

COMPARACIÓN DEL CONTEO DE PÓLENES DURANTE LOS AÑOS 2019- 2020, ESTACIONES DE BARILOCHE, BUENOS AIRES Y MENDOZA

Comparison of pollen count during the years 2019-2020, in Bariloche, Buenos Aires and Mendoza station

L. Villa¹, L. Barrionuevo², A. Guerci³, L. Farina⁴, C. Ibáñez⁵, M.S. Reyes⁶, M.V. Ocampos⁷, C. Onetti⁸

RESUMEN

Introducción. Los estudios sobre la relación entre la exposición al polen y el desarrollo de síntomas han proporcionado una mejor comprensión de la cantidad de polen que se necesita para causar síntomas.

Objetivo. Comparar el conteo de pólenes durante los años 2019-2020 para evaluar si existió un aumento en la cantidad de estos que explique el aumento de los casos de polinosis, como sugieren diversos estudios epidemiológicos. **Material y métodos.** Estudio longitudinal retrospectivo observacional. Se comparó el conteo de pólenes de las estaciones aerobiológicas de Bariloche, Buenos Aires y Mendoza durante los años 2019-2020.

Resultados. El promedio anual de conteos de pólenes para la Estación de Bariloche es de 57,17 granos/m³ de aire para el año 2019 y 96,3 granos/m³ de aire para el año 2020. Sin diferencia estadísticamente significativa por la amplia variación de los conteos. Para la Estación Buenos Aires el promedio anual se observa un conteo de 10,05 granos/m³ de aire para 2019 y 10,75 granos/m³ de aire para el año 2020. En la Estación Mendoza como resultado se obtuvo que estadísticamente existe diferencia de medias, donde se presenta una media anual de 57,84 granos/m³ conteos de polen el año 2019 y de 10,72 granos/m³ de aire en promedio para el año 2020.

Discusión. La hipótesis del aumento de pólenes no se objetivó, no se tuvieron en cuenta variaciones climáticas que influyen en el conteo (temperatura, humedad, precipitaciones, vientos, etc.). Se necesitan estudios a largo plazo contemplando las variables del clima para correlacionar mejor los datos.

Palabras claves: polen, hierbas, árboles, gramíneas, Buenos Aires, Mendoza, Bariloche.

ABSTRACT

Background: Studies on the relationship between pollen exposure and the development of symptoms have provided a better understanding of the amount of pollen it takes to cause symptoms.

Objective: to compare the pollen count during the years 2019-2020 to assess whether there was an increase in the amount of pollen that explains the increase in pollinosis cases as suggested by various epidemiological studies. **Methods:** Retrospective observational longitudinal study. The pollen count of the aerobiological stations of Bariloche, Buenos Aires and Mendoza during the years 2019-2020 was compared.

Results: The annual average of pollen counts for Bariloche Station was 57.17 grains / m³ of air for the year 2019 and 96.3 grains / m³ of air for the year 2020. There was no statistically significant difference due to wide variation in counts. For the Buenos Aires Station, the annual average, of count was 10.05 grains / m³ of air for 2019 and 10.75 grains / m³ of air for the year 2020. In Mendoza Station, it was obtained that statistically there is a difference in means, where an annual average of 57.84 grains / m³ pollen counts is presented in 2019 and 10.72 grains / m³ of air on average for the year 2020.

Discussion: the hypothesis of the increase in pollens was not objectified; climatic variations that influence the count (temperature, humidity, rainfall, winds, etc.) were not taken into account. Long-term studies looking at climate variables are needed to better correlate the data.

Keywords: pollen, weeds, trees, grass, Buenos Aires, Mendoza, Bariloche.

1. Directora de la Red de Pólenes de la AAAelC, Especialista en Alergia e Inmunología, Miembro de la Junta Ejecutiva de la AA-AelC, Sanatorio Privado San Roque. Marcos Juárez, Córdoba.

