

Resúmenes Tesis: Doctor en Ciencias Biológicas

Expresión de receptores de hormonas esteroides: subtipos e isoformas, en la Enfermedad Quística Ovárica Bovina

Natalia Soledad Alfaro

natoalfaro@hotmail.com

Director: Hugo H. Ortega.

Lugar de realización: Laboratorio, Cátedra y/o Departamento: Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada. Facultad: Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad: Universidad Nacional del Litoral. Fecha de la defensa: 10 de octubre de 2012.

Resumen

La etiopatogenia de la enfermedad quística ovárica (COD del inglés: Cystic Ovarian Disease) en el ganado bovino lechero es un proceso complejo que involucra disfunción en la foliculogénesis y en la ovulación, y en el que intervienen muchos factores tales como el estrés, manejo e infecciones. Aunque se sabe que el desarrollo de esta enfermedad está principalmente asociado con una disfunción neuroendócrina a nivel del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal, en la persistencia folicular también intervienen factores intraováricos. El objetivo de la presente tesis fue examinar la localización y expresión de receptores de las hormonas gonadotróficas, de los receptores de hormonas esteroides y de las proteínas correguladoras en las estructuras foliculares del ovario de vacas con COD en comparación con las estructuras de los ovarios de las vacas controles. Se utilizaron muestras de ovarios de distintas procedencias: muestras obtenidas en la playa de faena de los

frigoríficos de la zona, animales en producción con desarrollo espontáneo de la enfermedad y animales sometidos a un modelo experimental de inducción de COD por medio de la administración de ACTH sintética. Las muestras obtenidas fueron procesadas de acuerdo a las distintas técnicas y a los fines de ser utilizadas para la evaluación de la expresión proteica del receptor de andrógeno (RA) y de las proteínas correguladoras: SRC-3 (del inglés: Steroid Receptor Coactivator-3), REA (del inglés: repressor of estrogen receptor activity) y SMRT (del inglés: Silencing Mediator of Retinoic acid and Thyroid hormone receptors) mediante inmunohistoquímica; y para la evaluación de la expresión del ARNm de los receptores de hormonas gonadotróficas: RLH y RFSH; de los receptores de hormonas esteroides: estrógenos α (RE α), estrógenos β (RE β), progesterona (RP) y RA; y de las proteínas correguladoras: SRC-1, SRC-2, SRC-3 y LCoR (del inglés: ligand-dependent nuclear-receptor corepressor) mediante RT-PCR de punto final. Los hallazgos en este trabajo proporcionan evidencia de que los ovarios de los animales con COD inducida y espontánea mostraron una expresión alterada de los receptores de gonadotropinas y de los receptores de esteroides en comparación con los animales controles, así como cambios en la expresión de las proteínas correguladoras. Los resultados presentados en esta tesis

nos permiten llegar a las siguientes conclusiones: 1) los folículos quísticos espontáneos presentaron una baja expresión de los receptores de las hormonas gonadotróficas en las células de la granulosa, similar observación se halló en la expresión del ARNm de los RLH en las células de la teca; 2) la inmunomarcación del RA mostró variaciones durante el desarrollo folicular normal, hallándose patrones diferentes entre los folículos ováricos de animales con enfermedad quística ovárica en relación a los controles. En cuanto a su ARNm, los folículos quísticos espontáneos evidenciaron un aumento significativo en las células de la granulosa; 3) los quistes foliculares provenientes de frigorífico folículos quísticos mostraron una mayor expresión del ARNm del RE α y una menor expresión del RE β en las células de la granulosa y de la teca; 4) en los animales con COD espontánea se observó un aumento significativo en la expresión de los transcritos que abarca las tres isoformas del RP en las células de la teca y de la isoforma B del en las células de la granulosa; 5) sabiendo que el ciclo estral normal es un proceso estrictamente regulado por el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal y que las hormonas esteroides y gonadotróficas son esenciales para la función ovárica de diversas especies, regulando el desarrollo, la diferenciación celular y la esteroidogénesis cualquier cambio y/o alteración en los mecanismos de transcripción y/o regulación de los receptores de hormonas esteroides y gonadotróficas podrían ser cruciales en la patogenia de esta enfermedad; 6) la expresión proteica y del ARNm de las proteínas correguladoras fue observada en las células de la granulosa y de la teca de todas las categorías foliculares. La inmunomarcación de REA, SMRT y SRC-3 muestra-

ron diferencias entre animales controles y animales con COD espontánea e inducida. Un patrón diferencial del ARNm de SRC-1, SRC-2 y SRC-3 fue demostrado en los folículos quísticos espontáneos comparados con los folículos antrales normales. No se evidenciaron diferencias significativas en la expresión del ARNm de LCoR entre grupos controles y con COD espontánea; 7) las diferencias halladas en la expresión de las proteínas correguladoras entre las estructuras foliculares normales y quísticas, considerando que regulan la actividad transcripcional de los receptores esteroides, podrían provocar importantes alteraciones en la dinámica folicular. En este sentido, podrían intervenir en el desbalance proliferación/apoptosis, así como en otras alteraciones observadas en los ovarios de los animales con la enfermedad.

Summary

Expression of Steroid Hormones Receptors: Subtypes and isoforms in Bovine Cystic Ovarian Disease

The etiopathogenia of cystic ovarian disease (COD) in dairy cattle is a complex process that involves dysfunctions in folliculogenesis and ovulation, and many factors such as stress, management and infectious. The aim of the present study was to examine the localization and expression of steroid hormone receptors, gonadotrophic hormone receptor, and transcription factors that module steroid hormone receptor in ovarian follicular structures from cows with COD compared with ovarian structures from control group. Samples of cows were used and assigned to following groups: samples from slaughterhouses; samples from cattle with spontaneous COD; and animals sub-

jected to an experimental model of induction of COD by synthetic ACTH administration. The samples were processed to evaluate the protein expression of androgen receptor (AR) and coregulatory proteins: Steroid Receptor Coactivator-3 (SRC-3), Repressor of Estrogen receptor Activity (REA) and Silencing Mediator of Retinoic acid and Thyroid hormone receptors (SMRT) by immunohistochemistry, and for evaluating the mRNA expression of gonadotrophic hormone receptor: LHR and FSHR; steroid hormone

receptor: estrogen α (ER α), estrogen β (ER β), progesterone (PR) and AR; and coregulatory proteins: SRC-1, SRC-2, SRC-3, and Ligand-dependent nuclear-receptor CoRepressor (LCoR) by conventional RT-PCR. The findings of the current study provide evidence that ovaries from animals with induced and spontaneous COD exhibited altered steroid receptor and gonadotrophic hormone receptor expression compared with normal animals, as well as changes in the expression of coregulatory proteins.

Conservación y divergencia funcional entre miembros de la familia de factores de transcripción HD-Zip. Análisis molecular, evolutivo y de las redes de regulación en las que participan

Agustín Lucas Arce

aarce@fcb.unl.edu.ar

Director /codirector: Dra. Raquel L. Chan.

Lugar de realización: Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (UNL-CONICET).

Laboratorio, Cátedra y/o Departamento: Laboratorio de Biotecnología del Litoral.

Facultad: Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad: Universidad Nacional del Litoral.

Fecha de la defensa: 28/03/2012.

Resumen

Las plantas poseen complejos mecanismos de regulación encargados del control preciso de la expresión génica. Los factores de transcripción (FTs) son proteínas que desempeñan una función esencial en estas redes de regulación, uniendo el ADN en las regiones promotoras de sus genes blanco y alterando su transcripción. La familia de de FTs HD-Zip está compuesta por proteí-

nas que unen el ADN a través del homeodominio y dimerizan a través de un cierre de leucinas. De las cuatro subfamilias en las que es subdividida, la subfamilia I consiste en proteínas sin otros dominios o motivos descriptos, mientras que las proteínas de la subfamilia II poseen un motivo de regulación redox y una región conservada de función desconocida.

Los FTs de la subfamilia I están involucrados en diversos procesos, muchos relacionados a la fitohormona ácido abscísico (ABA). Cuando han sido expresados bajo la dirección del promotor fuerte y constitutivo 35SCaMV generaron plantas transgénicas con fenotipos diferentes. Sin embargo, estas proteínas unen *in vitro* con máxima afinidad la misma secuencia, CAATNATTG, sugiriendo que habría regiones fuera del dominio HD-Zip responsables de la diversidad funcional.

Esto motivó el análisis de las secuencias de 178 proteínas de la subfamilia I de diferentes especies. Una reconstrucción filogenética y una inspección de sus regiones carboxilo terminales (RCTs) permitió definir seis grupos monofiléticos con gran similitud en estas regiones.

La búsqueda de motivos conservados en las RCTs indicó la presencia de secuencias específicas de cada grupo y de una secuencia en la porción final con las características del motivo AHA activador de la transcripción. Además, las RCTs presentaron sitios putativos de fosforilación y sumoilación. Mediante ensayos de simple híbrido en levaduras se demostró que el motivo AHA del FT AtHB13 posee la capacidad de transactivación.

Para investigar la funcionalidad *in planta* de las RCTs, se expresó en *A. thaliana* una proteína quimérica con el dominio HD-Zip de la proteína HaHB4 y la RCT de HaHB1, empleando el promotor 35SCaMV. Se evaluaron fenotipos característicos generados por cada proteína salvaje: la insensibilidad al etileno observada cuando se expresa HaHB4 y el aserrado aumentado en hojas generado por la expresión de HaHB1. Las plantas que expresaban la proteína quimérica presentaron un aumento significativo en el aserrado de las hojas en una de las líneas y su insensibilidad al etileno fue leve, señalando que la identidad de la RCT tuvo un efecto importante en el fenotipo generado por la proteína.

Estos resultados permiten concluir que los FTs HD-Zip I serían capaces de activar la transcripción mediante el dominio AHA y que sus RCTs serían regulados por fosforilación y sumoilación. De esta forma, las regiones fuera del dominio HD-Zip tendrían una importante participación en la determina-

ción de las vías de señales en las que cada FT de esta subfamilia es capaz de actuar.

Con el fin de estudiar estas vías de señales se emplearon algoritmos de ingeniería reversa de redes de regulación transcripcional. Se analizó la expresión de 9617 genes en 269 ensayos de microarreglos de *A. thaliana* que involucraban diferentes tratamientos de estrés abiótico, obteniéndose los potenciales genes blanco de 25 proteínas HD-Zip I y II.

El elemento CAATNATTG se buscó en los promotores de estos conjuntos de genes blanco, llamados módulos de actividad transcripcional (MATs). Éste no se encontró enriquecido sugiriendo que secuencias similares serían reconocidas con suficiente afinidad. Una búsqueda *de novo* de motivos permitió hallar el elemento ABRE enriquecido en los promotores de genes de los MAT. Este motivo es reconocido por FTs involucrados en la respuesta a ABA.

Se investigó también qué proporción de los genes de cada MAT poseía expresión coordinada en las diferentes condiciones de estrés. Considerando esta medición como un indicador del grado de participación del FT en el tratamiento, se observó que la mayoría de los FTs HD-Zip I y II tiene una actividad importante en estrés por calor, una función no asociada a estas proteínas previamente.

Finalmente, se estudiaron las categorías funcionales estadísticamente enriquecidas en los genes de los MATs que. Varios de los FTs se asociaron a funciones ya encontradas por otros autores, así como a varias categorías funcionales no descriptas que podrían ser investigadas en el futuro.

En conclusión, la reconstrucción de una red de regulación transcripcional posibilitó la definición de genes blancos putativos de

las proteínas de las subfamilias I y II. Diferentes análisis de estos conjuntos brindaron un panorama global de las vías reguladas por los FTs de ambas subfamilias, permitiendo explorarlas desde una perspectiva comparativa y funcional, lo que indicó la existencia de similitudes y particularidades en la actividad de estas proteínas.

Summary

Functional conservation and divergence between members of the HD–Zip family of transcription factors. A molecular, evolutive and gene regulatory network analysis

The HD–Zip family of transcription factors (TFs) is composed of proteins that bind DNA through a homeodomain and dimerize through a leucine zipper. Subfamily I members are mainly involved in ABA responses and bind the same sequence with maximum affinity. Nonetheless, they generate a variety of phenotypes when expressed under the 35SCaMV promoter.

To study the source of this functional divergence, a phylogenetic and functional analysis was performed with 178 proteins, allowing the identification of 6 clades with characteristic C–terminal regions (CTRs) outside the HD–

Zip domain. These regions presented AHA activation motifs and putative phosphorylation and sumoylation sites. Yeast–one hybrid assays verified the activation capability of the RCT of AtHB13. The overexpression in Arabidopsis of chimerical proteins from HaHB1 and HaHB4 and their phenotypical analysis showed that these regions are also functionally divergent *in planta*.

The reverse engineering of the transcriptional regulatory networks in which HD–Zip I and II TFs participate was also performed. A dataset involving different abiotic treatments in Arabidopsis was used and lists of putative targets were obtained for each TF, called modules of transcriptional activity (MTAs). The promoters of MTA genes presented ABRE elements, indicating a potential cross–talk with TFs from other families. Coordinated expression of MTA genes was observed under heat stress, suggesting a previously unknown participation of HD–Zip TFs in this stress. The functional characterization of MTA genes revealed previously associated and new categories.

This work improves our knowledge on the mechanism of action of HD–Zip TFs and generates new hypothesis for future research.

Toxicidad y efectos fisiológicos del insecticida Endosulfán en peces neotropicales

Carla Bacchetta

carlabacchetta@yahoo.com.ar

Director/codirectoras: María Julieta Parma / Jimena Cazenave.

Laboratorio, Cátedra y/o Departamento: Laboratorio de Ictiología.

Facultad: Instituto Nacional de Limnología

(INALI). CONICET–UNL.

Fecha de la defensa: 01/06/2012.

Resumen

El Endosulfán (ED) es un insecticida organoclorado utilizado ampliamente para el control de plagas en cultivos de soja en

Argentina. Comúnmente, durante las prácticas agrícolas este pesticida se utiliza en combinación con otros insecticidas, como los piretroides. El objetivo general de la presente Tesis Doctoral fue evaluar la toxicidad aguda de una formulación comercial del insecticida ED para tres especies ícticas neotropicales (*Prochilodus lineatus*, *Cichlasoma dimerus* y *Piaractus mesopotamicus*), y detectar cambios subletales en marcadores de estrés en peces expuestos a ED en forma individual, y en una mezcla con el insecticida piretroide λ -cialotrina.

El valor de las CL50-96h del ED para *P. mesopotamicus*, *P. lineatus* y *C. dimerus* fue 3,6, 3,7, 17,7 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Los resultados mostraron que concentraciones subletales de ED produjeron cambios en los biomarcadores hematológicos, enzimáticos y de estrés oxidativo en diferentes órganos de *P. lineatus* y *C. dimerus*. Las concentraciones más altas de ED alteraron el contenido de hemoglobina (Hb), y aumentaron significativamente el conteo de glóbulos blancos (CGB). El conteo diferencial de leucocitos (CDL) también resultó alterado, aunque los cambios observados fueron diferentes en ambas especies. En *P. lineatus* aumentaron el porcentaje de trombocitos (Tr) y monocitos (Mo), y disminuyeron los linfocitos (Li) y neutrófilos (Ne), mientras que en *C. dimerus* sólo se observó un aumento en la proporción de Ne. Con respecto a los biomarcadores de daño tisular, se observó una disminución en la actividad de las enzimas alanino aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) en hepatopáncreas de *C. dimerus* expuestos a 6,8 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. En la concentración más alta de ED, se observó un aumento significativo de los niveles de peroxidación lipídica (LPO) en hígado, intestino y cerebro de *P. lineatus*, y

en branquias, hepatopáncreas y cerebro de *C. dimerus*.

