

Resúmenes Tesis: Doctor en Ciencias Biológicas

Formación *in situ* de plataforma biodegradable para la liberación de drogas

Sonia Boimvaser

soniaboimvaser@gmail.com

Director / Co-Director: Dr. Julio A. Luna; Dr. Santiago E. Vaillard; † Dr. Ricardo J.A. Grau; † Dra. Ma. Inés Cabrera

Lugar de realización: Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química. INTEC (CONICET-UNL). Laboratorio de Química Fina. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral.

Fecha de la defensa: 21/03/2014

Resumen

La tecnología de solidificación *in situ* a base de polímeros biodegradables en el desarrollo de dispositivos de liberación controlada de drogas (LCD) ha atraído un especial interés en el campo biomédico, ya que permite la colocación de dispositivos sólidos liberadores sin la necesidad de la realización de una cirugía, y sin la necesidad de extraer el dispositivo luego de la terapia. Dirigir la droga a su sitio de acción y liberarla de manera controlada, asegura un efecto farmacológico óptimo y al mismo tiempo, una disminución en los efectos adversos de la droga. En terapias contra el cáncer, esto tiene especial sentido, dado que las drogas antitumorogénicas ejercen su efecto carcinostático tanto sobre una célula tumoral como sobre una célula sana. Las terapias de LCD contra el cáncer pueden ser intratumorales, como implantes intratumorales, ó locorregionales, tales como implantes for-

mados en la región que contiene al tumor, en la zona de tejido conectivo que lo rodea, o directamente como un émbolo en las arterias que lo irrigan (quimioembolización). El desarrollo de dispositivos para este último tratamiento pero sin carga de droga (embolización) también es de interés, dado que la oclusión de la arteria genera isquemia y muerte de las células tumorales irrigadas por el vaso ocluido. Que el material embolizante sea degradable, y conocer los tiempos de recanalización de las vías embolizadas es de especial interés para la repetición de la terapia.

El polímero biodegradable utilizado en este trabajo de tesis, polímero de ácido poli(láctico-coalicólico) (PLGA), es uno de los polímeros más comúnmente utilizados en la tecnología de formación *in situ* de implantes, por su alta biocompatibilidad y nula toxicidad.

En la presente tesis, se resolvieron los siguientes puntos: **1)** Se definió un rango de viscosidades aceptable para soluciones poliméricas inyectables, teniendo en cuenta el posible uso de estas formulaciones a través de catéteres. A partir de este rango se seleccionaron cuatro formulaciones de estudio (F1-4) a base de PLGA y solventes biocompatibles dimetilsulfóxido, 2-pirrolidona y triacetina. Se investigaron los perfiles de liberación de los solventes, como una medida de la velocidad de precipitación de estas formulaciones. **2)** Se estudió la degradación/erosión de F1-4 en un modelo in

vitro, monitoreando y manteniendo el pH del medio en 7,4. Se investigaron los perfiles de pH del medio; el contenido de solvente remanente en los implantes; los perfiles de pérdida de masa, como medida de la erosión de las matrices; los perfiles de fracción de agua, como medida del hinchamiento de las matrices; los perfiles de distribución de distribución de peso molecular (DPM), peso molecular promedio en peso (M_w), peso molecular promedio en número (M_n) e índice de polidispersidad (I_p), como medida del proceso de degradación; los perfiles de liberación de los monómeros de ácido láctico y ácido glicólico, para estudiar donde ocurría preferentemente la hidrólisis de las cadenas. Por último, se estudió la morfología de estos implantes, y su evolución a lo largo del ensayo de degradación. **3)** Se estudió la degradación/erosión de F1-4 en la subcutis de ratas como un modelo in vivo de degradación. Se investigó el contenido de solvente remanente en los implantes, los perfiles de pérdida de masa, la fracción de agua, y los perfiles de DPM, M_w , M_n e I_p . Por último, se estudió la morfología de estos implantes, y su evolución a lo largo del ensayo de degradación, y se realizó la comparación morfométrica de uno de los implantes degradados in vivo respecto a su par degradado in vitro. **4)** Se profundizó el estudio de la degradación de uno de los implantes que presentó una estructura del tipo centro/coraza, típica de una degradación heterogénea. Se utilizó para esto, un modelo sin problemas difusionales a base de microesferas, degradado en dos medios diferentes: i) en un medio a pH no regulado, para imitar lo que ocurre en el centro del implante, y ii) en un medio estrictamente regulado a pH fisiológico, para imitar lo que ocurre en la superficie del implante. En todos