2. Lic. en Ciencias Biológicas. Estación Bariloche.

3. Dra. en Geografía. Estación Mendoza.

4. Encargada del Departamento de Botánica. Museo Municipal de Historia Natural de San Rafael. Estación Mendoza.

5. Lic. en Ciencias Biológicas. Laboratorio de Sistemática y Biología Reproductiva de Plantas Vasculares, DBBE, FCEyN, UBA. Estación Buenos Aires.

6. Secretaria de la Red de Pólenes de la AAAelC, encargada de la Estación Bariloche, Especialista en Clínica Médica. Especialista en Alergia e Inmunología. Presidente de la SAAIS.

7. Coordinadora de la Red de Pólenes de la AAAelC, encargada de la Estación de Catamarca, Especialista en Alergia, Miembro de la Junta Ejecutiva de la AAAelC.

8. Coordinadora de la Red de Pólenes de la AAAelC, Especialista en Alergia e Inmunología, Secretaria General de la AAAelC.

Correspondencia: Leonor Villa. Tel.: 03472-15621735. villaleonor2005@yahoo.com.ar

Los autores declaran no poseer conflictos de intereses.

Recibido: XXX | Aceptado: XXX

Archivos de Alergia e Inmunología Clínica 2021;52(1):19-24

INTRODUCCIÓN

La aerobiología es la ciencia que estudia las partículas atmosféricas de origen biológico, su dispersión y su impacto sobre el medio ambiente y los organismos; dentro de ella, la aeropalinología es la disciplina que estudia la presencia del polen y esporas en el aire. La polinosis es una de las causas de la inflamación de la mucosa nasal, conjuntival y/o bronquial causada por alérgenos contenidos en los granos de polen a través de un mecanismo inmunológico mediado por IgE¹. La polinosis está teniendo un crecimiento exponencial atribuible principalmente a la contaminación ambiental y ambas van tomando importancia año a año por su impacto en la salud. La influencia de la contaminación ambiental en la producción de polen se debe a que provoca mayor crecimiento de las plantas, mayor cantidad de granos de polen en cada planta, mayor cantidad de proteínas antigénicas en cada grano de polen y temporada de polinización más temprana y duradera¹⁻⁶.

Además, nuevos estudios han observado que los pólenes que producen alergia tienen impacto en la salud no solo de pacientes alérgicos, sino en sujetos normales. La inflamación generada por ellos aumenta la sensibilización a otros alérgenos, así como a las infecciones virales⁵⁻⁷.

Los estudios sobre la relación entre la exposición al polen y el desarrollo de síntomas han proporcionado una mejor comprensión de la cantidad de polen que se necesita para causar síntomas⁸.

El primer estudio aerobiológico fue realizado por el médico pionero inglés Charles Blackley (1820-1900), en 1873. Él estudió los pólenes en la atmósfera. Así elaboró el primer calendario polínico y pudo demostrar científicamente que el polen era la causa de la rinitis estacional. Para ello desarrolló métodos gravitatorios para captación, realizó la primera prueba cutánea y estudió la relación entre las concentraciones de polen y los síntomas^{9,10}.

Desde Blackley a la fecha aparecieron numerosas estaciones que posteriormente se nuclearon en redes, siendo las primeras la de SEAI y posteriormente la NAB.

En Argentina en el año 1997 la Asociación Argentina de Alergia e Inmunología Clínica (AAAeIC) crea un grupo de tarea con el fin de estudiar la aeropalinología y armar un mapa polínico de nuestro país².

Las estaciones aerobiológicas de la Red de Pólenes de la AAAeIC que funcionaron durante el período 2020 de la pandemia por SARS-CoV-2 fueron la estación de Bariloche (41°9' S; 71°18' W), ubicada dentro de la provincia fitogeográfica de Estepas Patagónicas; la estación de Buenos Aires (34°35' S; 50°29' W) en la provincia fitogeográfica Pampeana y la estación de Mendoza (32°53' S; 68°50' W), en la provincia fitogeográfica del Monte.