Por otro lado, *P. mesopotamicus* expuestos a una combinación de ED (1,1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) y λ -cialotrina (0,7 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) mostraron un aumento significativo del índice hepatosomático (IHS), que no se observó en los expuestos a los pesticidas de modo individual. Por otro lado, el ED produjo cambios significativos en los peces expuestos, en algunas variables hematológicas de la serie roja (disminución del CGR y Hb) y el CDL, debido a una disminución del porcentaje de Ne en los peces expuestos. El piretroide λ -cialotrina también produjo cambios, que consistieron en un aumento de la glucosa (GL) y disminución de las proteínas totales (PT). La mezcla de ambos pesticidas produjo un aumento del CGB, así como también una marcada alteración de los componentes leucocitarios, representada principalmente por una disminución en el porcentaje de Li. Los cambios en las transaminasas consistieron en un incremento de su actividad en el riñón de los peces expuestos a ED y λ -cialotrina de modo individual, y una disminución en el hígado de los expuestos a la mezcla de ambos pesticidas. La respuesta antioxidante y el daño oxidativo en *P. mesopotamicus*, variaron según el tratamiento y órgano analizado. En general, los peces expuestos a ED y λ -cialotrina de modo individual mostraron alteraciones en la actividad de las enzimas antioxidantes en todos los órganos, sin registrarse cambios en los niveles de LPO. Por otro lado, la mezcla de ambos pesticidas produjo, una inducción enzimática en todos los órganos, acompañada por un aumento significativo en los niveles de LPO en hígado, riñón y cerebro de *P. mesopotamicus*.

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral mostraron que la exposición a concentraciones subletales de ED de modo individual y en mezcla con otro insecticida, produjo cambios hematológicos sobre todo relacionados al sistema inmune, alteración en enzimas metabólicas y antioxidantes, e inducción de daño oxidativo en órganos vitales de las especies ícticas neotropicales *P. lineatus*, *C. dimerus* y *P. mesopotamicus*.

Summary

Toxicity and physiological effects of the insecticide Endosulfan on neotropical fish

The organochlorine Endosulfan (ED) is one of the compounds used most extensively for pest-control in Argentinean crops. During agricultural practices, this pesticide

is commonly used in combination with other insecticides such as pyrethroids. This Doctoral Thesis was aimed at evaluating acute toxicity of a ED commercial formulation for three neotropical fish species (*Prochilodus lineatus*, *Cichlasoma dimerus*, and *Piaractus mesopotamicus*); and detecting sublethal changes of stress markers in fish exposed to ED alone, and combined with the pyrethroid λ -cyalothrin. The results obtained in the present Doctoral Thesis showed that exposure to sublethal ED concentrations, used individually and in combination with another insecticide, produced hematological changes which are primarily related to the immune system, alteration in metabolic and antioxidants enzymes, and induction of oxidative damage in vital organs of the neotropical fish species *P. lineatus*, *C. dimerus* and *P. mesopotamicus*.

Infecciones fágicas en *Lactobacillus plantarum*. Caracterización e implicancias industriales

Mariángeles Briggiler Marcó

mbriggil@fiq.unl.edu.ar

Director/codirectores: Andrea Quiberoni / Jorge Reinheimer.

Lugar de realización: Instituto de Lactología Industrial (UNL-CONICET).

Facultad: Facultad de Ingeniería Química.

Universidad: Universidad Nacional del Litoral.

Fecha de la defensa: 06/03/2012.

Resumen

Este trabajo tuvo como objetivo la caracterización fenotípica y genotípica de 2 fagos de colección (B1 y B2) y de 2 fagos aislados previamente de gránulos de kéfir (FAGK1 y FAGK2) de *Lb. plantarum*. Adicionalmente,

se llevó a cabo el estudio de su interacción con cepas sensibles.

El tamaño del genoma fue de 38 kb (fago B1) y 80 kb (fago B2) mientras que el mecanismo de empaquetamiento fue del tipo *pac* (fago B1) y del tipo *cos* (fago B2). Para el fago B1 fueron asociadas 13 proteínas estructurales mientras que para el fago B2 fueron identificadas 9. Adicionalmente, en el genoma del fago B2 fueron encontrados 6 ARNt. Ambos fagos forman parte de la familia *Siphoviridae*.

Los 4 fagos evidenciaron elevada infectividad en un rango de pH de 4 a 11 y aun a temperaturas de 50 °C. Por otro lado, se observó que a -80 °C se obtuvo la mayor

conservación de la viabilidad fágica. La lisis celular de *Lb. plantarum* ATCC 8014 ocurrió aún en ausencia de iones divalentes, aunque en presencia de calcio fue más veloz. En medio agarizado, la presencia de calcio facilitó la visualización de placas de lisis y la obtención de mayores títulos fágicos. Con respecto a la determinación del espectro de hospedadores, la mayoría de las cepas resultó sensible al fago B2. En cuanto a los parámetros de multiplicación fágica, se observaron períodos de latencia de entre 20 y 40 min, tiempos de burst de entre 80 y 90 min y burst sizes de entre 11 y 39 UFP/centro de infección (para los fagos B1, FAGK1 y FAGK2) y de 133 UFP/centro de infección para el fago B2. Para algunos sistemas, se evidenció la presencia de mecanismos de fagorresistencia del tipo R/M. La etapa de adsorción de los 4 fagos sobre la cepa sensible *Lb. plantarum* ATCC 8014 sería un proceso irreversible y fue escasamente afectada por la presencia de calcio, aunque se redujo a temperaturas de 50°C y valores de pH de 9 y 10. Por otro lado, el tratamiento térmico aplicado sobre las células produjo una disminución en las tasas de adsorción aunque el tratamiento de las células con cloranfenicol no afectó la adsorción de las partículas fágicas sobre la superficie celular. Los receptores fágicos presentarían naturaleza hidrocarbonada aunque los ensayos de inhibición con diversos azúcares, los estudios de competencia y desorción así como también los experimentos utilizando lectinas no permitieron obtener resultados concluyentes en cuanto a la identificación de los azúcares presentes en los receptores fágicos.

Los 4 fagos de *Lb. plantarum* evidenciaron resistencia a los procesos de pasteurización. Sin embargo, el tratamiento a 90 °C

durante 5 min produjo la eliminación completa de las partículas fágicas. De los agentes químicos estudiados, el ácido peracético fue el más eficiente ya que logró la inactivación completa de los fagos en cortos tiempos (< 5 min). Por otro lado, los alcoholes (etanol e isopropanol) no fueron eficientes en la destrucción viral mientras que el hipoclorito de sodio eliminó las partículas fágicas en una concentración de 800 ppm. La eficiencia de procesos fotocatalíticos (UV-TiO₂) en la inactivación de fagos de diversas especies de bacterias lácticas, fue fago-dependiente. Los fagos más sensibles forman parte de las especies *Lb. plantarum* y *St. thermophilus* mientras que los más resistentes pertenecen a *Lb. helveticus* y *Lb. delbrueckii*. En particular, para los fagos de *Lb. plantarum*, la fotocatalisis resultó más efectiva que la aplicación de radiación UV (sin catalizador) ya que sólo en el primer caso se observó la eliminación total de las partículas.

Finalmente, se aislaron 81 mutantes fagorresistentes a partir de las cepas *Lb. plantarum* ATCC 8014 y PLN, utilizando los fagos B1 y B2, ya sea de manera individual o conjunta (cócteles de fagos). En general, el método en medio agarizado fue más eficiente para el aislamiento de los mutantes que el método de cultivo secundario. El nivel de fagorresistencia de las variantes estudiado a través del EOP (Efficiency of plaquing) fue muy bueno. Sin embargo, los niveles de estabilidad de la fagorresistencia fueron variables. En cuanto a la identificación de mecanismos involucrados en la resistencia fágica de los mutantes, en algunos casos fue posible evidenciar liberación espontánea de partículas fágicas, aunque no fue un fenómeno repetitivo. En general, los mutantes aislados presentaron un

mecanismo de resistencia asociado al bloqueo de la adsorción. Los perfiles RAPD–PCR de los mutantes revelaron una elevada homología genética con su cepa madre. Las variantes fagorresistentes fueron capaces de desarrollar en un medio de cultivo a base de leche, alcanzando bajos valores de pH y elevada acidez a las 24 hs. En particular, un mutante seleccionado fue capaz de resistir la presencia de cócteles de fagos durante la elaboración de leche fermentada y posterior almacenamiento refrigerado del producto.

Los resultados obtenidos en este estudio permiten profundizar los conocimientos referidos a infecciones fágicas en *Lb. plantarum*, los cuales serían necesarios si esta especie bacteriana es utilizada en el desarrollo de alimentos funcionales. Por otro lado, este trabajo demostró que es posible el aislamiento de variantes fagorresistentes con adecuadas propiedades tecnológicas.

Summary

Phage infections in Lactobacillus plantarum. Characterization and industrial implications

In this thesis, a molecular characterization (including DNA packaging mechanisms, genome sequencing and structural protein identification) of two *Lactobacillus plantarum* collection phages (ATCC 8014–B1 and ATCC 8014–B2) was carried out. In addition, the phage morphology was studied.

On the other hand, phage viability throughout storage at different pH and temperature was determined for collection phages and for phages FAGK1 and FAGK2 (isolated from kefir grains). To characterize the interaction between phages and their sensitive strains, the following aspects were studied: influence of divalent cations during the lytic cycle, host spectrum, one step growth curves, characterization of the adsorption step, phage receptors and presence of restriction–modification (R/M) systems.

In the second chapter of this Thesis, the behavior of phages subjected to thermal (63, 72 and 90 °C), chemical (alcohols, sodium hypochlorite and peracetic acid) and photocatalytic treatments, used to diminish the frequency of phage infections, was studied. In particular, the efficiency of photocatalysis on phage inactivation was studied for phages infecting diverse species of lactic acid bacteria. Also, phage–resistant mutants of *Lb. plantarum* were isolated. The phage resistance phenotype of the mutants as well as their technological performance were studied.

Results obtained in this Thesis significantly contributed to improve the knowledge about phage infections on *Lb. plantarum*, which would be useful if this bacterial species is used in the manufacture of functional foods. On the other hand, this work demonstrated that the assayed methodologies are efficient for obtaining spontaneous phage–resistant mutants from *Lb. plantarum* strains with adequate technological properties.

Caracterización hematológica de especies de anfibios anuros con distribución en los ecosistemas del litoral fluvial argentino (provincias de Entre Ríos y Santa Fe). Potencialidad de su utilización como biomarcadores

Bioq. Mariana C. Cabagna Zenklusen

mcabagna@fbc.unl.edu.ar

Director/codirector: Dr. Rafael Lajmanovich / Dr. Rafael Althaus.

Laboratorio, Cátedra y/o Departamento: Cátedra de Ecotoxicología – Escuela Superior de Sanidad; cátedra de Morfología Normal.

Facultad: Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas.

Universidad: Universidad Nacional del Litoral.

Fecha de la defensa: 01/10/2012.

Resumen

Entre los distintos biomarcadores no destructivos utilizados, los análisis hematológicos, hemograma y determinaciones químicas en plasma o suero, son unos de los más usados para la prevención, diagnóstico, pronóstico y tratamiento de las enfermedades en los seres humanos y en otras especies animales. Sin embargo, un inconveniente para su uso en los anfibios como herramienta de diagnóstico ambiental es la falta de información sobre la hematología de la mayoría de estas especies. Por lo tanto, el objetivo general de esta tesis fue caracterizar las células sanguíneas de las especies de anfibios anuros, adultos y larvas, de las familias más representativas de los ecosistemas del litoral fluvial de Argentina y determinar la posibilidad de utilizar estos parámetros como biomarcadores de contaminación ambiental. De esta forma, se presentan y discuten los resultados de

hemograma y la morfología de las células sanguíneas obtenidos de muestras de sangre provenientes de individuos de quince especies de anfibios anuros, provenientes de zonas de las provincias de Entre Ríos (departamentos Paraná y Gualeguaychú) y Santa Fe (departamento La Capital), Argentina, no relacionadas con actividades agroindustriales. En el caso de los especímenes adultos de *Odontophrynus americanus*, las mediciones se realizaron en extendidos sanguíneos provenientes de la colección herpetológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (Universidad Nacional de Río Cuarto).

Para determinar la posibilidad de utilizar estos parámetros como biomarcadores de contaminación ambiental y los anfibios como especies indicadoras, se eligieron zonas relacionadas con las actividades productivas más representativas de la región en la que está emplazada nuestra Facultad: la industria, la agricultura y la actividad frutihortícola.

A través de la evaluación hematológica de anfibios anuros, en larvas de tres especies, distintas de anuros expuestas a efluentes industriales y en cultivos de arroz (*Odontophrynus americanus*, *Scinax squarilirostris* y *Leptodactylus mystacinus*), se observó incremento de granulocitos eosinófilos, leucocitos considerados como un signo de protección frente a agentes tóxicos. En adultos expuestos a agroquímicos,

se registraron disminución del hematocrito y la concentración de hemoglobina, con linfocitosis y aumento del recuento de leucocitos, cambios semejantes a los observados en estudios llevados a cabo con insecticidas y herbicidas en laboratorio, en distintas especies animales. Por lo tanto, a pesar que la evaluación hematológica puede ser compleja, es uno de los métodos más sencillos y menos invasivos que permiten la detección de cambios fisiológicos y patológicos de las poblaciones silvestres, relacionados con factores ambientales.

Summary

Hematological characterization of amphibian anuran species distributed in the ecosystems from the Argentinean fluvial littoral zone (Entre Ríos and Santa Fe provinces): Their potential use as biomarkers

Among different non destructive biomarkers used, the hematological analysis (blood count and chemical determinations in plasma or serum) is one of the most common practice for the prevention, diagnosis, assessment and treatment of illnesses either in human or animal wildlife. However, one disadvantage for its use in amphibians as a tool for environmental diagnosis is the lack of hematological information available on most of these species. For this reason, the general aim of own doctoral thesis was to characterize blood cells of anuran species, both adults and larvae, belonging to the most representative families found in ecosystems in the littoral zone in Argentina. Moreover, based on this characterization I determined the possibility of using these parameters as biomarkers for environmental contamination. Blood count results and morphology of blood cells obtained

from samples taken from fifteen species of anuran located in the Provinces of Entre Ríos (Paraná and Gualeguaychú) and Santa Fe (La Capital) are presented and discussed. These areas are not related to agro industrial activities. In the case of adult specimen of *Odontophrynus americanus*, relevant measurements were made in blood slides taken from the herpetological collection belonging to the Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (Universidad Nacional de Río Cuarto).

In order to settle the possibility of using these parameters as biomarkers of environmental contamination and amphibian as indicator species, we selected areas related located within or surrounded by anthropogenic activities such as industry, agriculture and fruit-horticulture.

Through the hematological evaluation of anuran amphibians, I observed in larvae of three different species (*Odontophrynus americanus*, *Scinax squalirostris* y *Leptodactylus mystacinus*) that were exposed to industrial waste and rice fields, an increase of eosinophilic granulocytes, which are leukocytes considered as a sign of protection against toxic agents. In adults that were exposed to agrochemicals, I recorded a decrease of hematocrit and hemoglobin concentration, with lymphocytes and a rise of leucocytes count, similar changes to those observed in studies carried out in different species with insecticides and herbicides in laboratory worldwide. Therefore, and in spite of the fact that the hematological evaluation can be complex, it is one of the simplest and less invasive methods that allow the detection of physiological and pathological changes in the wild populations related to environmental factors.

Diversidad de macroparásitos en especies ícticas de la Familia Pimelodidae, de la llanura aluvial del río Paraná Medio

Silvina Beatriz Chemes

schemes@fhuc.unl.edu.ar

Director/codirectora: Dr. Ricardo M. Takemoto / MSc. María Julieta Parma.

Lugar de realización: Laboratorio del Dpto. Ciencias Naturales, Facultad de Humanidades y Ciencias (UNL) y Laboratorio de Ictiología, Instituto Nacional de Limnología (CONICET-UNL).

Universidad: Universidad Nacional del Litoral.

Fecha de la defensa: 25/10/12.

