicas.

Por tanto, si consideramos los valores de cortisol en suero como una medida fiable del estrés real (Beerda y col., 1998; Rooney y col., 2007) no podemos afirmar que los MR sean un valor predictor del mismo de forma general, y sí más en la línea de lo publicado por Denham y col. (2014) que funcionan como mecanismos de regulación o comportamientos aprendidos en función del entorno y sus condiciones individuales.

### **Conclusiones**

1. Los niveles anormales de cortisol en suero pueden no correlacionar con síntomas comportamentales de tipo MR.
2. A la hora de evaluar MR es importante distinguir entre MRE y MRI, siendo algo más fiables los estereotípicos para predecir estrés.
3. No existen diferencias estadísticamente significativas respecto a los niveles basales de cortisol de machos y hembras, ni entre los animales de distintas edades.
4. Los valores basales de cortisol parecen tender al descenso a medida que aumenta el periodo de estancia.
5. Se observa una tendencia hacia el menor bienestar animal en los casos de animales jóvenes que han pasado la mayor parte de su vida en el refugio.
6. Es necesario siempre un análisis multifactorial con parámetros ambientales, individuales emocionales y sanitarios para evaluar correctamente el bienestar animal.

### **Referencias bibliográficas**

- Barnard S, Pedernera C, Velarde A, Dalla Villa P. (2014) Shelter Quality Welfare Assessment Protocol for Shelter Dogs. Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale". 50 p.

- Beerda B., Schilder, M.B., Van Hooff J.A., De Vries H.W. y Mol, J.A. (1998). Behavioural, saliva cortisol and heart rate responses to different types of stimuli in dogs. *Applied animal behaviour science*, 58(3-4), 365-381. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(97\)00145-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(97)00145-7)
- Beerda B., Scilder M. B., van Hooff J. A., de Vries H.W. y Mol J.A. (1999). Chronic stress in dogs subjected to social and spatial restriction. Hormonal and immunological responses. *Physiology Behaviour*, 66, 243-54. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(98\)00290-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(98)00290-X)
- Beerda B., Schilder M.B., Van Hooff J.A.R.A M., De Vries H.W. y Mol, J.A. (2000). Behavioural and hormonal indicators of enduring environmental stress in dogs. *Animal Welfare*, 9(1), 49-62. <https://doi.org/10.1017/S0962728600022247>
- Bovens C., Tennant K., Reeve J. y Murphy K.F. (2008). Basal serum cortisol concentration as a screening test for hypoadrenocorticism in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22: 1070-1073. <https://doi.org/10.1111/jvim.12415>
- Denham H., Bradshaw J. y Rooney N. (2014), Repetitive Behaviour in kennelled domestic dog: Stereotypical or not? *Physiology and Behaviour*, 128: 288-294  
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.01.007>
- Edinboro C.H., Ward M.P. y Glickman L.T. (2004). A placebo-controlled trial of two intranasal vaccines to prevent tracheobronchitis (kennel cough) in dogs entering a humane shelter. *Preventive veterinary medicine*, 62(2), 89-99.  
<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.03.001>
- Glenk L. M., Kothgassner, O. D., Stetina, B. U., Palme, R., Kepplinger, B., & Baran, H. (2014). Salivary cortisol and behavior in therapy dogs during animal-assisted interventions: A pilot study. *Journal of Veterinary Behavior*, 9(3), 98-106. <https://doi.org/10.1016/j.jveb.2014.02.005>
- Hennessy M.B., Voith V.L., Mazzei S.J., Buttram J., Miller D.D. y Linden F. (2001) Behavior and cortisol levels of dogs in a public animal shelter, and an exploration of the ability of these measures to predict problem behavior after adoption. *Applied Animal Behaviour Science*. Aug 1;73(3):217-233. [10.1016/S0168-1591\(01\)00139-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(01)00139-3).
- Hiby, E. F. (2005). The welfare of kennelled domestic dogs. Universidad de Bristol. Tesis Doctoral.
- Jones S., Dowling-Guyer S., Patronek G.J., Marder A.R., Segurson D'Arpino S. y McCobb E. (2014) Use of accelerometers to measure stress levels in shelter dogs. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 17(1), 18-28. <https://doi.org/10.1080/10888705.2014.856241>
- Kogan L.R., Schoenfeld-Tacher R. y Simon A.A. (2012). Behavioral effects of auditory stimulation on kennelled dogs. *Journal of Veterinary Behavior*, 7(5), 268-275.  
<https://doi.org/10.1016/j.jveb.2011.11.002>
- Mason G.J. (1991). Stereotypies: a critical review. *Animal Behaviour*, 41: 1015-1037  
[https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(05\)80640-2](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(05)80640-2)
- Newbury S., Blinn M.K., Bushb, P.A., Cox C.B., Dinnage J.D., Griffin B., Hurley N., Isaza W., Jones L., Miller J., O'Quin G.J., Patronek M., Smith-Blackmore M. y Spindel, M. (2010). Guidelines for standards of care in animal shelters. *Association of Shelter Veterinarians*, 1-64.
- Rooney N.J., Gaines S.A. y Bradshaw J.W.S. (2007). Behavioural and glucocorticoid responses of dogs. *Physiology and Behaviour* 92, 847-854.  
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.06.011>
- Southland A., Dowling-Guyer S. y McCobb E. (2019). Effect of visitor perspective on adoption decisions at one animal shelter. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 22(1), 1-12.  
<https://doi.org/10.1080/10888705.2018.1448275>



**21-23**  
**abril 2023**

Organiza:

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

Participan:

Facultad de CC. Biológicas

Facultad de Enfermería, Fisioterapia y Podología

Facultad de Farmacia

Facultad de Medicina

Facultad de Óptica y Optometría

Facultad de Psicología

Facultad de Veterinaria