OBJETIVO

Comparar el conteo de pólenes durante los años 2019-2020 para evaluar si existió un aumento en la cantidad de los mismos que explique el aumento de los casos de polinosis como sugieren diversos estudios epidemiológicos⁵⁻¹¹.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio longitudinal retrospectivo observacional.

Se comparó el conteo de pólenes durante el año 2019-2020 de las estaciones aerobiológicas de Bariloche con sus respectivos captadores (Rotorod: captador de impacto por rotación), Buenos Aires y Mendoza (Lanzoni: captador por aspiración).

Todo el contenido biológico y no biológico del aire queda retenido en una cinta impregnada con aceite de sili-

cona que luego se lee al microscopio óptico y permite su identificación.

Para el caso de la estación Bariloche se utilizaron varillas acrílicas siliconadas que luego fueron teñidas con colorante Rojo Carberla y analizadas bajo microscopio óptico.

Se obtiene una lectura correspondiente a 3,12 m³ de aire muestreado.

Para que los datos obtenidos mediante los diferentes muestreadores puedan ser comparables, deben ser expresados como granos de polen/m³ de aire por día.

En el caso de los muestreadores por impacto se debe aplicar la siguiente fórmula:

$$\text{granos de polen/m}^3 = N/3,12 \text{ m}^3$$

donde:

N: número de granos de un tipo polínico contado.

Volumen de aire muestreado: 3,12 m³.

En el caso de Buenos Aires y Mendoza, los resultados que se obtienen de un captador Hirst (datos brutos) son convertidos a concentraciones medias diarias de pólenes (pólenes/m³) mediante las siguientes fórmulas:

Concentración polínica media diaria:

$$N \times (Am/Aa) / 14,4 \text{ m}^3$$

donde:

N: número de granos de polen contados en área analizada.

Aa: área analizada.

$$\begin{aligned} \text{Área analizada} &= 4 (1 \text{ w}) = 4 (48 \text{ w}) = 192 \text{ w} = 0,000192 \\ &= \text{w m} = 0.000192 \text{ w m}^2 \end{aligned}$$

Am: área muestra

$$\begin{aligned} \text{Área muestra} &= 1 \text{ L} = 48 \text{ mm} \times 14 \text{ mm} = 672 \text{ mm}^2 = \\ &= 0,000672 \text{ m} = 0,000672 \text{ m}^2 \end{aligned}$$

V: volumen de aire analizado por día = 14,4 m³

Concentración media diaria de polen:

$$\text{granos de polen/m}^3 = N \times 0,7$$

Por tanto, los datos finales de las estaciones se expresan en granos de polen por m³ de aire muestreado para poder realizar comparaciones, aunque la metodología de muestreo y procesamiento del material sea diferente.

Las palinólogas encargadas de cada estación realizaron la identificación y el conteo de cada polen.

En una primera instancia se realizaron las gráficas de las series temporales por localidad, contemplando los períodos en los que existían mediciones y aquellas que las muestras no se realizaron o estaban contaminadas.

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS.

En una primera instancia se evaluaron los estadísticos descriptivos y, luego, se realizaron pruebas de hipótesis para muestras independientes con el fin de comparar medias de conteos de polen entre los años 2019 y 2020, por localidad.

TABLA 1. Total de Pólenes en la Estación Bariloche por metro cúbico de aire.

	Año	N	Media	DE
Polen total	2019	292	57,1678	252,20428
	2020	280	96,2964	421,30347

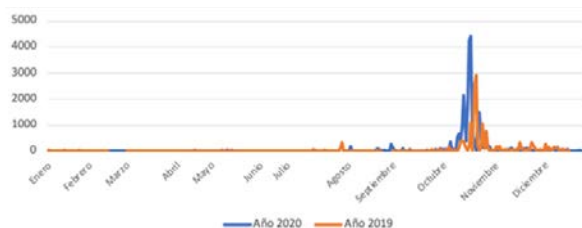


Figura 1. Cuento de polen total anual por metro cúbico de aire estación Bariloche.