Resumen

Con el objetivo de conocer la diversidad de macroparásitos de peces de la Familia Pimelodidae de la llanura aluvial del río Paraná Medio, se capturaron 129 ejemplares de las especies *Luciopimelodus pati*, *Pimelodus albicans*, *P. maculatus* y *Pseudoplatystoma corruscans*. Estas se destacan por ser componentes importantes de la fauna autóctona y por constituir especies de alto valor ecológico, comercial y deportivo. Las capturas se realizaron en ambientes leníticos y lóticos de los ríos Coronda, Salado y San Javier (Santa Fe). Luego de registrar medidas de talla y peso de los peces, se practicaron las técnicas usuales de disección, hallándose 2068 ictioparásitos, que fueron preparados según protocolos de rutina para cada grupo taxonómico. Se determinaron los descriptores parasitológicos, luego se aplicaron índices ecológicos y estadísticos sobre la información obtenida de peces y parásitos, analizando la interac-

ción ecológica desde diferentes puntos de vista. Los resultados muestran que existe una elevada diversidad parasitaria en el Sistema Paraná Medio, dada por 49 taxones de 8 grupos zoológicos de macroparásitos. En orden decreciente por su riqueza, estos pertenecieron a Monogenea (14), Nematoda (10), Eucestoda y Digenea (6 en cada caso), Acanthocephala (5), Copepoda (4), Branchiura (3) y Annelida (1). Se registran 3 especies aún no descritas, se amplía la distribución geográfica de la mayoría de los taxones y se hallan nuevos hospedadores para parásitos citados en otros peces de la región neotropical. Se analizan con mayor profundidad las comunidades componentes de *P. albicans* y *P. maculatus*. Las interacciones hospedador-parásito estudiadas responden a algunos de los principios de la Teoría de Biogeografía de Islas, según los que el Sistema Paraná Medio estaría actuando como corredor biológico, los peces como islas de hábitats colonizables y su comportamiento favoreciendo la colonización. La estructura general de estas comunidades se conformó por Monogenea en primer lugar; luego Digenea, Acanthocephala, Nematoda y el resto de los taxones. No se encontraron asociaciones significativas entre el estado de desarrollo de los peces y sus parásitos, tampoco entre el estado de condición de los hospedadores y los parásitos. En Monogenea, la disposición de los parásitos en sus hospedadores fue agregada, hallándose variaciones en el

nivel de agregación en el resto de los taxa. Se discuten los resultados, postulando la importancia del conocimiento de las comunidades de parásitos para evaluar los sistemas acuáticos y comprender el rol de todos los componentes del ecosistema.

Summary

Diversity of macroparasites in fish of the Pimelodidae Family from the floodplain of the Middle Paraná River

In order to know the diversity of macroparasites in fish of the Pimelodidae family from the floodplain of the Middle Paraná River, 129 specimens of *Lucio-pimelodus pati*, *Pimelodus albicans*, *P. maculatus* and *Pseudoplatystoma corrus-cans* were captured. Captures were made in environments in the Coronda, Salado and San Javier Rivers (Santa Fe). Length and weight was measure and then dissection was performed to all fish: 2068 ichthyoparasites were found. Parasitological descriptors were determined, and then ecological indices and statistical analysis applied. Results show that there

is a high diversity of ichthyoparasites in the Middle Paraná system, including 49 taxa of 8 different groups of macroparasites. In a decreasing order of richness, they belong to Monogenea (14), Nematoda (10), Eucestoda and Digenea (6 in each case), Acanthocephala (5), Copepoda (4), Branchiura (3) and Annelida (1). Within these 49 taxa, 3 species have not been described yet. The geographical distribution of most of the taxa is expanded, and new hosts for ichthyoparasites from the neotropical region have been found. The host-parasite interactions are consistent with the Theory of Island Biogeography, which propose that the Paraná system would act as a biological corridor, fish species as habitat island for colonization, and their behavior promoting colonization. General structure of these communities is made up of Monogenea at first place, following by Digenea, Acanthocephala, Nematoda and the others taxa. In view of these results, we highlight the importance of knowing parasite communities in aquatic systems and understanding the role of all components of the ecosystem.

Estudios agronómicos en moha perenne —*Setaria Lachnea* (Nees) Kunth—

Eliana de Luján Exner
eexner@fca.unl.edu.ar

Director: José Francisco Pensiero.
Lugar de realización: Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas.

Cátedra: Botánica Sistemática Agronómica,
 Departamento: de Biología Vegetal.

Facultad: Facultad de Ciencias Agrarias.

Universidad: Universidad Nacional del Litoral.
 Fecha de la defensa: 30/08/2012.

Resumen

Setaria lachnea ("moha perenne") es una gramínea nativa, perenne, de ciclo primavera-estivo-otoño, de amplia distribución en Argentina, que constituye un recurso forra-

jero valioso de los pastizales de nuestro país. Ha sido recomendada su conservación e inclusión en planes de domesticación.

La presente tesis tuvo por finalidad el estudio de las variaciones en caracteres de interés agronómico, citogenético y molecular en poblaciones procedentes de un gradiente latitudinal y altitudinal del noroeste de Argentina (capítulo I, poblaciones 6221, 6227 y 6242); y la caracterización agronómica de una población considerada promisoría desde el punto de vista forrajero (capítulo II, población 6234–38).

En el estudio de la fenología de la floración para las poblaciones 6221, 6227 y 6242, no se hallaron variaciones para la variable inicio de floración, aunque sí diferencias significativas intrapoblacionales. Los genotipos de la población 6234–38, resultaron tener una floración más tardía.

El éxito reproductivo, expresado a través del porcentaje de fructificación, mostró variabilidad inter e intrapoblacional (en las procedencias 6221, 6227 y 6242), destacándose los genotipos de la población 6221 por su mayor fructificación. Para la población 6234–38, los genotipos correspondientes al tratamiento cortes presentaron los mayores porcentajes de fructificación. El número de panojas por planta fue elevado en todas las poblaciones analizadas, por lo que no resultaría un factor limitante para el éxito reproductivo.

El peso promedio de 1000 cariopsis para la población 6234–38 fue de 0,39 gr, registrándose diferencias significativas entre genotipos y tratamientos. Los genotipos correspondientes al tratamiento cortes presentaron los mayores pesos de semillas.

Los ensayos sobre el comportamiento germinativo permitieron reafirmar la existencia de dormición seminal, pues si bien

se obtuvo escasa a nula germinación, las semillas presentaron elevados valores de viabilidad. La técnica de escarificado ensayada no permitió mejorar la germinación. Por otra parte, temperaturas constante de 27 °C y alternancia 27–37 °C permitieron mejorar la germinación con respecto a temperaturas constantes 17 °C.

La técnica empleada no permitió hallar, en los materiales analizados, tolerancia a las altas temperaturas, ni a las bajas temperaturas.

La productividad forrajera evaluada en la población 6234–38 mostró diferencias significativas tanto entre genotipos como tratamientos. Los valores de digestibilidad hallados en genotipos de la población 6234–38 (64,3 % en promedio) son importantes para una gramínea megatérmica.

Del análisis de correlación entre las variables evaluadas correspondientes a la fenología de la floración y al éxito reproductivo se infiere que los genotipos de las poblaciones 6221, 6227 y 6234–38 cuanto antes inician su floración mayor es el número de panojas producidas, incrementándose así la producción potencial de semillas.

El análisis de correlaciones en los genotipos de la población 6234–38 reveló que las variables asociadas a la producción de MS (materia seca) se correlacionaron positivamente entre ellas y con la altura al momento de corte, y con el perímetro de mata inicial y final bajo corte; y negativamente con el inicio y mitad de la floración. No se hallaron correlaciones entre las variables asociadas a la producción de MS y las vinculadas a la producción de semillas, tampoco entre el peso de semillas y la germinación de las mismas.

Los recuentos cromosómicos indican que las poblaciones analizadas están cons-

tituidas por individuos con un único citotipo tetraploide ($2n = 4x = 36$ cromosomas). El tamaño medio de los cromosomas es de 4,25 μm . Se halló un cariotipo simétrico con una fórmula cariotípica de $14m + 4sm$.

El análisis de la meiosis mostró que las asociaciones cromosómicas más frecuentes fueron bivalentes con segregación normal, ausencia de cromosomas rezagados y micronúcleos, sugiriendo un origen aloploide.

El análisis molecular solo agrupó a las poblaciones según su origen geográfico.

Summary

Agronomic studies in moha perenne – Setaria lachnea (Nees) Kunth–

Setaria lachnea (“moha perenne”) is a perennial native grass, of spring–summer–fall cycle, widely distributed in Argentina, which constitutes a valuable forage resource.

The variations in agronomic characters, cytogenetic and molecular was studied from latitudinal and altitudinal gradient in north-western Argentina.

In flowering phenology (populations 6221, 6227 and 6242) although significant differences within populations were. The 6234–38 genotypes, turned out to have a late flowering.

Reproductive success, (percentage fruit set), showed inter and intra variability (6221, 6227 and 6242), highlighting the genotypes of the 6221 population.

The average weight of 1000 caryopses (6234–38) was 0,39 g, showing significant differences between genotypes and treatments. The genotypes for the court treatment showed the highest seed weights and reproductive success.

The tests reaffirmed the existence of seed dormancy. The scarifying tested technique did not allow to improve germination. Constant temperatures of 27° C and of 27–37° C alternating improved the germination.

Evaluated forage productivity (6234–38) showed significant differences between genotypes and treatments.

The digestibility values found (6234–38 population) was 64,3 %.

The variables associated with the production of DM were positively correlated among themselves and negatively with the beginning and mid–flowering (population 6234–38).

Chromosome counts indicate individuals with a single tetraploid cytotypes ($2n = 4x = 36$ chromosomes). The average size of the chromosomes is 4.25 microns with symmetrical karyotype: $14m + 4sm$.

The most frequent chromosome associations were bivalent with normal segregation, absence of lagging chromosomes and micronuclei, all suggesting an aloploide origin.

The molecular analysis only grouped populations according to their geographical origin.

Caracterización funcional de genes de girasol que codifican factores de transcripción de la familia WRKY. HaWRKY6 y su regulación por el microRNA396

Jorge Ignacio Giacomelli

jorgegiacomelli@gmail.com

Director/codirector: Dra. Raquel L. Chan.

Laboratorio, Cátedra y/o Departamento:
Laboratorio de Biotecnología Vegetal.

Facultad: Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas.

Universidad: Universidad Nacional del Litoral.

Fecha de la defensa: 12/04/12.

Resumen

En primer lugar, encaramos análisis bioinformáticos que nos permitieron identificar 97 miembros WRKY. Éstos se pudieron clasificar dentro de los grupos ya conocidos de FTs en otras especies más estudiadas. Sin embargo, además de los grupos filogenéticos conocidos, algunos miembros de la familia se resolvieron en los árboles como un clado novel, al que llamamos WKKY. Los miembros de este grupo poseen algunas características compartidas con los del subgrupo IId, y otras particulares. Los análisis de los patrones de expresión de un miembro seleccionado de cada grupo indicaron que la expresión de estos genes está regulada por heridas, tratamientos estresantes y hormonas, sugiriendo que en esta especie también participarían en variadas respuestas de estrés.

De los genes seleccionados para el estudio de su expresión, HaWRKY5 fue el único que mostró un comportamiento diferencial entre dos cultivares de girasol, uno susceptible y otro moderadamente resistente a *Sclerotinia sclerotiorum*.

La expresión de este gen se encuentra aumentada en condiciones basales en el cultivar resistente comparada con el sensible, y además, la infección con el hongo genera una inducción adicional. Este resultado indicaría que *HaWRKY5* podría convertirse en un marcador molecular asociado a la resistencia a *Sclerotinia*. Las medidas de expresión realizadas para estos genes de girasol se correlacionaron con datos de microarreglos de *Arabidopsis*; las observaciones realizadas nos permitieron relacionar genes de ambas especies que podrían ser ortólogos funcionales. Luego de la identificación de todos los miembros de la familia, decidimos abocarnos a la caracterización de HaWRKY6, un miembro atípico del grupo IIa. Se expresó el dominio de unión correspondiente en forma recombinante y la proteína resultante unió el mismo elemento W-box que sus homólogos de otras especies en ensayos de retardo en geles. La expresión de este gen fue muy débil en todos los tejidos analizados pero aumentó significativamente en raíces y hojas de plantas sometidas a estreses. Por otro lado, se obtuvieron plantas transgénicas de *Arabidopsis* que expresaban el gen reportero *GUS* controlado por el promotor de *HaWRKY6*. Las tinciones histoquímicas de estas plantas se observaron en raíces y meristemas apicales.

También se obtuvieron plantas de *Arabidopsis* transformadas con la construcción 35S::*HaWRKY6*. Estas plantas mostraron mayor insensibilidad al ABA y al etileno que

sus controles en ensayos de inhibición de la germinación. Sin embargo, no fue posible observar otro fenotipo diferencial. El análisis del transcriptoma de discos de hojas de girasol que sobreexpresan *HaWRKY6* indicó un rol de este gen en la regulación de genes relacionados con respuestas de estrés.

Los niveles de expresión observados en las plantas transgénicas *35S::HaWRKY6* fueron muy bajos en todas las líneas analizadas (más de sesenta), a pesar de que su expresión estaba controlada por el promotor constitutivo *35SCaMV*. El análisis de la secuencia nucleotídica de *HaWRKY6* mostró que posee un sitio de reconocimiento putativo para el *miR396*, un miRNA muy conservado en las plantas verdes, que normalmente regula a una familia de factores de transcripción (FTs) conocida como GRF. Los FTs GRF están involucrados en el desarrollo. Por otro lado, las proteínas homólogas de *HaWRKY6* en *Arabidopsis* no están reguladas por el *miR396*, por lo que esta regulación representa un evento nuevo de adquisición de un gen blanco, por parte de un miRNA antiguo.

Logramos identificar en las bases de datos la existencia de un gen de girasol que codificaría un homólogo del *ath-miR396*, *han-miR396*. Al caracterizar la expresión de *han-miR396* en ensayos de *Northern*, observamos que su expresión es alta en tejidos adultos, al igual que la de sus homólogos de *Arabidopsis*, *ath-miR396a/b*. Además, *HaWRKY6* y *han-miR396* muestran patrones de expresión opuestos en plantas sometidas a altas temperaturas o tratamientos con SA. Se realizó una construcción resistente al miRNA y se utilizó para transformar plantas de *Arabidopsis*. Las mismas presentaron un fenotipo diferencial, siendo más sensibles a los tratamientos con altas

temperaturas que las plantas de *Arabidopsis* salvajes o transformadas con la versión de no resistente de *HaWRKY6*.

Summary

Functional characterization of sunflower genes encoding transcription factor WRKY family. HaWRKY6 and its regulation by the microRNA396

Phylogenetic trees constructed with WRKY domains resolved the same 7 groups assigned to *Arabidopsis* and additionally, a novel clade with traits apparently specific to Asteraceae. Members of the novel clade share some features with those of group IId and others unique to this clade, indicating that Asteraceae WRKY family has suffered a diversification. Expression patterns of one selected member of each group indicated that these genes were regulated by biotic and abiotic stresses as well as by stress-associated hormones. Among sunflower WRKY encoding genes, *HaWRKY6*, from group IIa, appeared as a good candidate for a deeper characterization, due to its particular structural features. A segment of the promoter region was isolated and cloned directing GUS expression and *Arabidopsis* plants transformed with this construct. GUS expression was very strong in roots, petioles and apical meristems. Transcriptome analysis of sunflower leaf discs transformed with *35S::HaWRKY6* indicated a role of this gene in stress responses.

Surprisingly, none of the large number of independent transgenic lines analyzed exhibited detectable *HaWRKY6* transcript levels. *HaWRKY6* and *han-miR396* shown opposite expression patterns in plants subjected to high temperatures or SA. Moreover, in *Arabidopsis* young tissues in which

the mir396 is low or not expressed at all, 35S:HaWRKY6 plants showed a differential germination phenotype. A miR396-resistant HaWRKY6 construct was performed and Arabidopsis plants stably transformed with it. These plants were more sensitive to high

temperatures compared with plants transformed with the wild-type version, revealing how a recently acquired miRNA target motif in HaWRKY6 gene contributes to temperature response.

Impacto de xenobióticos y comunicadores químicos sobre algunos procesos biológicos en organismos del zooplancton

María Florencia Gutierrez

fgutierrez@inali.unl.edu.ar

Director/codirector: Juan Cesar Paggi / Ana María Gagneten.