los experimentos, los perfiles de DPM, M_w , y de masa remanente de los sistemas poliméricos se utilizaron como medida de los procesos de degradación/erosión a lo largo del tiempo, y sirvieron para proponer un modelo simple del mecanismo de degradación. **5)** Se estudiaron los perfiles de liberación de paclitaxel de F1-4, utilizando dos cargas de drogas diferentes en las formulaciones: 10 y 40% p/p en base PLGA. Se seleccionó el medio de liberación para los ensayos, se determinó el entrapamiento y la eficiencia de entrapamiento del fármaco, y se analizaron las áreas ocupadas por dichos implantes, como una medida de su erosión. **6)** Se estudió la biocompatibilidad de los implantes F1-4 en la subcutis de ratas. Luego, se escogió una de las formulaciones para estudiar la vía endovascular. Primero, se evaluó la respuesta del sistema solvente que compone dicha formulación en arteria femoral de cerdos. Luego, el mismo modelo arterial se ocluyó para estudiar la recanalización de la vía y la respuesta inflamatoria. Finalmente se llevó a cabo un protocolo de embolización en riñón de conejo, donde se estudió la penetrabilidad de la formulación.

Summary

Biodegradable in situ forming platform for drug release.

The thesis proposes the development of a novel injectable biodegradable system for controlled drug release for use in cancer therapy. For this purpose, formulations which precipitate *in situ* were used to form an implant for direct injection into the tumor (intratumoral therapy) or for endovascular injection for use in chemoembolization techniques (locoregional therapies). *In situ* forming implant technology consists on the precipitation of a polymer formulation

upon contact with a physiological medium. The polymer used was poly(D,L-lactide-co-glycolide), one of the most commonly used biodegradable polymers in the *in situ* depot-forming technology, because its high biocompatibility and null toxicity.

The developed formulations allowed: i) the formation of a biocompatible implant by complete precipitation of the polymer, using

polymer concentrations and solvent systems that gave the most properly viscosities and implant precipitation rates; ii) good entrapment, encapsulation efficiency and release profiles of a chemotherapeutic drug from the polymer matrix, and iii) the gradual *in vitro* and *in vivo* degradation of the matrix in a period of 1 to 2 months.

Compuestos naturales y sintéticos que modulen la actividad biológica de los interferones de tipo I: análisis mediante una nueva herramienta biológica

María de los Milagros Bürgi

mburgi@fbc.unl.edu.ar

Director: Dr. Ricardo Bertoldo Kratje

Co-Director: Dra. Mariela Bollati Fogolín

Lugar de realización: Laboratorio de Cultivos Celulares. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral.

Fecha de la defensa: 05/03/2014

Resumen

Los interferones (IFNs) constituyen una familia de glicoproteínas especie-específica que cumplen un rol muy importante en la primera barrera de defensa del organismo contra las infecciones virales. Estas proteínas son producidas por cada individuo para actuar en forma local y tienen actividad antiviral, antiproliferativa, antitumoral e inmunomoduladora. Son ampliamente utilizados como biofármacos para el tratamiento de diversas patologías, administrándolos de forma exógena. Es por esto que su potencia debe ser correctamente valorada. Habitualmente, la actividad biológica de dichas moléculas se cuantifica mediante un bioensayo,

basado en la capacidad de los IFNs para inducir un estado antiviral en las células *target*, frente a la infección viral con el virus de la estomatitis vesicular (VSV). Sin embargo, este tipo de ensayos presentan grandes variaciones intra- e inter-ensayos y requieren del empleo y manipulación de virus.