RESULTADOS

El promedio anual de los conteos de pólenes para la localidad de Bariloche es de 57,17 granos/m³ de aire para el año 2019 y 96,3 granos/m³ de aire para el año 2020.

Para analizar si esas medias pueden afirmarse que son estadísticamente diferentes, se aplicó una prueba de comparación de medias para muestras independientes. Como resultado se obtuvo que estadísticamente no se puede inferir que el promedio del año 2020 sea mayor. Esto se explica por los altos valores de la desviación estándar (Tabla 1), que indican que la serie de datos de conteos no es estable. La misma sufre variaciones abruptas, presentando valores extremos, donde días de octubre se registran muestras de más de 4000 conteos para árboles. Esta alta variabilidad explica que estadísticamente no se pueda concluir un diferencial de medias interanual.

Asimismo, se intuye que existen otras variables como el clima que son explicativas de la serie, lo cual no es analizado en el presente estudio.

En las Figuras 1 y 2 se visualizan el conteo anual total y por especie de pólenes, respectivamente, de la estación Bariloche.

En la Figura 1 observamos el conteo total de pólenes por metro cúbico de aire de la estación de Bariloche.

La Figura 2 muestra el conteo de pólenes por tipos polínicos por metro cúbico de aire por especie de la estación de Bariloche.

En la Figura 3 se observa el conteo total de pólenes para la estación Buenos Aires correspondiente a los períodos anuales 2019 y 2020. Se obtuvo una muestra anual completa del año 2019 mientras que para el año 2020 se comenzó con el muestreo a partir del mes de mayo. El incremento en los conteos globales de polen en ambos años comenzó a partir de los meses de julio y agosto y el máximo se registró en los meses de noviembre y diciembre.

Posteriormente se graficó el conteo de polen anual por

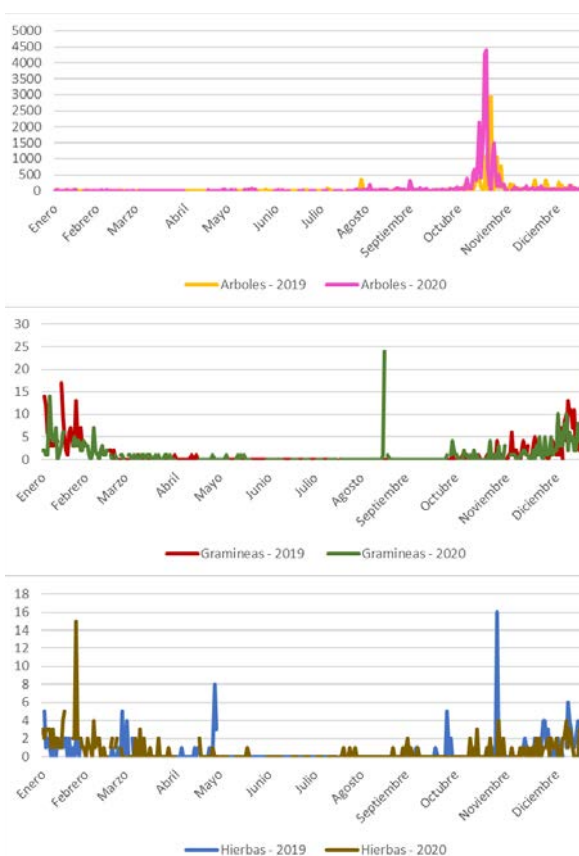


Figura 2. Cuento de pólenes según categorías para la estación Bariloche.

metro cúbico de aire según el tipo de categoría polínica para los años 2019-2020 (Figura 4). El mismo contempla los baches temporales en los que no se realizaron mediciones e incluso en aquellas que, se identificaron muestras contaminadas. En esta localidad se observa una menor variabilidad de los datos, dado que el rango oscila entre 0 y 40 conteos diarios. Sin embargo, es posible distinguir que, para ambos años, predomina el polen arbóreo durante el período julio-septiembre respecto del polen herbáceo y el de las gramíneas. A partir de septiembre, se observó un incremento relativamente sostenido del polen herbáceo en ambos períodos, cuyos valores se asemejan al polen arbóreo aunque este último con una mayor fluctuación interanual. Por otra parte, el conteo de polen correspondiente a las gramíneas fue mayor en el período agosto-diciembre del año 2019 respecto del mismo período para el año 2020.