Lugar de realización: Instituto Nacional de Limnología (CONICET-UNL).

Laboratorio, Cátedra y/o Departamento: Laboratorio de Plancton.

Fecha de la defensa: 28/02/2012

Resumen

La necesidad de obtener herramientas metodológicas adecuadas y representativas que permitan medir el impacto de los xenobióticos y el efecto de ciertos estresantes naturales, como son los comunicadores químicos (infoquímicos) indicadores de depredación sobre los integrantes del zooplancton, promovió el desarrollo de la presente tesis.

Dado que el comportamiento representa una respuesta integrada y de relevancia ecológica para los organismos frente a diversas situaciones ambientales, se ha considerado un parámetro de potencial significancia, tanto para estudios ecológicos como ecotoxicológicos. Este paráme-

tro permitiría reconocer respuestas rápidas y no destructivas a diversos estresantes y estimar posibles consecuencias poblacionales a largo plazo.

Partiendo de estas premisas, se propuso la hipótesis de que los contaminantes y los infoquímicos indicadores de depredación son capaces de modificar el comportamiento de los microcrustáceos del zooplancton, y que dichas modificaciones constituyen biomarcadores sensibles y tempranos.

Para ello se realizaron numerosos trabajos experimentales bajo condiciones controladas de laboratorio utilizando tres especies de cladóceros (*Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia*, *Pseudosida variabilis*) y dos de copépodos (*Argyrodiaptomus falcifer* y *Notodiaptomus conifer*). Los experimentos se realizaron en tres etapas que comprendieron ensayos de toxicidad aguda, de ciclo de vida y de comportamiento. Para estos últimos se diseñaron dispositivos específicos que permitieron evaluar la migración vertical diaria (MVD) y la capacidad de escape de los organismos mencionados. En ambos casos se realizaron nume-

rosos experimentos previos que permitieron definir los patrones "normales" de comportamiento. Posteriormente se analizaron las respectivas respuestas ante la presencia de diferentes concentraciones de metales (cromo y cobre), un insecticida comercial (cuyo componente activo es el endosulfán) e infoquímicos de un pez zooplanctófono, *Cnesterodon decemmaculatus*.

Los resultados demostraron que los organismos estudiados son sensibles a los infoquímicos. Esto se observó en la gran plasticidad fenotípica registrada en el ciclo de vida del copépodo *N. conifer* y en las modificaciones etológicas de las cinco especies, luego de la exposición al medio con dichos comunicadores.

Considerando los efectos de los xenobióticos, en general los parámetros reproductivos constituyeron los indicadores de efecto más sensibles en los estudios de ciclo de vida. Sin embargo, las alteraciones en la habilidad de escape y los movimientos migratorios resultaron ser mejores biomarcadores de los contaminantes utilizados, permitiendo detectar el impacto a concentraciones menores que las que generaron respuestas negativas tanto en los ensayos agudos como en los crónicos.

Dada la importancia del comportamiento en la distribución y éxito evolutivo de los organismos en la naturaleza, las posibles alteraciones en dicho parámetro podrían generar serias consecuencias negativas, no sólo para el zooplancton sino también para los eslabones tróficos vinculados a ellos.

Finalmente, la elevada sensibilidad de *N. conifer* y *P. variabilis* (al compararlas con otros microcrustáceos utilizados en estudios ecotoxicológicos) y su gran representatividad de los ambientes neotropicales,

permiten sugerirlas como especies muy adecuadas para futuros trabajos en esta línea de investigación.

Summary

Impact of xenobiotics and chemical communicators in some biological processes in zooplankton organisms

This thesis was designed to analyze weather pollutants as well as some infochemicals, indicating risk of predation, are able to modify zooplankton microcrustaceans behaviour. From an ecotoxicological perspective, we hypothesized that such changes could be used as sensitive and earlier biomarkers. To test this, numerous experimental works were carried out using three cladocerans (*Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia* and *Pseudosida variabilis*) and two copepods (*Argyrodiaptomus falcifer* and *Notodiaptomus conifer*) species as test organisms. The metals chromium and copper and the insecticide endosulfan were used as pollutants. The infochemicals indicating predation were obtained from the zooplanktivorous fish *Cnesterodon decemmaculatus*.

Results showed that two important behaviours for zooplankton: the ability to escape and diel vertical migration, as well as many life cycle parameters were disturbed at low concentrations of both substances, the natural infochemicals and the pollutants.

Taking into account that behaviour is one of the most important traits of an organism's life cycle because it promotes their distribution and evolutive success, we concluded that the alteration on this parameter would produce serious consequences not only to zooplankton species but also to the associated trophic levels.

In addition to this, we showed that the ability to escape and diel vertical migration can be considered sensitive biomarkers for the studied organisms. Finally, due to the high sensitivity of *N. conifer* and *P. variabi-*

lis, and their high representativity in neotropical environments, it is suggested that they would be appropriate species to future studies in this investigation line.

Relaciones de estructura a función y evolución de enzimas del metabolismo del carbono. Caracterización de enzimas del metabolismo de hidratos de carbono en bacterias autotróficas y heterotróficas

Machtey Matías

matimach@gmail.com

Director/codirector: Alberto Álvaro Iglesias.

Lugar de realización: Santa Fe, Santa Fe, Argentina.

Laboratorio, Cátedra y/o Departamento: Laboratorio de Enzimología Molecular.

Facultad: Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas.

Universidad: Universidad Nacional del Litoral.

Fecha de la defensa: 14/12/2012.

Resumen

En este trabajo se profundiza en el estudio comparativo del metabolismo de los hidratos de carbono entre organismos heterótrofos y autótrofos. Para tal caso, se abordó el estudio in vitro de las enzimas que conforman las rutas biosintéticas del glucógeno en dos bacterias: *Prevotella intermedia* (*quimioorgano-heterótrofo*) y *Nitrosomonas europaea* (*quimiolito-autótrofo*). Para esta última, además se profundizó en la comprensión del metabolismo de la sacarosa, usualmente ausente en organismos procariontas no fotosintéticos.

P. intermedia es una bacteria perteneciente al phylum Bacteroidetes, que par-

tipica de la patología periodontitis. Como otros organismos evolutivamente cercanos, como el caso de *P. briantii* y *P. nigrescens*, *P. intermedia* acumula glucógeno durante las situaciones transitorias donde abundan fuentes de carbono y energía externa. En este trabajo se clonó, purificó y caracterizó la enzima recombinante glucógeno sintasa (GSasa). Ésta posee una secuencia con un largo intermedio entre las GSasas procariontas y de hongos (y mamíferos) pero mayor similitud de secuencia con estas últimas. Además, la especificidad por el sustrato mostró un orden de preferencia de ADP-Glc > dTDP-Glc > UDP-Glc. Si bien la enzima fue capaz de utilizar el sustrato UDP-Glc, como proponen trabajos publicados, la enzima fue capaz de utilizar con mayor eficiencia catalítica ADP-Glc y dTDP-Glc. *Prevotella spp.* no posee en su genoma un gen putativo para ADP-Glc pirofosforilasa (ADPGlc PPasa, corroborado in vivo en otros trabajos) ni UDP-Glc pirofosforilasa, pero sí una dTDP-glucosa pirofosforilasa (TDPGlc PPasa). En este trabajo expresamos, purificamos y caracterizamos la enzima TDPGlc PPasa recombinante siendo activa tanto con el sustrato dTTP y UTP, pero no con

ATP. Esta enzima no mostró ser regulada alostéricamente por metabolitos intermedios del metabolismo del carbono. A partir de este panorama, planteamos que en *Prevotella spp.* la síntesis de glucógeno podría llevarse a cabo por una variante de la propuesta para procariontes, en la que la Glc-1P se activaría como dTDP-Glc a través de la acción de la TDPGlc PPasa y éste sustrato se utilizaría para elongar glucógeno a través de la enzima GSasa. Bacteroidetes parecería ser un phylum particular respecto a la síntesis de glucógeno en bacterias y resulta atractivo profundizar la investigación, para teorizar sobre el origen evolutivo de esta variante evolutiva.

N. europaea, en cambio, es un organismo quimiolitotóxico facultativo (incorpora preferencialmente carbono autotóxicamente, aunque también heterotóxicamente en ciertas condiciones) obteniendo energía a partir de la oxidación de amonio. Dicho organismo presenta codificado en su genoma las enzimas correspondientes a las rutas metabólicas tanto para el glucógeno como para la sacarosa (Suc). En este trabajo se estudiaron las enzimas recombinantes: ADPGlc PPasa, GSasa, sacarosa sintasa (Suc Sasa) y la sacarosa fosfato sintasa (SucP Sasa). Respecto de la primera, que coordina la síntesis de ADP-Glc y el punto metabólico clave de regulación de la síntesis de glucógeno en bacterias y plantas (con el almidón), resultó ser activada por piruvato, oxaloacetato y fosfoenolpiruvato e inhibida por AMP. Además, mostró promiscuidad por el uso de los cofactores metálicos divalentes esenciales (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} y Cd^{2+}) y, según el metal utilizado, la enzima mostró promiscuidad variable por el uso de los nucleótidos trifosfato y el azúcar-

1P. Si bien fisiológicamente sea el Mg^{2+} el cofactor más relevante por su abundancia en la naturaleza, el uso de otros metales podría ser un factor a considerar tecnológicamente para producir bibliotecas de NDP-azúcar en lo que se denomina glycorandomization; como también ser de utilidad para el estudio de la estructura/función por técnicas espectroscópicas. Por otro lado, determinamos que la GSasa, la NeuSuc Sasa y la NeuSucP Sasa (que posee, además, un dominio sacarosa fosfato fosfatasa, SucP Pasa) utilizaron preferentemente como sustrato dador de residuo glucosilo a la ADP-Glc. La enzima GSasa, mostró ser específica por el sustrato ADP-Glc, mientras que el dominio SucP Sasa pudo utilizarlo con similar eficiencia catalítica que con UDP-Glc, aunque presentó mayor afinidad aparente por este último. El dominio SucP Pasa mostró ser activo y específico por el disacárido fosforilado Suc-6P. En base a estos resultados in vitro, pareciera que la síntesis de Suc, vía SucP Sasa tipo II (dominios fusionados: SucP Sasa y SucP Pasa), podría llevarse a cabo tanto a partir de ADP-Glc como UDP-Glc. Sin embargo, la secuencia de la UDPGlc PPasa de *N. europaea* aparece trunca hacia el N-terminal. En dicho organismo unicelular la Suc puede estar cumpliendo un rol como fuente de carbono transitoria, como así también como osmoprotector. Bajo este panorama pareciera que la fracción citosólica de ADP-Glc puede pivotar entre la síntesis de glucógeno y la Suc, y esta última a diferencia de lo que ocurre en plantas y cianobacterias puede degradarse como ADP-Glc a partir de ADP; la ADP-Glc así generada podría ser utilizada para sintetizar glucógeno o bien movilizar carbono dentro de la célula.

Summary

In this work we performed the in vitro study of enzymes involved in the glycogen biosynthetic pathways of two bacteria: *Prevotella intermedia* (*chemo-organoheterotroph*) and *Nitrosomonas europaea* (*chemo-litho-autotroph*). For the latter, we also deepened in understanding the sucrose (Suc) metabolism, usually absent in non-photosynthetic prokaryotes. *P. intermedia* is a bacterium belonging to the phylum Bacteroidetes, involved in periodontal diseases. We propose that in *Prevotella spp.* glycogen synthesis could be carried out by a variation of that established for prokaryotes; Glc-1P could be activated as dTDP-Glc through the action of the TDPGlc pyrophosphorylase and next be used as substrate by glycogen synthase to elon-

gate glycogen. Bacteroidetes appears to be a particular phylum with respect to glycogen synthesis in bacteria, and is attractive to perform further analysis to about the origin of this evolutionary variant, as well as, establish molecular targets for pharmacological purpose. *N. europaea*, however, is a facultative chemo-litho-autotrophic organism obtaining energy from the oxidation of ammonia. We constructed a putative metabolic scenario where the fixed-carbon flows to a cytosolic fraction of ADP-Glc, which can pivot between glycogen and Suc synthesis. The disaccharide, unlike what happens in plants and cyanobacteria, can be degraded again to ADP-Glc from ADP, mediated by a particular prokaryotic sucrose synthase. This ADP-Glc can be further used to glycogen synthesis or to carbon mobilization within the cell.

Actividad bacteriostática y bactericida de antibióticos betalactámicos y glucopéptidos frente a cepas de *Staphylococcus aureus* de importancia clínica. Caracterización genotípica de aislamientos tolerantes

Emilce de los Ángeles Méndez

emendez@fbc.unl.edu.ar

Director/codirectora: Dra. Emma Sutich /
Dra. María Cristina Lurá.

Lugar de realización: Santa Fe.

Cátedra: Bacteriología Clínica.

Facultad: Bioquímica y Ciencias Biológicas.

Universidad: Universidad Nacional del Litoral.

Fecha de la defensa: 22/11/2012.

Resumen

El género *Staphylococcus* comprende numerosas especies, presentes en la

mucosa y piel de humanos y de otros mamíferos y aves. Son cocos gram positivos que se presentan aislados o en racimos irregulares. La especie de mayor importancia clínica es *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, denominado *Staphylococcus aureus* (SA). Produce desde infecciones cutáneas localizadas o en tejidos profundos provocando osteomielitis, sepsis y endocarditis. Su historia incluye la evolución de la bacteria y cambios en su impacto clínico debido a diferentes factores de virulencia, mecanismos de defensa y capacidad de generar resistencia a los antimicro-

biano (AM) útiles para su tratamiento. La detección de la sensibilidad AM constituye un desafío para el laboratorio. Los métodos usados son: Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), Concentración Bactericida Mínima (CBM) y estudios de cinética de muerte (CM). Esta tesis se dividió en dos partes: 1) se estudiaron SA meticilino sensibles (SAMS) y, 2) se trabajó con SA meticilino resistentes (SAMR). Los objetivos para la 1ª parte (SAMS) fueron: a) detectar las actividades bacteriostática y bactericida de cefalotina (CEF); b) diferenciar cepas tolerantes según distintos criterios; c) estudiar genotípicamente SAMS tolerantes y d) proponer una metodología sencilla para detectar la CBM de CEF. Se recolectaron 109 aislamientos de SAMS, consecutivos y únicos de muestras obtenidas de pacientes del Hospital J. M. Cullen – Santa Fe. Para determinar la CIM y la CBM de CEF de todos los aislamientos se aplicó el método de macrodilución en caldo según el CLSI. A los aislamientos con $CBM/CIM \geq 8$ se les efectuaron CM, realizando recuentos de colonias a las 0, 3, 6 y 24 horas de incubación a 35 °C. A los 4 aislamientos que resultaron tolerantes por esta metodología, se les determinó la presencia de los genes *mecA*, *hlg* y *pvl*. Las $CIM_{50/90}$ de CEF resultaron 0,5 y 1 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente y las $CBM_{50/90}$ fueron 1 y 8 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Según la relación CBM/CIM , 6 SAMS (5,5 %) fueron tolerantes y CEF resultó bactericida para 84 (77,1 %). Además se detectaron 25 SAMS con CBM/CIM de CEF ≥ 8 y cuatro SA resultaron tolerantes por CM. La bactericidia de CEF según CM fue 99,1 %. Ninguna de las 4 cepas tolerantes por CM, resultó portadora de *mecA*, lo que permitió corroborar que se trataba de SAMS y uno de ellos portó el gen *pvl*. La actividad bac-

tericida de CEF frente a SAMS, mediante la puesta a punto de una técnica sencilla, se realizó con 42 SAMS. Se utilizaron discos de CEF, oxacilina (OXA) y cefoxitina (FOX) inactivados con solución de betalactamasa (SBL) obtenida en el laboratorio. El disco de OXA resultó mejor que CEF y FOX ya que logró discriminar mayor cantidad de aislamientos con CBM/CIM de CEF ≥ 8 .