Se analizó la variabilidad de los datos con el fin de comparar las muestras de ambos años y se realizó una prueba de diferencia de medias; para ello se decidió eliminar los meses de enero a abril del 2019 dado que no se contaba con los datos del año 2020 para los mismos meses, lo que imposibilitaba llevar a cabo dichas comparaciones (Tabla 2). En promedio se observó un conteo diario de $10,05 \pm 8,51$

TABLA 2. Polen total de mayo a diciembre por metro cúbico de aire de la estación Buenos Aires.

	Año	N	Media	DE
Buenos Aires (mayo-diciembre)	2019	221	10,0543	8,50918
	2020	244	10,7459	7,21574

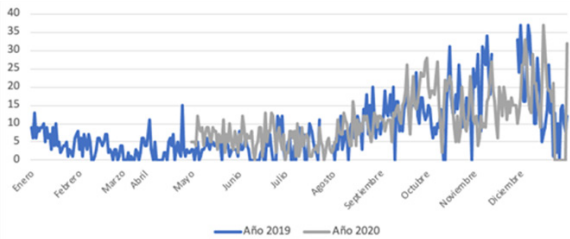


Figura 3. Conteo de polen total anual por metro cúbico de aire en la estación Buenos Aires para los años 2019 y 2020.

granos/m³ de aire para 2019 y 10,75±7,21 granos/m³ de aire para el año 2020. La prueba de significancia indica que estadísticamente no hay evidencia significativa para concluir que, en promedio, la cantidad de conteos diarios sea mayor para el año 2020.

En cuanto a la estación Mendoza, en la **Figura 5** se observa la comparación del total de los pólenes.

En la **Figura 6** vemos cada categoría por separado de la estación Mendoza.

En la **Tabla 3** vemos el promedio anual de los pólenes por metro cúbico de aire en la estación Mendoza.

Para analizar si puede afirmarse que esas medias son estadísticamente diferentes, se aplicó una prueba de comparación de medias para muestras independientes. Como resultado se obtuvo que estadísticamente existe diferencia de medias, donde se presenta una media de 57,84 granos/m³ de aire de polen en Mendoza para el año 2019 y de 10,72 granos/m³ de aire en promedio para el año 2020. En este caso la prueba de hipótesis indica que hay diferencias de media y que existieron mayores conteos en el año 2019. Considerando que el año 2020 presenta un registro intermitente con varios meses incompletos.

DISCUSIÓN

Si bien debido a la pandemia 2020 perdimos muchos datos al no poder circular y recolectar las muestras, el número más alto lo obtuvimos en Bariloche con una muestra de 280 de 365 días.

Puede que la falta de datos no nos permita realizar una comparación tan exacta, pero al comparar los datos positivos, la hipótesis del objetivo principal del estudio que pudo haber un aumento de pólenes no se pudo objetivar. El promedio de polen anual por metro cúbico de aire fue similar en ambos períodos anuales estudiados para la estación ubicada en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires

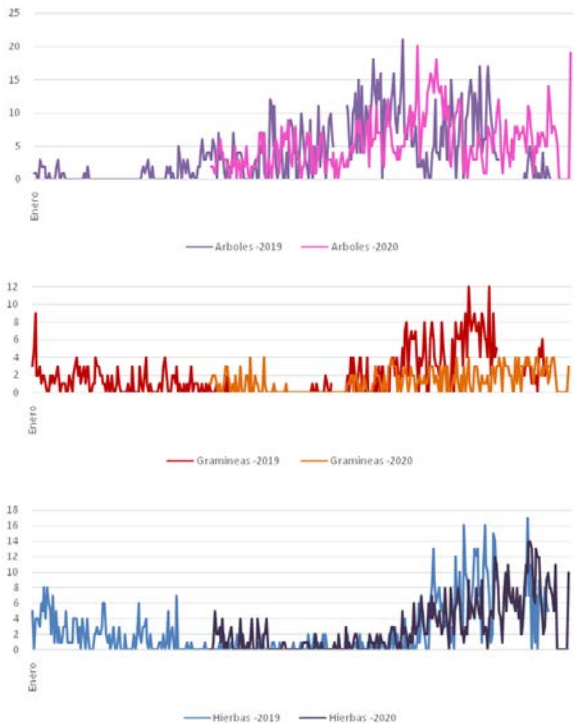


Figura 4. Conteo total anual de polen por metro cúbico de aire según categorías polínicas generalizadas en especies arbóreas, especies herbáceas y gramíneas para la estación Buenos Aires.

y, a su vez, estos valores son comparativamente menores respecto de las otras estaciones de muestreo. No obstante, es necesario considerar que dicha localidad se caracteriza por presentar un clima templado y húmedo, con valores de humedad relativa muy altos que contribuyen a la hidratación temprana de los granos de polen disminuyendo su permanencia en el aerosol atmosférico. Por otra parte, estas muestras suelen presentar abundantes partículas de distinto tamaño y forma, mayormente de origen antrópico y otras de origen biológico. Dependiendo de las características de estas partículas, pueden adherirse con mayor facilidad a los granos de polen provocando la liberación de alérgenos, en cuyo caso contar con un número menor de granos de polen en la atmósfera no implica una disminución en la polinosis¹⁵.

El incremento de especies herbáceas cultivadas y ornamentales utilizadas en los últimos años, principalmente en la vía pública de la Ciudad de Buenos Aires se ve reflejado en las muestras y en los conteos. Además, en el laboratorio se realizaron análisis histoquímicos en granos de polen de especies con polinización principalmente zoófila presentes en las muestras y arrojaron resultados preliminares que indican cualitativamente una menor cantidad de lípidos y proteínas como reservas principales y, en consecuencia, podría contribuir a un comportamiento similar al polen anemófilo. No obstante, esto debería ser corroborado mediante MET.

TABLA 3. Promedio anual de pólenes por metro cúbico de aire en la Estación Mendoza.

	Año	N	Media	DE
Polen total - Mendoza	2019	322	57,8447	122,8852
	2020	250	10,7200	17,28527

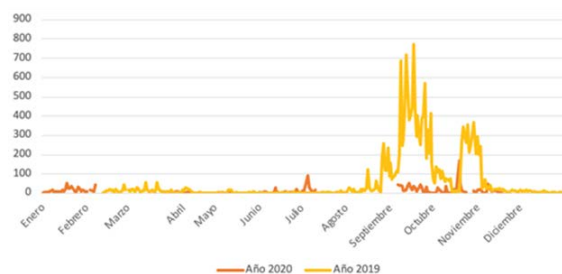


Figura 5. Cuento total anual de pólenes por metro cúbico de aire, estación Mendoza.

En el caso de la estación Mendoza, durante el año 2020 desde septiembre a octubre inclusive no se contabilizaron datos por el impedimento del acceso a la Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria (UNCuyo), lugar donde se encuentra el captador de pólenes, debido a la pandemia del SARS-CoV-2, por lo que el resultado final del análisis podría haber sido otro, considerando que en esos meses se registra la mayor cantidad de polen de árboles. Para el año 2020 el registro para malezas tiende a aumentar significativamente comparado con el año 2019 para los meses noviembre y diciembre. Para el caso de las gramíneas vemos un aumento en las estaciones de otoño e invierno, observando un incremento en los meses de marzo y mayo.