Los objetivos para la 2ª parte (SAMR) fueron: a) detectar actividades bacteriostática y bactericida de vancomicina (VAN); b) diferenciar cepas tolerantes según distintos criterios; c) investigar el polimorfismo genómico de SAMR tolerantes a VAN; d) comparar, en aislamientos SAMR adquiridos en la comunidad (SAMR-AC), la actividad bactericida de VAN con la portación de la leucocidina de Pantón-Valentine (LPV) y e) estudiar la actividad sinérgica de VAN con ciprofloxacina, gentamicina, rifampicina e imipenem por CM frente a SAMR tolerantes a VAN. Se estudiaron 112 SAMR. Las $CIM_{50/90}$ de VAN resultaron 0,5 y 1 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente y la $CBM_{50/90}$ fueron 1 y 8 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Según la relación CBM/CIM la bactericidia fue del 65,2% y se detectaron 12 (10,7 %) cepas tolerantes. Las CM se efectuaron a 39 SAMR (CBM/CIM de VAN ≥ 8). Para el 96,4 %, VAN resultó bactericida, mientras que 4 aislamientos resultaron tolerantes (3,6 %). El estudio del polimorfismo en los 4 SAMR tolerantes, permitió diferenciarlos en 2 clones: 3 pertenecieron al clon A y el restante al clon B. Se demostró que la bactericidia de VAN en SAMR-AC fue efectiva en el 96% de los aislamientos, independientemente de la presencia LPV, pero las cepas LPV (+) redujeron más lentamente el número de UFC/mL a las 6 horas. Todas las asociaciones fueron sinérgicas, pero VAN + GEN y VAN+ RFA y/o IMI lograron sinergia

a las 6 horas, mientras que VAN+CIPRO se logró a las 24 horas. Se concluye que: CEF y VAN pueden ser utilizadas en el Hospital Dr. J. M. Cullen de Santa Fe, para tratamiento de infecciones por SAMS y SAMR, respectivamente. Se recomienda efectuar CM para detectar actividad bactericida de un AM. VAN resultó bactericida para SAMR-AC, independientemente de la producción de LPV. La combinación de AM para tratar infecciones por SAMR tolerantes a VAN, fueron muy eficaces. La técnica de discos goteados con betalactamasa, preparada en el laboratorio y puesta a punto en esta tesis, resultó fácil y accesible para un laboratorio de microbiología clínica.

Summary

Bacteriostatic and bactericidal activities of betalactams and glycopeptides against S. aureus strains of clinical significance. genotypical characterization of tolerant isolates

Staphylococcus aureus (SA) is an important human pathogen. Tests to study antimicrobial susceptibility are: Minimum Inhibitory Concentration(MIC), Minimum Bactericidal Concentration(MBC) and Time-kill studies(TKS). This thesis analyzed: 1) 109 methicillin-susceptible (MSSA)-(2006-2007) and 2) 112 methicillin-resistant (MRSA)-(2006-2008) from patients attending Cullen Hospital at Santa Fe-Argentina. MSSA: detect cephalotin (CEP) inhibitory and bactericidal activities (BA), distinguish

tolerant strains according to different criteria; analyze *mecA*, *hlg* and *pvl* genes by PCR in tolerant MSSA and propose a simple technique to determine CEPBA. MIC and MBC were studied by broth macrodilution; isolates showing CEPMBC/MIC \geq 8 were studied by TKS. CEPMIC_{50/90} and CEPMBC_{50/90} were 0,5/1 and 1/8 μ g/mL. According MBC/MICratio: 6 tolerant, CEPBA 77,1 %. TKS: 4 tolerant *mecA negative* and CEPBA 99,1 %. By simple methodology using CEP, oxacillin and cefoxitin disks dropped with at-house betalactamase solution, oxacillin resulted the best one. MRSA: detect VAN bacteriostatic and BA, distinguish tolerant strains according different criteria, investigate genomic polymorfism among VAN-tolerant-MRSA, study VANBA against community-acquired-MRSA and its relationship with PVL production, study VAN synergical activity with ciprofloxacin, gentamicin, rifampin and imipenem against VAN-tolerant-MRSA. VANMIC_{50/90} and VANMBC_{50/90} were 0,5/1 and 1/8 μ g/mL. According MBC/MICratio: 12 tolerant, VANBA 65,2 %. TKS: 4 tolerant and VANBA 96,4 %. The four VAN-tolerant-MRSA belonged to 2 clones. VANBA in CA-MRSA was 96 % independently from PVL production but PVL(+) strains reduce more slowly initial inoculum at 6 hours by TKS. All antimicrobial combinations were synergistics. Conclusion: CEP and VAN may continue to be used in Cullen Hospital - Santa Fe - Argentina and VANBA against CA-MRSA was independent from PVL presence.

Tolerancia y eficiencia de *Typha domingensis* Pers. en la retención de metales y nutrientes de efluentes industriales

Mufarrege, María de las Mercedes

Correo electrónico: mmufarrege@fiq.unl.edu.ar

Director / Co-Director: Mainé, María Alejandra/ Hadad, Hernán Ricardo.

Lugar de realización: Santa Fe

Laboratorio, Cátedra y/o Departamento: Cátedra de Química Analítica

Facultad: Facultad de Ingeniería Química.

Universidad: Universidad Nacional del Litoral

Fecha de la defensa: 29/02/2012

Resumen

Se construyó un wetland para tratamiento de efluentes que contienen Cr, Ni, Zn, (efluente industrial), P y N (efluente cloacal), además de elevados pH y salinidad. Después de un período de dominancia de especies flotantes, *T. domingensis* resultó ser la especie dominante por varios años hasta la actualidad tolerando las condiciones del sistema. Por esta razón, en esta tesis se estudió su tolerancia a las condiciones del sistema y su eficiencia en la retención de los contaminantes. En experiencias de invernadero, se evaluó su respuesta al ser expuesta a condiciones extremas de pH y/o salinidad y a diferentes concentraciones de metales. Finalmente, se evaluó la capacidad de biosorber metales de sus hojas secas. Paralelamente, se monitoreó el humedal construido, determinando metales y nutrientes en diferentes órganos vegetales, en los efluentes y en el sedimento de la zona de entrada y de salida, así como también la tolerancia de las plantas a las con-

diciones del sistema. Respecto de la salinidad y el pH, se comprobó que las plantas del humedal construido adquirieron adaptaciones fisiológicas y morfológicas para tolerar elevados valores. Las adaptaciones de las plantas del humedal construido fueron demostradas por una mayor tasa de crecimiento relativo y un incremento en la concentración de clorofila, en comparación con los obtenidos en plantas provenientes de un humedal natural que fueron expuestas a las mismas condiciones. Contrariamente, las plantas del humedal construido mostraron estrés cuando fueron expuestas a condiciones de pH y salinidad que son generalmente encontradas en aguas de humedales naturales. Respecto de la exposición a metales, cuando *T. domingensis* se sometió a concentraciones combinadas de metales se observó que las raíces disminuyeron sus áreas transversales y su número de vasos metaxilemáticos, aumentando estos últimos su área. Cuando *T. domingensis* fue sometida a altas concentraciones de metales, las hojas alcanzaron concentraciones similares a las de raíces, determinándose que esto se debió a que las partes basales de las hojas que estuvieron en contacto directo con la solución sorbieron los metales. En los tratamientos con concentraciones de 500 mg L⁻¹ de metales por separado y de metales combinados se observó una menor remoción en agua, por lo que se concluyó que *T. domingensis* toleró esa concentración de metales debido a que dejó de acumularlos, posiblemente

para evitar que estas condiciones causen daños irreversibles. Por otro lado, las partes sumergidas de las hojas fueron un compartimiento muy eficiente para la acumulación de metales y P, debido a que estos tejidos se encuentran en contacto directo con la solución experimental. Las plantas no toleraron la exposición a 100 mg L^{-1} Ni y 500 mg L^{-1} Ni y la combinación de 500 mg L^{-1} Cr + 500 mg L^{-1} Ni + 500 mg L^{-1} Zn y tampoco a los tratamientos de 600 mg L^{-1} Ni y 600 mg L^{-1} Cr + 600 mg L^{-1} Ni + 600 mg L^{-1} Zn. Además, se realizaron experimentos para evaluar la eficiencia de remoción de metales de agua por hojas secas de *T. domingensis*. La alta eficiencia de remoción de metales alcanzada en soluciones multimetales permitiría proponer que cuando las hojas de *T. domingensis* sean cosechadas durante las operaciones de mantenimiento de un wetland construido, podrían ser utilizadas como un material biosorbente eficiente, dándole una disposición final a estos residuos. Respecto del estudio del humedal construido, se observó que el mismo presentó diferentes etapas de cobertura de *T. domingensis* debido a eventos de depredación por animales herbívoros y a acciones de manejo, aún así, el sistema siempre mostró una buena eficiencia. *T. domingensis* demostró una alta eficiencia en la retención de metales y nutrientes y una elevada tolerancia a las condiciones de los efluentes tratados debido a su capacidad de adaptación.

Summary

Tolerance and efficiency of Typha domingensis Pers. in the retention of metals and nutrients from industrial effluents.

The tolerance and efficiency of *Typha domingensis* in the retention of metals and nutrients from industrial effluents were studied. At greenhouse experiments the responses to extreme conditions to pH and salinity and to different metal concentrations were evaluated. The capacity of metal biosorption by dry leaves was evaluated. Besides, a constructed wetland was monitored by determining metals and nutrients in different plant organs, and in effluents and sediments of the inlet and outlet zones, as well as, the plant tolerance to the conditions of the system was studied. Regarding salinity and pH, it was probed that the plants from the constructed wetland acquired physiological and morphological adaptations to tolerate high values. The adaptations of the plants from the constructed wetland were demonstrated by a higher relative growth rate and an increase in the chlorophyll concentration in comparison with the values obtained in plants from a natural wetland exposed to the same conditions. The high efficiency in metal removal achieved in multimetal solutions would propose that when the leaves of *T. domingensis* are harvested during the maintenance of a constructed wetland, this material could be used as an efficient biosorbent, giving a final disposal of these wastes. Regarding the constructed wetland study, it was observed different stages of *T. domingensis* cover due to predation events by herbivores, even so, the system always showed a good efficiency. *T. domingensis* proved a high efficiency in the nutrient and metal retention and a high tolerance to the conditions of the treated effluents due to its adaptation ability.

Efectos de metales pesados sobre invertebrados bentónicos

Paola Judith Pavé

paolapave@yahoo.com.ar

Director: Dra. Mercedes Rosa Marchese

Co-Director: Dra. María Alejandra Maine

Lugar de realización: Instituto Nacional de Limnología (INALI, CONICET-UNL). Santa Fe, Argentina.

Laboratorio: Bentos

Fecha de la defensa: 04/12/2012

Resumen

La cuenca del río Salado del Norte, en su tramo inferior (provincia de Santa Fe), es receptora de diversos contaminantes como resultado directo o indirecto de las actividades humanas que se desarrollan en la zona. Entre ellos se encuentran los metales pesados, que son vertidos al río por efluentes provenientes principalmente de curtiembres e industrias manufactureras del cuero, las cuales emplean sales de cromo como agente curtiente, o efluentes provenientes de galvanoplastias, naftas, residuos domésticos y agrícolas que contienen Cu, Cr y Pb. Los principales objetivos de esta tesis fueron: (1) Evaluar el grado de perturbación que presenta el río Salado del Norte, determinando cómo la contaminación por metales pesados afecta el ensamble de invertebrados bentónicos y establecer qué especies actúan como mejores indicadores de la salud ambiental. (2) Complementar el estudio de campo con bioensayos para evaluar los efectos del Cr y Cu, sobre distintos puntos finales en macroinvertebrados bentónicos: *Chironomus* gr.

decorus (Diptera, Chironomidae) y *Limnodrilus udekemianus* (Oligochaeta, Naididae). Para el primer objetivo, se realizaron dos muestreos (uno en el período de aguas altas y otro en aguas bajas) en dos zonas: San Justo (SJ, considerada como de referencia) y Esperanza (E, considerada como problema), tanto en el centro del cauce principal, como en su llanura de inundación. La caracterización de cada zona se realizó a través de la medición de los parámetros físicos y químicos, de las concentraciones de metales pesados (Cr, Cu y Pb) en agua y sedimentos de fondo y del análisis de los macroinvertebrados bentónicos. Además se analizaron en humedales del mismo río y alrededores, las concentraciones de metales más abundantes (Cr y Cu) en hepatopáncreas de *Pomacea canaliculata* (Mollusca, Gastropoda), con el fin de evaluar la capacidad de acumulación por parte de dicha especie. En cuanto al segundo objetivo, se eligieron para los bioensayos a *C. gr. decorus* y *L. udekemianus* por ser taxa claves en los ensamble de macroinvertebrados bentónicos de los ambientes analizados y por ser reconocidos mundialmente como organismos test en estudios con sedimentos contaminados. En *C. gr. decorus* se evaluó la capacidad de acumulación del Cu en sus tejidos y por otro lado, las posibles malformaciones en las cápsulas cefálicas y alteraciones del ciclo de vida (sobre el desarrollo larval y emergencia) producidas por el Cu y Cr, en experiencias a escala de microcosmos. En *L. udekemianus* se evaluó el efecto

del Cr sobre la reproducción (escala microcosmos), y se determinó además la capacidad de acumulación y eliminación del Cr por esta especie, a escala de mesocosmos. Los resultados del estudio en el río Salado revelaron que tanto SJ como E presentan altas concentraciones de Cr, Cu y Pb y junto a las variables físicas y químicas analizadas en agua y sedimentos de fondo, diferenciaron claramente el estado de calidad del agua entre el cauce principal y los ambientes de la llanura de inundación de ambas zonas. Por lo tanto, SJ no constituyó una adecuada zona de referencia. Las concentraciones de metales en agua en todas las estaciones analizadas, fueron mayores a los estándares permitidos. En cuanto al análisis de los macroinvertebrados bentónicos, se determinaron diferencias en la composición de los ensambles entre el cauce principal y la llanura de inundación de ambas zonas, presentando mayor simplificación en E, y en el cauce del río de ambas zonas, respecto a los de la llanura. Del resto de los análisis del bentos, solo la relación densidad de oligoquetos *versus* densidad total, y densidad de quironómidos *versus* densidad total, permitió diferenciar a SJ de E. Dichos resultados demostraron que, E tendría peor calidad del agua debido, principalmente, por los oligoquetos. Los resultados del análisis de metales en *P. canaliculata* demostraron que dicha especie respondió como buen acumulador, indicando su utilidad en biomonitoreos de contaminación por Cr y Cu. En los bioensayos con *C. gr. decorus*, se encontró que concentraciones $\geq 0,75 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}$, afectó el desarrollo larval, la emergencia y produjo malformaciones en las cápsulas cefálicas. Estas últimas pueden ser consideradas como un buen indicador de contaminación para biomonitoreos. Mientras que

C. gr. decorus no fue un buen acumulador de Cu en sedimentos contaminados, pero sí lo fue en el medio acuoso. En los bioensayos con *L. udekemianus* y Cr, se demostró que dicho metal afectó negativamente la reproducción y que esta especie tiene la capacidad de acumular el metal, según las concentraciones testeadas, lo que permite considerarla también (al igual que *P. canaliculata*) como un buen bioacumulador en ambientes contaminados por Cr. Los resultados obtenidos en esta tesis, permitieron concluir que el monitoreo conjunto de los metales pesados, parámetros físicos y químicos y de los macroinvertebrados bentónicos permitió reflejar el grado de perturbación antrópica por metales (Cr, Cu y Pb) que presenta la cuenca del río Salado del Norte en los tramos estudiados.

Summary

Heavy metals effects on benthic invertebrates

The general aims of this doctoral thesis were: (1) To evaluate the perturbation degree of Salado del Norte River (Santa Fe, Argentina) determining whether the heavy metal contamination affects the benthic invertebrate assemblages and establish the species that are the best indicators of environmental health. (2) To evaluate the effects of heavy metals (Cr and Cu) on different end points in benthic macroinvertebrates: *Chironomus gr. decorus* (Diptera, Chironomidae) and *Limnodrilus udekemianus* (Oligochaeta, Naididae) in experimental conditions.

For the first objective, two sampling were carried out (in high and low water levels periods) in San Justo (as reference area) and in Esperanza (as disturbed area) areas. The characterization of each area was per-

formed determining physical and chemical variables; concentrations of Cr, Cu and Pb (in water and bottom sediments) and by the benthic macroinvertebrates assemblages. Also, concentrations of Cr and Cu were determined in the pancreas of *Pomacea canalicularata* (Mollusca, Gastropoda) sampled in wetlands associated to the river in order to evaluate its accumulation capacity. In relation to the second objective, the Cr accumulation capacity of *C. gr. decorus* was evaluated and the possible deformities in the head capsules and life cycle alterations produced by Cu and

Cr concentrations were analyzed in experiences at microcosms scale. The effect of Cr on the reproduction of *L. udekemianus* (microcosms scale) was studied and Cr accumulation and elimination capacity was determined at mesocosms scale. In summary, the results obtained in this study demonstrated that simultaneous monitoring of the heavy metal concentrations, chemical and physical parameters and benthic community allowed to reflect the degree of human disturbance by heavy metals concentrations in the sections studied of Salado River North basin.

Diseño, síntesis y evaluación de novedosos ligandos quirales derivados de TADDOL

Jesica Paola Perotti

Correo electrónico: jesiperotti@gmail.com

Director / Co-Director: Dr. Santiago Vaillard/

Prof. Dr. Ricardo J. A. Grau[†]

Lugar de realización: INTEC I - Predio CCT Santa Fe.

Laboratorio, Cátedra y/o Departamento: Laboratorio de Química Fina.

Facultad: Bioquímica y Ciencias Biológicas.

Universidad: Universidad Nacional del Litoral.

Fecha de la defensa: 2 de marzo de 2012.

Resumen

La síntesis asimétrica consiste en la preparación enantioselectiva de moléculas quirales. La quiralidad es una propiedad de simetría de los objetos tridimensionales. Muchos compuestos pueden obtenerse de dos formas diferentes en donde las estructuras moleculares constitucionales son idénticas pero difieren en el ordenamiento tridimensional de los átomos, de tal manera

que son imágenes especulares recíprocas. Estas moléculas que no se pueden superponer, se denominan *quirales* y son *enantiómeros* una de la otra. Los enantiómeros deben considerarse como compuestos químicos diferentes, particularmente para propósitos biológicos. Existen numerosos métodos para preparar un compuesto de forma enantioselectiva, entre los que encontramos a la resolución de mezclas racémicas, el método controlado por sustrato y la síntesis asimétrica. La forma más sofisticada actualmente, consiste en la utilización de catalizadores quirales formados por un metal de transición y un ligando quiral.

El objetivo de esta tesis fue diseñar y preparar ligandos quirales de fósforo derivados de análogos de TADDOL para su uso en la reacción asimétrica de adición conjugada de dietilzinc a sustratos α,β -insaturados. El análogo de TADDOL, el compuesto DIMPTH(OH)₂, posee dos grupos metilos

en el carbinol, y sólo se conoce un caso donde se emplearon derivados de fósforo de esta estructura como ligandos quirales. Además, el comportamiento químico de DIMPTH(OH)₂ es diferente del de TADDOL, por lo que decidimos diseñar y preparar fosfitos, fosfonitos y fosforamiditos derivados de DIMPTH(OH)₂. Asimismo, no se conocen ligandos de fósforo derivados de la estructura rígida *bis*-DIMPTH(OH)₂, por lo que nos propusimos preparar ligandos derivados de ésta. Finalmente se obtuvieron siete ligandos, cuatro de los cuales son derivados de DIMPTH(OH)₂, dos de *bis*-DIMPTH(OH)₂ y uno deriva de TADDOL. Se obtuvo la amina quiral derivada de TADDOL, pero no se lograron ligandos derivados de ella.

Los ligandos nuevos obtenidos fueron evaluados en la reacción de adición conjugada asimétrica de dietilzinc a enonas cíclicas α,β -insaturadas, a enonas acíclicas α,β -insaturadas y a nitroalquenos α,β -insaturados. Se evaluaron los ligandos en la adición de dietilzinc a las enonas 2-ciclohexenona y 2-ciclopentenona, representativas de las enonas α,β -insaturadas cíclicas. Se obtuvieron bajos excesos enantioméricos, excepto con el ligando quiral que posee el sustituyente mentol. Se evaluaron los ligandos obtenidos en la adición de dietilzinc a enonas α,β -insaturadas acíclicas, donde los ligandos demostraron ser más reactivos y selectivos que con las enonas cíclicas. Se evaluaron los ligandos en la adición de dietilzinc a nitroalquenos, aunque no se observaron los resultados esperados con este tipo de sustratos. Los ligandos dieron excesos enantioméricos de bajos a moderados y fueron muy reactivos en casi todos los casos.

Summary

Design, Synthesis And Evaluation Of Novel Chiral Ligands Derived From TADDOL

Enantioselective preparation of chiral molecules is known as asymmetric synthesis. The molecules that can not overlap are called chiral enantiomers and should be considered as different chemical compounds, particularly for biological purposes. Several methods for preparing a compound in an enantioselective way are reported, among which we find asymmetric synthesis. Currently, the most sophisticated form is the use of chiral catalysts consisting of a transition metal and a chiral ligand.

The goal of this thesis was to design and prepare chiral phosphorus ligands derived from TADDOL analogues for their use in the asymmetric conjugate addition reaction of diethylzinc to α,β -unsaturated substrates. There is only one known case where phosphorus derivatives used DIMPTH(OH)₂ as chiral ligands. In addition, the chemical behavior of DIMPTH(OH)₂ is different from TADDOL, so we decided to design and prepare phosphites, phosphonites and phosphoramidites derived from it. Moreover, the phosphorus ligands derived from rigid structure *bis*-DIMPTH(OH)₂ are not known, so we decided to prepare derivatives of this structure. Ligands were evaluated in the addition of diethylzinc to 2-ciclohexenone and 2-pentenone, where low enantiomeric excesses were achieved, except with the chiral ligand derived from menthol. Ligands were assessed in the addition of diethylzinc to α,β -unsaturated acyclic enones being more reactive and selective than with cyclic enones. Finally, ligands obtained were used in the addition of diethylzinc to nitroalkenes. The ligands gave low to moderate enantiomeric excesses and were very reactive in almost all cases.

Estructura y desarrollo de las inflorescencias de especies de *abildgaardia*, *bulbostylis* y *fimbristylis* (cyperaceae, cyperoideae, abildgaardieae)

Andrea Guadalupe Reutemann

Correo electrónico: areutemann@fca.unl.edu.ar

Director / Co-Director: Dr. Abelardo Carlos Vegetti / Dr. Raúl Pozner

Lugar de realización: Esperanza, Santa Fe
Laboratorio, Cátedra y/o Departamento: IAL-CONICET

Facultad: Facultad de Ciencias Agrarias

Universidad: Universidad Nacional del Litoral

Fecha de la defensa: 14/V/2012

Resumen

Abildgaardia, *Bulbostylis* y *Fimbristylis* resultan géneros conflictivos tanto para establecer límites entre y dentro de los mismos, como para hipotetizar acerca de sus relaciones. La elevada simplicidad que presentan sus especies en relación a sus estructuras vegetativas, determina que una reevaluación morfológica detallada de los mismos deba realizarse sobre caracteres reproductivos, siendo las inflorescencias, por su complejidad y variación, estructuras potencialmente valiosas para una sistemática morfológica. La terminología empleada en la caracterización de estos vástagos floríferos ha sido hasta ahora siempre utilizada desde el punto de vista descriptivo, resultando muchas veces ambigua, y no reflejando estructuras homólogas útiles para establecer comparaciones entre taxones. Caracterizaciones de las transformaciones que ocurren durante el desarrollo de dichas estructuras, que contribuyan a una mejor

interpretación de la diversidad morfológica, tampoco han sido llevadas a cabo. Es por esto que en esta obra se lleva a cabo un estudio de la morfología de las inflorescencias, espiguillas y flores de especies de *Abildgaardia*, *Bulbostylis* y *Fimbristylis* desde el punto de vista tipológico y de desarrollo, como forma de contribuir a la sistemática de estos géneros. Los resultados obtenidos apoyan la existencia de una relación más estrecha entre *Abildgaardia* y *Fimbristylis*, respecto a *Bulbostylis*. Entre estos datos se destacan principalmente la presencia exclusiva de producciones profilares en las inflorescencias de *Bulbostylis*, como así también las similitudes observadas entre *Abildgaardia* y *Fimbristylis* en caracteres tales como la forma del MAV, y por ende la filotaxis similar en la región del trofotagma, el desarrollo del estilo y la anatomía de la estilobase.

Summary

Structure and development of the inflorescences in abildgaardia, bulbostylis y fimbristylis (cyperaceae, cyperoideae, abildgaardieae)

Abildgaardia, *Bulbostylis* and *Fimbristylis* are morphologically very similar; their taxonomical circumscription and phylogenetic relationship are hard to discern. Vegetative structures of their species are simple and uniform, and therefore only a re-evaluation of the reproductive structures may help to understand the taxonomical/phylogenetic

relationships based on morphology. Among reproductive characters of *Abildgaardia*, *Bulbostylis* and *Fimbristylis*, the inflorescence is a promising structure for morphological systematics because of its complexity and diversity. However, inflorescences of these genera have been described from a general, descriptive point of view; those descriptions are ambiguous and not useful to establish primary homologies, and consequently taxonomical/phylogenetic relationships. In addition, as developmental studies in other families (i.e. Poaceae) have shown that similar mature inflorescence structures may arise from radically different origins and

viceversa, this PhD research focuses in a detailed analysis of the inflorescence, spikelet and flower structure and development in selected species of *Abildgaardia*, *Bulbostylis* and *Fimbristylis*, looking for a source of new morphological characters to support phylogenetic relationships and taxonomical boundaries among these genera. Results support a closer relationship between *Abildgaardia* and *Fimbristylis*. Among those supporting data are: MAV shape, phyllotaxy of the trophotagma, style development, and anatomy styler base. The production of prophyllar spikelets may be an autapomorphy of *Bulbostylis*.

Desarrollo de Sistemas Inyectables Biodegradables con Formación *in situ* para la Liberación Sostenida de Drogas Veterinarias

Ludmila Noelia Turino

lturino@intec.unl.edu.ar

Director/codirector: Dr. Julio A. Luna; Dr. Ricardo J.A. Grau; Dra. Ma. Inés Cabrera.

Lugar de realización: Laboratorio de Química Fina – INTEC I (UNL – CONICET) – CCT CONICET Santa Fe.

Facultad: Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas.

Universidad: Universidad Nacional del Litoral.

Fecha de la defensa: 27/03/2012.

Resumen

La problemática de la sincronización y control del ciclo estral en vacas de producción lechera fue la base para el estudio de liberación controlada de progesterona a partir de matrices poliméricas precipitadas *In situ*. Esta tecnología se basa en la

administración intramuscular o subcutánea de una emulsión fluida, cuya fase dispersa contiene disuelto el polímero y la droga. Al entrar en contacto con los fluidos fisiológicos, el polímero precipita por intercambio de solventes en forma de microesferas, al conservar la forma de los microglóbulos de la emulsión, y entrapando la droga en su matriz. Esto ocurre gracias a que el polímero, en nuestro caso poli-(lactico-co-glicólico) (PLGA), es insoluble en agua. Si sólo la fase dispersa de la emulsión es inyectada como una solución homogénea, el producto precipitado toma la forma del sitio de inyección, es decir, un implante. Una vez precipitado el sistema, la droga se libera lentamente a través de dos mecanismos principales: difusión de la droga y degradación/erosión del polímero. Las ventajas de

los sistemas formados *In situ* incluyen: su fácil aplicación, la bicompatibilidad y biodegradación del PLGA, por lo tanto, la ausencia de una intervención quirúrgica para remover el material precipitado al término de la liberación, y la posibilidad de controlar los tiempos de liberación/degradación variando las propiedades fisicoquímicas del polímero, entre las más destacadas.

En el Capítulo 1, se realizó una descripción teórica de los aspectos más importantes de la problemática y de los sistemas de liberación controlada estudiados en el presente trabajo de tesis.

En el Capítulo 2, se caracterizó la farmacocinética de la droga a liberar, progesterona, en vacas raza Holando de alta y baja producción lechera con el objeto de conocer los parámetros metabólicos más importantes y su relación con el nivel de producción láctea. También, se realizó un estudio preliminar sobre las diferencias en el metabolismo entre esta raza, Jersey y cruce HolandoxJersey.

En el Capítulo 3, se caracterizaron excipientes comúnmente utilizados en formulaciones de administración parenteral y se realizó una selección de los mismos para conformar emulsiones O/O y O/W. Luego de analizar la distribución de tamaños de microesferas formadas *In vitro*, su morfología y eficiencias de entrapamiento, se determinó que las emulsiones O/W son las más recomendadas para el entrapamiento de progesterona.

En el Capítulo 4, se obtuvieron perfiles de liberación *In vitro* de emulsiones O/W; estos fueron ajustados con modelos de variada complejidad para dilucidar los mecanismos de liberación involucrados en cada formulación. Una emulsión, seleccionada en base a su mayor estabilidad en el tiempo,

fue inyectada intramuscularmente en vacas raza Holando de baja producción lechera, obteniéndose un perfil de liberación *in vivo*. Se evaluó la capacidad de predicción de un modelo de base fisiológica basado en la ecuación de liberación *in vitro* y el metabolismo *in vivo* de la progesterona obtenido en el Capítulo 2.

Finalmente en el Capítulo 5, se caracterizaron implantes formados *In situ*, evaluando su eficiencia de entrapamiento, morfología y perfiles de liberación *in vitro*. Se evaluó la capacidad de ajuste de los perfiles por parte de modelos de base difusivos. Estos permitieron analizar los fenómenos involucrados en la liberación de progesterona a partir de implantes. Dos formulaciones fueron seleccionadas en base a su liberación *in vitro* para ser inyectadas intramuscularmente en vacas. Los resultados fueron comparados con los obtenidos *in vitro* en busca de una correlación.

Summary

Development of Inyectable and Biodegradable in situ Formed Systems for the Controlled Release of Veterinary Drugs

Estrus control in milk producer cows was the platform for the study of progesterone controlled release from *In situ* formed polymeric matrix. This technology is based in the intramuscular or subcutaneous administration of a fluid emulsion, of which disperse phase has the polymer and the drug both dissolved. Once this emulsion makes contact with physiological fluids, it precipitates by the exchange of solvents in the specific form of microspheres, having the drug entrapped in its matrix. This occurs because the polymer poly-(lactic-co-glycolic) acid is insoluble in water. If the disperse phase

of emulsion is only injected as a homogeneous solution, the precipitated product acquires the form of the site of injection; in other words: an implant is formed. In Chapter1, we performed a theoretical description. In Chapter2, we characterized the pharmacokinetics of progesterone in Holstein cows were high and low milk production and Jersey cows and crosses HolandoxJersey. In Chapter3, we selected excipients to form O/O and O/W, determining that the O/W

emulsions are highly recommended for the entrapment of progesterone. In Chapter4, were obtained *in vitro* release profiles of O/W and elucidated the mechanisms of release. Also, we assessed the predictability of *in vivo* profiles of a physiologically based model. In Chapter5, were characterized *in situ* formed implants, evaluating the efficiency of entrapment, morphology and release profiles *in vitro* and *in vivo*.

Cambios en el potencial saludable y la calidad nutricional y sensorial de frutillas mínimamente procesadas como consecuencia de las condiciones de procesamiento, la temperatura y el tiempo de almacenamiento

Franco Van de Velde

fvandevelde@fiq.unl.edu.ar

Director/codirector: Daniel R. Güemes y María E. Pirovani.

Lugar de realización: Instituto de Tecnología de Alimentos.

Laboratorio, Cátedra y/o Departamento: Laboratorio de Conservación de Alimentos II.

Facultad: Facultad de Ingeniería Química.

Universidad: Universidad Nacional del Litoral.

Fecha de la defensa: 12/12/2012.