Para el caso de la estación Bariloche, se observa que se mantienen las curvas comparando los dos años calendarios, observando un aumento en las tres categorías. Para el caso particular de las hierbas se observa una presencia mayor durante el año 2020, lo que no implica que las concentraciones polínicas en el aire sean elevadas. Según la escala de la NAB, los valores moderados de lluvia polínica para las hierbas son de 10 a 49 granos de polen/m³.

Las curvas correspondientes a gramíneas para los años 2019 y 2020 muestran niveles moderados (5 a 19 granos/m³) y altos (20 a 199 granos/m³) de polen durante los meses de octubre a febrero.

Para el caso de los árboles, se observa su presencia a lo largo de los dos años calendarios relevados, con un aumento muy elevado (1500 granos de polen/m³) durante los meses de octubre y noviembre.

La disminución de la contaminación¹³ durante la pandemia tampoco fue una variable estudiada en el presente estudio. La menor contaminación ambiental durante la cuarentena podría haber influido en que no se haya encontrado un aumento de la carga polínica, pero se necesitan estudios comparativos a largo plazo para objetivar un aumento de pólenes.

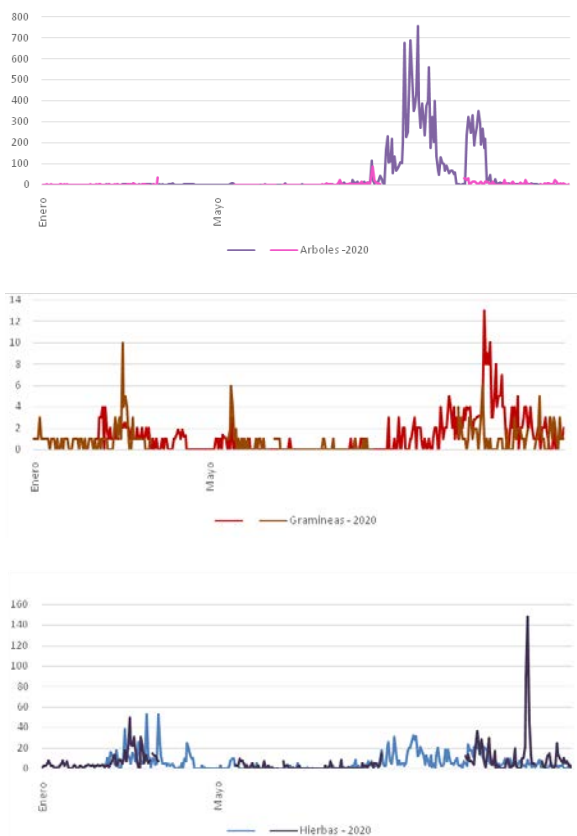


Figura 6. Cuento total anual de polen por metro cúbico en el aire según las categorías para la estación Mendoza.

Tampoco se analizaron las variaciones climáticas en cuanto a lluvias, vientos y temperaturas que son esenciales para la fenología de las plantas¹⁴. La influencia de factores meteorológicos afectan la producción y dispersión polínica. Las variaciones climáticas estacionales e interanuales así como la contaminación ambiental o aspectos relacionados al cambio climático pueden modificar la cantidad de polen, el tiempo de permanencia de este en el aire, generar mayor cantidad de proteínas antigénicas y alterar los ciclos fenológicos florales, induciendo una temporada de polinización más temprana y duradera¹⁶. Las condiciones climáticas determinan el momento e intensidad de la floración, y por lo tanto la concentración de polen en el aire; las condiciones meteorológicas pueden modificar momentáneamente la cantidad de polen emitido, aunque no alteran el patrón general¹⁷ (Latorre, 1999).

El espectro polínico puede ser visto como un conjunto donde interactúan distintos factores de naturaleza tanto biológica como física. Algunos de ellos son: la vegetación emisora (composición, distribución, abundancia), los factores climáticos estacionales que determinan la intensidad y duración de la floración, los factores meteorológicos

que influyen en la dispersión modificando la representatividad polínica, así como las características propias del ta $\acute{x}$ on¹⁷ (Latorre, 1999).

Se necesitan m $\acute{a}$ s estudios comparables³, a largo plazo, teniendo en cuenta los cambios clim $\acute{a}$ ticos (temperatura, precipitaciones, vientos)⁵⁻¹².

AGRADECIMIENTOS

A la Lic. Laura Bevilacqua por el an $\acute{a}$ lisis estad $\acute{i}$ stico.
Al Laboratorio Sanofi por el apoyo recibido para realizar el muestreo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pollen Allergy in a Changing World: A Guide to Scientific Understanding and Clinical Practice; 1st ed. 2018.
2. Ram $\acute{o}$ n G. Atlas Alergopatol $\acute{o}$ gico de la Rep $\acute{u}$ blica Argentina. AAAeIC. Primera edici $\acute{o}$ n 2019.
3. D'Amato et al. The effects of climate change on respiratory allergy and asthma induced by pollen and mold allergens. *Allergy* 2020;00:1-10
4. Farnaz Sedghy, et al. Interaction Between Air Pollutants and Pollen Grains: The Role on the Rising Trend in Allergy.
5. Antonio Luis Valero Santiago, $\acute{A}$ lvaro Cadah $\acute{i}$ a Garc $\acute{i}$ a. Polinosis. Polen y Alergia 2002-2005
6. D'Amato et al. Effects on asthma and respiratory allergy of Climate change and air pollution. *Multidiscip Respir Med* 2015 Dec 22;10:39.
7. Athanasios Damialis et al, Higher airborne pollen concentrations correlated with increased SARS-CoV-2 infection rates, as evidenced from 31 countries across the globe *Proc Natl Acad Sci USA* 2021 Mar 23;118(12):e2019034118.
8. Carmi Geller-Bernstein The Clinical Utility of Pollen Counts *Clin. Rev Allergy Immunol* 2019 Dec;57(3):340-9.
9. Geoffrey A. Stewart y Clive Robinson. Al $\acute{e}$ rgenos y contaminantes de interior y de exterior. Middleton. *Alergología esencial de Robyn E. O'Hehir, Stephen T. Holgate y Aziz Sheikh* 2017 Elsevier Espa $\acute{n}$ a.
10. Subiza Garrido FJ y Lestache. Recuento de p $\acute{o}$ lenes. *Tratado de Alergología Pel $\acute{a}$ ez-Hern $\acute{a}$ ndez* 2007.
11. Sara Maio et al, Environmental risk factors: indoor and outdoor pollution Section 3.3 pag 91-98. WAO White Book on Allergy 2013.
12. Ramon et al. Year-long trends of airborne pollen in Argentina: More research is needed. *World Allergy Organization Journal* 2020;13:100135.
13. Barnes CS. Impact of Climate Change on Pollen and Respiratory Disease. *Current Allergy and Asthma Reports*, 18(11).
14. Daniela S. Nitiu, et al. Atlas de p $\acute{o}$ lenes al $\acute{e}$ rgenicos de Buenos Aires Argentina: *Archivos de Alergia e Inmunología Clínica* 2019;50(2):67-88.
15. Ortega Rosas CI, Meza Figueroa D, Vidal Solano JR, Gonz $\acute{a}$ lez Grijalva B, Schiavo B. Association of airborne particulate matter with pollen, fungal spores, and allergic symptoms in an arid urbanized area. *Environmental Geochemistry and Health* 2020;1;22.
16. Cari $\acute{n}$ anos P et al. Aerobiology as a tool to help in episodes of occupational allergy in work places. *J Invest Alergol Clin Immunol* 14(4),300-308.
17. Latorre F. El polen atmosf $\acute{e}$ rico como indicador de la vegetaci $\acute{o}$ n y de su fenolog $\acute{i}$ a floral. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1999.