Resumen

Las frutillas son frutas de amplio consumo popular que representan una fuente relevante de compuestos bioactivos debido a sus altos niveles de vitamina C y compuestos fenólicos, los cuales presentan efectos antioxidantes beneficiosos para el mantenimiento de la salud. La introducción en el mercado de los vegetales mínimamente procesados (VMP), es una forma

de incrementar el consumo de frutas y hortalizas dentro de la población, debido a su atractiva apariencia, sabor, y comodidad para el consumidor. El cortado y lavado del producto vegetal son algunas de las etapas del mínimo procesamiento que podrían modificar el aporte de nutrientes y compuestos bioactivos en los VMP. Sin embargo, los daños producidos por estas operaciones, favorecerían la síntesis de compuestos fenólicos, con un consecuente aumento en la capacidad antioxidante de estos productos. Por otra parte, el lavado-desinfección usando ácido peracético (APA) como sanitizante está siendo promocionado en la industria de los VMP debido a que, a diferencia de los productos clorados, no causa la formación de compuestos halogenados cancerígenos.

El objetivo general de la presente tesis fue el estudio y la optimización de tecnologías de procesamiento y conservación en la ela-

boración de frutillas frescas cortadas, con el fin de evitar pérdidas de compuestos bioactivos, como así también, de aumentar su potencial saludable para brindar al consumidor un producto natural con un posible o ampliado efecto protector sobre su salud.

Se realizó un estudio de los cambios en la calidad nutricional, compuestos bioactivos y calidad microbiológica de frutillas frescas cortadas en cuartos como consecuencia de la operación de lavado–desinfección con APA, variando la concentración del agente activo, el tiempo de exposición y la temperatura de la solución de lavado. Se empleó la Metodología de Superficie de Respuesta, usando un diseño de Box–Behnken de 15 corridas experimentales.

En el diseño de lavado–desinfección N° 1 se lavaron frutillas variedad *Camarosa* en las condiciones: 0 – 80 mg L⁻¹ APA, 4 – 40 °C, y 10 – 60 s; siendo las respuestas estudiadas: porcentajes de retención (% R) de ácido ascórbico (AA), vitamina C (Vit C), antocianinas totales (Ant T), fenoles totales (FT), capacidad antioxidante (CA), sólidos solubles (SS), cambios en la acidez total, pH y parámetros de color. Los resultados indicaron que las variables del proceso y los niveles utilizados en la operación afectaron la retención de AA, lo que pudo cuantificarse con el modelo predictivo obtenido. Ampliando el espacio experimental (0 – 100 mg L⁻¹ APA, 4 – 40 °C, y 10 – 120 s), en el diseño N° 2, el lavado–desinfección se estudió sobre dos cultivares de frutillas (*Camarosa* y *Selva*). En este caso se agregó como respuesta la reducción de microorganismos aerobios mesófilos totales (red FAM). Los % R de AA, Ant T, FT, y CA se vieron afectados por las variables del proceso, principalmente por la concentración de APA y el

tiempo. Al no observarse diferencias entre los cultivares para estos atributos, los resultados se modelaron conjuntamente. Las variables de la operación afectaron el % R Vit C y los cambios de color solo en la variedad *Selva*. Por otra parte, la red FAM fue afectada por las variables del proceso en ambos cultivares de manera diferente y se obtuvieron modelos predictivos para cada uno de ellos.

Una optimización simultánea de las respuestas del diseño n° 2, usando la ecuación deseabilidad de Derringer, permitió encontrar condiciones de lavado en dos escenarios: a) maximizando red FAM con 90 % de retención en los compuestos bioactivos: 100 mg L⁻¹ PAA, 50 s, and 24 °C y b) maximizando la retención de compuestos bioactivos con una aceptable red FAM: 20 mg L⁻¹ APA, 52 s, and 18 °C. Experiencias adicionales de validación demostraron la eficacia de los modelos obtenidos.

Por otra parte se estudió el efecto del corte y la temperatura de almacenamiento de frutillas frescas sobre la retención de AA, ácido deshidroascórbico (ADHA); Vit C, Ant T, FT, CA, SS, pH y parámetros de color. Las frutillas se cortaron como enteras despedunculadas (ED), cortadas en mitades (CM) y cortadas en cuartos (CC), almacenándose a 2, 6, 13 y 20 °C, por un periodo de 15, 10, 8–9 y 2–3 días, respectivamente. La evolución de los atributos ADHA, SS, pH y color en función del tiempo pudo ser modelada con cinéticas de orden cero. La dependencia de las constantes de reacción con la temperatura mostró un buen ajuste con la ecuación de Arrhenius. Las energías de activación para los atributos mostraron una mayor sensibilidad a la temperatura de las frutillas frescas cortadas que las ED. El

efecto del corte provocó la acumulación de compuestos fenólicos en las frutillas frescas cortadas. Los mayores aumentos (23 % del basal) se dieron en las frutillas CC, las de mayor grado de injuria. Por lo tanto, se podrían preparar frutillas frescas CC y conservarse a temperaturas bajas (2 °C), obteniéndose de este modo productos con un potencial bioactivo aumentado.

Summary

Changes in the health potential, nutrition and sensory quality of minimally processed strawberries as result of processing conditions, temperature and storage time

A study of changes in nutritional quality, bioactive compounds and microbiological quality of fresh-cut strawberries into quarters was performed as a consequence of washing-disinfection with peracetic acid (APA) at different concentration, contact times and temperatures. Furthermore, the effect of cutting and storage temperature on strawberries bioactive compounds retention was also studied. Response Surface Methodology was used to study washing-disinfection using a Box-Behnken design in 15 runs. *Camarosa* and *Selva* strawberries were

washed under variable conditions: 0 – 100 mg L⁻¹ APA, 4 – 40 °C, and 10 – 120 s. The responses were: retention percentages of ascorbic acid (AA), vitamin C (Vit C), total anthocyanins (Ant T) and phenols (FT), antioxidant capacity (CA), soluble solids (SS), total acidity, pH, color and microbial count reduction. Simultaneous optimization in two scenarios (OP 1 and OP 2) allowed finding conditions of variables which satisfied different criteria. OP 1 conditions (100 mg L⁻¹ APA, 50 s, and 24 °C) were obtained when microbial reduction was maximized with 90 % bioactive compounds retention. OP 2 conditions (20 mg L⁻¹ APA, 52 s, and 18 °C) were obtained when bioactive compounds retention was maximized with an acceptable microbiological reduction. Confirmatory experiments showed good agreement between experimental results and predicted responses at both optimization scenarios. Otherwise, cutting strawberries experiences into quarters, induced an increase in FT with a consequent increment in their CA; and that increase happened quickly when increasing storage temperature. Therefore, fresh-cut strawberries with an enhanced bioactive potential can be prepared into quarters and stored at low temperatures.

Leptospirosis humana: estudio para la obtención de herramientas de diagnóstico y evaluación de la utilidad del serodiagnóstico en diferentes etapas de la enfermedad

Vanasco Norma Bibiana

bibi-vanasco@hotmail.com

Director/codirector: Héctor Dante Tarabla.

Lugares de realización: Laboratorio de Leptospirosis – FBCB – UNL y Laboratorio Nacional de Referencia de Leptospirosis – INER “Dr. E. Coni” – Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS).

Laboratorio, Cátedra y/o Departamento: Laboratorio de Leptospirosis – FBCB – UNL, Metodología de la Investigación.

Facultad: Bioquímica y Ciencias Biológicas

Universidad: Universidad Nacional del Litoral.

Fecha de la defensa: 14/09/2012.

Resumen

La leptospirosis humana es la zoonosis más ampliamente distribuida en el mundo. Sin embargo, la información publicada sobre las características clínicas y epidemiológicas de la enfermedad en Argentina es muy escasa. Por otra parte, dado que las técnicas diagnósticas de referencia no permiten la detección temprana de casos, es necesario desarrollar y evaluar nuevas pruebas.

Los Objetivos Generales de esta tesis fueron: 1. Desarrollar ELISAs IgG para detectar anticuerpos antileptospiras en muestras de suero humano; 2. Evaluar el error sistemático global y en diferentes etapas de la evolución de la enfermedad y el error aleatorio de los ELISAs desarrollados y de la macroaglutinación (TR); 3. Evaluar

la presentación clínica y epidemiológica de los casos de leptospirosis e identificar factores de riesgo para la adquisición de la enfermedad.

Se obtuvieron 11 antígenos extractivos mediante cultivo y lisado de cepas patrón de *Leptospira interrogans* y *biflexa*. Se realizó un mapeo de epitopes de LipL32 y LipL41 de *L. interrogans serovar Copenhageni*, identificándose dos regiones antigénicas (P1 y P2) en la LipL32. Se diseñaron y obtuvieron dos péptidos sintéticos y tres proteínas recombinantes. Posteriormente se desarrollaron cuatro ELISAs para la detección de anticuerpos IgG en muestras de suero sanguíneo utilizando cuatro antígenos elegidos en base a su capacidad discriminatoria: uno con antígeno extractivo (serovares Pyrogenes y Tarassovi), dos con péptidos sintéticos (P1-ELISA y P2-ELISA) y uno con el recombinante conteniendo la secuencia de ambos péptidos (REC-ELISA). El criterio de definición de casos incluyó los resultados de la Microaglutinación (MAT) y los antecedentes clínicos y de laboratorio general. Los tiempos de evolución se dividieron en tres etapas: 1 (<10 días), 2 (de 10 a 25 días) y 3 (>25 días).

El ELISA desarrollado con antígeno extractivo permitió en la etapa 1 mayor detección de casos que el TR, la MAT y los otros tres ELISAs, haciéndolo desde el cuarto día de evolución de la enfermedad. En la etapa 2 evidenció la mayor sensibili-

dad 95,6 % (89,1; 98,8), especificidad 95,7 % (89,2; 98,8), VPP 95,7 % (89,2; 98,8), VPN 97,7 % (91,9; 99,7) y AUC 0,974 (0,938; 0,992). En la etapa 3 y en la evaluación global mostró mayor AUC 0,943 (0,840; 0,988) que los otros ELISAs y una concordancia excelente entre sus resultados. Estos hallazgos indican que en el caso de seleccionar un solo antígeno, el extractivo sería la mejor opción.

La baja sensibilidad del TR en la primera etapa, su baja especificidad y su variabilidad intra e inter-operador, indicarían que no es conveniente su utilización como única prueba tamiz.

Las AUCs de los cuatro ELISAs fueron mayores en las etapas 2 (de 0,974 a 0,787) y 3 (de 0,943 a 0,818) debido principalmente a la baja sensibilidad en la etapa 1. En coincidencia, el meta-análisis identificó que las pruebas de ELISA presentan mayor eficacia cuando se aplican en individuos en fase convaleciente.

Por lo expuesto, ningún método serológico sería capaz de resolver individual y completamente el diagnóstico en los primeros 9 días de la enfermedad. En esta primera etapa, la RT-PCR fue el método que permitió la mayor detección de casos, seguido del ELISA extractivo. Estos resultados avalan la conclusión de que un método directo, como la RT-PCR, detecta los casos de leptospirosis de forma más temprana que los métodos serológicos. Se concluye entonces en primer lugar, que RT-PCR sería el mejor método para la detección precoz de casos en muestras de hasta seis días de evolución. Luego una combinación de RT-PCR y ELISA extractivo resolvería el problema del diagnóstico en esta etapa en forma global. Finalmente si las mues-

tras son de entre 6 y 9 días de evolución el ELISA extractivo sería la mejor opción.

El serogrupo presumiblemente infectante más frecuente fue Icterohaemorrhagie seguido de Pomona, Ballum y Canicola. La mayoría de los casos ocurrieron en adultos de sexo masculino durante los meses cálidos y lluviosos, con fiebre, dolor de cabeza y mialgia. La inyección conjuntival se manifestó en el 55 % de los casos confirmados y en el 43 % de los No casos. Aunque el trabajo rural continúa siendo un factor de riesgo en Argentina (OR= 3,41; 1,45– 8,06), el contacto prolongado con inundaciones fue el factor más importante (OR= 4,49; 1,17–17,25).

Summary

Human leptospirosis: study to obtain diagnostic tools and assessment of the utility of serodiagnosis in different stages of the disease.

In this work antigenic regions were identified (P1 and P2) in LipL32. Synthetic peptides and recombinant proteins were designed and obtained. Using four of these antigens ELISAs were then developed to detect IgG antibodies in serum samples. Three stages of the disease were considered: 1 (<10 days), 2 (10 to 25 days) and 3 (> 25 days).

In Stage 1, extractive antigen detected more cases than TR, MAT and any of the other three antigens. In Stages 2 and 3 and in overall evaluation extractive antigen showed higher efficacy than the others and an excellent agreement. The low sensitivity of TR in the first stage, its low specificity and high intra and inter operator variability indicate that it is not convenient to use

TR the sole screening test. Meta-analysis identified that ELISAs were most effective when applied to patients in the convalescent phase.

In this initial period, RT-PCR is the best method for early detection of cases in samples taken up to day six of disease evolution. A combination of RT-PCR and extractive ELISA would be a good choice to solve the problem of diagnosis in this first Stage.

The most common presumed infecting serogroup was Icterohaemorrhagiae, followed by Pomona. Most cases occurred in adult males during the warm and rainy season, showing fever, headache and myalgia. Although rural labor remains to be a risk factor in Argentina (OR= 3.41, 1.45; 8.06), prolonged contact with flood was the most important single factor (OR= 4.49, 1.17; 17.25).

Estudio de la expresión de Heat Shock Proteins (HSPs) en el ovario bovino normal y en condiciones patológicas

Melisa María del Luján Velázquez

melisavel@gmail.com

Director/codirectora: Hugo H. Ortega / Natalia R. Salvetti.

Laboratorio, Cátedra y/o Departamento: Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada.

Facultad: Facultad de Ciencias Veterinarias.

Universidad: Universidad Nacional del Litoral.

Fecha de la defensa: 13/03/2012.

Resumen

Los procesos reproductivos, para tener éxito, deben estar en armonía y sincronizados con el medio ambiente. Las condiciones desfavorables como: temperaturas extremas, disminución de los nutrientes, exposición a sustancias nocivas inducen estrés en los organismos y reprimen la reproducción a través de vías hormonales y nerviosas. Se ha demostrado que las altas temperaturas pueden afectar los distintos eventos reproductivos a través de alteraciones en la proliferación y la apoptosis de células ováricas, así como también inducir la hipersecreción de hormonas esteroideas.

Asimismo, se ha identificado al estrés como posible factor etiológico de la enfermedad quística ovárica (COD, del inglés *Cystic Ovarian Disease*) y de hecho se ha encontrado una relación estrecha entre los mecanismos neuroendócrinos de respuesta al estrés, la actividad del sistema simpático y la activación celular de la expresión de HSPs.

La COD se presenta frecuentemente en vacas lecheras de alta producción. Se caracteriza por la presencia de estructuras foliculares de un diámetro mayor al ovulatorio que permanecen en el tiempo ocasionando trastornos en la funcionalidad ovárica. Su manifestación lleva a prolongar el intervalo parto-concepción, provocando grandes pérdidas a la producción pecuaria general.

En el presente estudio, se han descrito y evaluado los niveles proteicos y de ARNm de algunas proteínas de golpe térmico (HSPs) con el objeto de relacionarlos con la foliculogénesis normal y la COD en la especie bovina. Se trabajó con muestras de ovarios de distintas procedencias: animales sometidos a un modelo experimental

de inducción de COD; animales en producción con desarrollo espontáneo de la enfermedad, y muestras obtenidas en frigorífico.

Los resultados de esta tesis y su relación con los reportes de otros autores permitieron arribar a las siguientes conclusiones: 1– Hsp27 y Hsp70, proteínas implicadas en la inhibición de los mecanismos de apoptosis, estuvieron sobreexpresadas en estructuras quísticas espontáneas. Para el caso de Hsp60 los ensayos a partir de ovarios obtenidos en frigorífico permitieron confirmar que la proteína se expresa mayormente en quistes, mientras que su ARNm está elevado en granulosa de folículos antrales medianos confirmando lo hallado previamente por otros autores. Por su parte, la inmunodetección de Hsp90 mostró similitudes a lo encontrado para Hsp70. 2– de Hsp10 se observó que los mayores niveles de mensajeros fueron encontrados en folículos antrales respecto de lo observado en estructuras quísticas; lo que se condice con los hallazgos de otros autores en folículos de humanos y de ratón. Los niveles de ARNm correspondientes a Hsp27, Hsp40 y Hsp70 en granulosa de quistes fueron inferiores a los encontrados en folículos antrales pequeños y medianos; y para el caso de Hsp60, la expresión de su ARNm se correspondió con los elevados niveles proteicos encontrados en quistes espontáneos en células de la teca. Para las isoformas de Hsp90 (α y β) la expresión de mensajeros estuvo disminuida en quistes foliculares provenientes de frigorífico para Hsp90 β mientras que fue notable el aumento de Hsp90 α . 3– Hsp27, Hsp70, Hsp40 podrían estar involucradas en el desbalance de los eventos de proliferación/apoptosis descrito en las estructuras quísticas, inhibiendo a diferentes niveles la muerte celular

programada y favoreciendo de esta manera la persistencia de las mismas. Las isoformas Hsp90 α /Hsp90 β estuvieron en directa relación con los niveles de expresión de los RE α y RE β , lo que denotó su implicancia en la foliculogénesis normal y en alteraciones de la misma. 4– El modelo experimental utilizado permitió el estudio y conocimiento de aspectos difíciles de abordar trabajando con muestras provenientes de animales faenados. La alta variabilidad de dichas muestras y la falta de información en relación a estos animales podrían explicar las diferencias observadas entre el modelo utilizado y los casos espontáneos de los que provinieron estas muestras. El trabajo con animales que desarrollen la enfermedad espontáneamente y de los cuales se conozca la historia podría ayudar a establecer y fijar más variables en relación al estado corporal, balance energético, tratamientos previos, que se relacionen con la patogenia de la enfermedad quística ovárica en el bovino.

Summary

Study of the expression of Heat Shock Proteins in normal bovine ovary and in pathological conditions

Adverse conditions suppress reproduction through stress-related substances. These anomalies induce changes in the expression of numerous genes, including genes encoding Heat Shock Proteins. Stress has been identified as etiological factor of Cystic Ovarian Disease (COD) and recently found a close relationship between the neuroendocrine mechanisms of stress response and HSPs expression. The COD has been defined as the presence of one or more follicular structures in the ovary, with a diameter of at least 20 mm, which persist for more than

10 days in the absence of luteal tissue, interrupting the normal reproductive cycle.

In the present study, we described the ovarian protein and mRNA levels of HSP in order to relate them to normal folliculogenesis and to COD. We worked with animals subjected to an experimental model of induction of COD; dairy cows with spontaneous COD and ovary samples from abattoir.

The protein levels of Hsp27, Hsp60, Hsp70 and Hsp90 were clearly detectable in all stages of follicular development. Levels of Hsp10, Hsp27, Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90 α and Hsp90 β mRNAs showed dif-

ferences related to expression between normal and cystic follicular structures.

The differences between the experimental model and the cyst samples from slaughterhouse, could be explained by the high variability of these samples and the absence of information about these animals. Working with animals that developed the disease spontaneously and the knowledge of the clinical story could help to establish variables such as body condition, energy balance, previous treatments, relating to the pathogenesis of cystic ovarian disease in cattle.

Propiedades ópticas y estructurales del silicio amorfo hidrogenado con diversos grados de cristalinidad

Pablo Andrés Rinaldi.

rpabloa@gmail.com

Director/codirector: Dr. Roberto Koropeccki / Dr. Román Buitrago.

Lugar de realización: INTEC.

Laboratorio, Cátedra o Departamento: Laboratorio de semiconductores.

Facultad: Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas.

Universidad: Universidad Nacional del Litoral.

Fecha de defensa: 09/03/2012.

Resumen

El silicio amorfo hidrogenado (a -Si:H) posee una estructura de tipo "red continua aleatoria" con defectos, que mantiene el orden de corto alcance. La presencia de hidrógeno saturando enlaces colgantes en el a -Si:H reduce la densidad de defectos electrónicos dentro de la banda prohibida del material. A diferencia del silicio cristalino, la pérdida de periodicidad rompe las

reglas de selección, favoreciendo la absorción de fotones en la región infrarroja del espectro. Por este motivo el a -Si:H es útil para la fabricación de celdas fotovoltaicas en película delgada, aunque con la desventaja de la inestabilidad frente a la exposición a la luz (efecto Staebler-Wronski) que produce un decaimiento de la eficiencia en las celdas. La solución planteada aquí es utilizar la mayor velocidad de preparación posible de las películas delgadas, aunque el material presente propiedades optoelectrónicas pobres, y luego proceder a la cristalización buscando un tamaño de grano aceptable y una pequeña influencia por parte de los bordes de grano.

En esta tesis se estudia paso a paso, mediante técnicas de caracterización óptica y estructural, la cristalización del a -Si:H depositado sobre vidrio mediante PECVD (deposición química en fase vapor asistida por plasma). Las técnicas de reflectancia

en UV, rayos X, Raman, y espectrometría fotoacústica (PAS) son usadas para analizar la transición desde el estado amorfo al cristalino usando la técnica de recocido escalonado hasta los 600 °C, este procedimiento conduce a un silicio nanocristalino. Las transmitancias en la región visible e infrarrojo cercano son utilizadas para obtener constantes ópticas y mediante el modelo teórico de Hu et al. se calculó la difusividad térmica del a-Si:H a partir de las señales fotoacústicas en muestras recocidas a temperaturas correspondientes a la máxima efusión de cada hidruro. Se encontró que existe un ascenso en la señal fotoacústica en las muestras recocidas a temperaturas inferiores a 500°C, que representa una transición vítrea, esto es, un descenso abrupto en la capacidad calorífica, que se manifiesta en la difusividad térmica, y a una temperatura crítica de ~425 °C. Esta transición, que no es detectada por las otras técnicas mencionadas, es producida por un reacomodamiento de enlaces Si-H. La conductividad térmica se mantiene constante dado que las temperaturas menores a 500 °C se apartan mucho de las correspondientes a la nucleación y cristalización. Se concluye además que en las medidas de PAS el efecto térmico del sustrato de vidrio es despreciable.

Summary

Optical and structural properties of hydrogenated amorphous silicon with varying degrees of crystallinity

Hydrogenated amorphous silicon (a-Si:H) has a structure with defects favoring

the absorption of photons in the infrared region. For this reason the a-Si:H is useful for the photovoltaic thin film solar cells, but with the disadvantage of instability from exposure to light (Staebler-Wronski effect) that causes a decline in the efficiency of the cells.

The solution proposed in this thesis is a step by step study of the crystallization of a-Si:H is performed by using techniques of optical and structural characterization. The semiconductor is deposited on glass by PECVD (Plasma Assisted Chemical Vapor Deposition). UV reflectance, X-ray, Raman, and photoacoustic spectroscopy (PAS) techniques are used to analyze the transition from amorphous to crystalline state using the technique of stepwise annealing up to 600°C, this procedure leads to nanocrystalline silicon. The thermal diffusivity of a-Si:H has been obtained from the photoacoustic signals in samples annealed at temperatures corresponding to the largest effusion of each hydride. A jump has been observed in the photoacoustic signal for samples annealed at temperatures below 500 °C, which correspond to a glass transition, i.e. a sharp drop in heat capacity, which is manifested in the thermal diffusivity, and a critical temperature ~425 °C. This transition, not detected by the other techniques mentioned, is produced by a rearrangement of Si-H bonds. The thermal conductivity is constant for annealing temperatures lower than 500 °C, far from the corresponding to the nucleation and crystallization temperatures. We conclude that in our photoacoustic experiment, the thermal effect of the glass substrate is negligible.

Silicio cristalino para dispositivos fotovoltaicos

Nicolás Budini

nicolas.budini@ifis.unl.edu.ar / budinense@gmail.com

Director/codirector: Dr. Roberto Delio Arce / Dr. Javier Alejandro Schmidt.

Lugar de realización: Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (UNL-CONICET).

Laboratorio, Cátedra y/o Departamento: Grupo de Física de Semiconductores y Dispositivos Fotovoltaicos.

Facultad: Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas / Facultad de Ingeniería Química.

Universidad: Universidad Nacional del Litoral.

Fecha de la defensa: 09/03/2012.

Resumen

En esta tesis doctoral se exponen los resultados obtenidos durante la investigación desarrollada sobre la cristalización de películas delgadas de silicio amorfo hidrogenado (a-Si:H) con el objetivo de obtener capas de silicio policristalino (pc-Si) aptas para la aplicación a dispositivos fotovoltaicos. Se investigaron diferentes aspectos de la cristalización en fase sólida (SPC) y de la cristalización inducida por níquel (NIC) de a-Si:H intrínseco y dopado, depositado a altas velocidades por deposición química desde la fase vapor asistida por plasma (PECVD), con la finalidad de mejorar la calidad cristalina del material resultante. A lo largo de la investigación se buscó optimizar el proceso de cristalización en función de obtener el mayor tamaño de grano posible. Se encontró que la presencia de hidrógeno durante la cristalización de las películas por

SPC afecta considerablemente al tamaño de grano final, obteniéndose un material nanocristalino con tamaño de grano menor a $1 \mu\text{m}$. Por el contrario, mediante la cristalización por NIC se obtuvieron películas de pc-Si intrínsecas sobre vidrio con alta cristalinidad y con tamaños de grano por encima de los $100 \mu\text{m}$. Se encontró que el dopaje leve con boro (tipo p^-) no afecta al proceso de cristalización ni al tamaño de grano final de las películas, mientras que el dopaje elevado con boro (tipo p^+) o con fósforo (tipo n^+) influye fuertemente en el mecanismo de cristalización en perjuicio de la calidad del material resultante. Se demostró además que mediante el proceso de cristalización por NIC de películas dopadas tipo p , depositadas en estructura p^+/p^- , pueden obtenerse capas policristalinas con tamaños de grano considerable. Estas películas pueden actuar como capas semilla para inducir la cristalización epitaxial en fase sólida de capas de a-Si:H depositadas sobre ellas. De esta manera podrían obtenerse celdas solares policristalinas completas, de estructura vidrio/ $p^+/p^-/n^+$ y gran tamaño de grano. Se investigó también la posibilidad de obtener celdas solares de estructura vidrio/ $n^+/p^-/p^+$, para lo cual se desarrolló un proceso de cristalización epitaxial sobre una capa semilla tipo n^+ . Este proceso involucra el dopaje externo de una película intrínseca previamente cristalizada mediante NIC, de tal manera de subsanar las dificultades que introduce el fósforo en la cristalización. Se mostró también que las condiciones de vacío durante la cristaliza-

ción por NIC de a-Si:H influyen considerablemente en la etapa de nucleación, previa a la cristalización, permitiendo reducir considerablemente el tiempo necesario para lograr la cristalización completa de las películas. Además de esto se observó una disminución del tamaño de grano final que, de todas maneras, sigue siendo relativamente grande ($\sim 30 \mu\text{m}$) y apto para la aplicación de estas películas a dispositivos fotovoltaicos. Se llevaron a cabo simulaciones simples para caracterizar el proceso de cristalización por NIC de a-Si:H, desde el punto de vista de la teoría clásica de cristalización para procesos de nucleación y crecimiento. Los resultados obtenidos durante este trabajo representan una contribución importante al campo de la cristalización de películas de a-Si:H, al conocimiento sobre el proceso de cristalización por NIC para la obtención de películas de pc-Si y a la aplicación de las mismas en dispositivos fotovoltaicos de bajo costo. La principal ventaja del pc-Si radica en que, teóricamente, permitiría lograr eficiencias de conversión de alrededor del 15 % en celdas solares con espesores en el orden de $10 \mu\text{m}$.

Summary

Polycrystalline silicon for photovoltaic devices

This thesis exposes the results obtained during a research on crystallization of hydrogenated amorphous silicon thin films for obtaining polycrystalline films suitable for

photovoltaic devices. Several aspects of the solid phase crystallization (SPC) and nickel induced crystallization (NIC) of intrinsic and doped films, deposited by plasma enhanced chemical vapor deposition, were addressed in order to improve the crystalline quality and the grain size of the resulting material. The presence of hydrogen during SPC was found to considerably affect the grain size, giving sizes below 1 micron. In counterpart, intrinsic polycrystalline films with grain sizes above 100 microns were obtained with the NIC method. Slight boron (p^-) doping levels neither affect the crystallization process nor the final grain size of the films, while high boron (p^+) or phosphorous (n^+) doping levels are detrimental for the resulting material. Starting from a stacked p^+/p^- doped structure, large-grained polycrystalline layers were also obtained. These films can act as seed layers, inducing epitaxial crystallization of amorphous films deposited on top. In this way, complete polycrystalline solar cells with large grains could be obtained. It was demonstrated that vacuum conditions during NIC strongly influence the nucleation stage, and reduce the required time to achieve full crystallization. However, a smaller final grain size is obtained but, anyway, it is still relatively large (30 microns) and suitable for photovoltaic applications. Simple computer simulations were performed to characterize the NIC process, from the viewpoint of classical theory of crystallization involving nucleation and growth phenomena.

Resúmenes Tesis: Maestría en Didáctica de las Ciencias Experimentales

Alfabetización Científica de Personas Adultas Manipuladoras de Alimentos

Omar Ramón Misetich

omisetich@gmail.com

Director/codirector: Oscar Héctor Pliego / Cristina Susana Rodríguez.

Lugar de realización: zona de influencia de la ciudad de Santa Fe.

Facultad: Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas.

Universidad: Universidad Nacional del Litoral.

Fecha de la defensa: 31/10/12.

Resumen

Se informa acerca de un estudio realizado con la participación de seis personas adultas manipuladoras de alimentos.

La investigación comenzó realizando un pre test, en octubre de 2007, para indagar en estas personas sus conocimientos previos conceptuales y procedimentales, y sus actitudes hacia la aplicación de fundamentos científicos.

Luego se planteó una propuesta didáctica para aplicación inmediata de los resultados de la capacitación a su vida diaria y consistió en un cursado total de 18 horas, durante noviembre y diciembre de 2007, distribuidas en 6 semanas, dictando 2 clases semanales de 90 minutos cada una.

En febrero de 2008, se realizó un pos test sobre los mismos ítems consultados en el pre test, pero planteados a casos concretos de la actividad laboral que desempeñan.

Finalmente, de ambos resultados se hizo una comparación de cada ítem, lo cual permitió estimar una mejora en sus conocimientos y actitudes hacia el uso de conceptos científicos.

Los instrumentos, tanto en los pre como en los pos test, fueron cuestionarios de múltiple elección para los contenidos cognitivos y procedimentales, mientras que para evaluar los contenidos actitudinales fueron utilizadas escalas de Likert.

Se considera que la mejora encontrada en estas personas, en cuanto a su formación básica con fundamentos científicos, les permitirá desempeñarse laboralmente con mayor idoneidad y, teniendo en cuenta el impacto que dicha actividad laboral tiene, lo harán con mayor responsabilidad social.

Summary*Scientific literacy of adults food handlers*

It reports a study conducted with the participation of six adults food handlers.

The investigation began in October 2007 with a pre test, in order to inquire in these adults about their previous conceptual and procedural knowledges, and their attitudes toward the application of scientific principles.

After it, a didactic proposal of 18 hours was made in November and December 2007 for immediate application of the results to

the daily life of these persons, that was distributed in 6 weeks, with 2 weekly classes of 90 minutes each.

A post test on the same items consulted in the pre test was made in February 2008, but applied on specific cases of their labor activity.

Finally, a comparison about each item from both results was made, which allowed to estimate an improvement in their knowledges and attitudes toward the use of scientific concepts.

The instruments, both in the pre as in the post test, were multiple choice questionnaires to evaluate their cognitive and procedural contents, while to evaluate attitudinal contents was used Likert scale.

An improvement was found in these persons, in regard to their basic training with scientific principles, which will allow them to work professionally with greater competence and, taking into account the impact that this labor activity has, will allow do so with greater social responsibility.