En el presente trabajo de tesis se generó un ensayo de gen reportero (EGR) basado en líneas celulares reporteras Mx2/EGFP para determinar la actividad de los hIFNs-I. Cuatro líneas celulares provenientes de diferentes linajes celulares (WISH, A549, HeLa y HEp-2) fueron transfectadas en forma estable con el plásmido pMx2/EGFP. Este vector contiene el gen de la proteína reportera de fluorescencia verde (GFP) bajo el control del promotor Mx2, inducible específicamente por IFNs-I. De esta forma, cuando el IFN se une a sus receptores en la superficie celular, se desencadena una cascada de señalización/activación que concluye con la activación del promotor Mx2 en el núcleo. Como resultado, se expresa la EGFP que es cuantificada mediante citometría de flujo. De esta forma, el porcentaje de células verdes

positivas se correlaciona directamente con la cantidad de IFN presente en la muestra.

Este ensayo presenta la ventaja de emplear líneas celulares frecuentemente utilizadas para determinar la potencia de los hIFNs, tal es el caso de la línea WISH, simultáneamente con el uso de un gen reportero muy sensible, el EGFP. Además, cuenta con numerosas ventajas comparado con el ensayo de actividad antiviral y otros ensayos de genes reporteros, ya que es capaz de determinar la potencia de hIFN- α y hIFN- β usando una única línea celular, obteniendo la máxima expresión de EGFP a las 24 h. Debido a la especificidad del promotor Mx2, sólo se observa expresión de la proteína reportera sobre aquellas células tratadas con hIFNs-I. Es un ensayo sensible y representa una alternativa segura al ser comparado con los ensayos antivirales convencionales. Presenta coeficientes de variación (CV) intra- e inter-ensayos inferiores al 20%, demostrando su buena reproducibilidad. En conclusión, se ha logrado desarrollar un ensayo reportero alternativo para el análisis de los hIFNs-I, cuya *performance* lo convierte en un candidato adecuado para reemplazar o complementar los bioensayos habituales.

Si bien los hIFNs-I son ampliamente utilizados como biofármacos, éstos son rápidamente depurados del organismo, lo que implica el uso de elevadas y reiteradas dosis. Asimismo, se han registrado efectos secundarios adversos en algunos tratamientos, que en muchos casos conducen a la interrupción de los mismos. Por otra parte, se ha indicado la existencia de patologías en las cuales se observa una liberación excesiva de IFN endógeno, generando efectos nocivos para el organismo. Como consecuencia, el IFN se presenta como una molécula central cuyo accionar debe regu-

larse para evitar los inconvenientes clínicos mencionados. En este sentido, es indispensable incrementar su eficacia terapéutica en aquel grupo de patologías que requieran de su administración exógena y, por otro lado, bloquear sus efectos nocivos en aquel conjunto de enfermedades en las que la producción de IFN endógeno constituye parte de la etiología o curso de las mismas. En consecuencia, se ha propuesto la identificación y caracterización de nuevas moléculas, que actúen en forma sinérgica o antagónica con la actividad de los IFNs-I.

El monitoreo del efecto de diferentes compuestos sobre la actividad biológica de los IFNs requiere de métodos versátiles, sencillos, robustos y que contribuyan con una elevada velocidad de procesamiento. Por lo tanto, contar con un ensayo biológico basado en una línea celular que responda a hIFNs-I y que exhiba tales características es trascendental para el cumplimiento del objetivo propuesto. Con ese fin, en una segunda etapa de este trabajo de tesis, se emplearon las líneas celulares reporteras para monitorear 552 compuestos provenientes de bibliotecas de compuestos naturales y sintéticos, en presencia de rhIFN- α 2a o rhIFN- β 1a mediante el ensayo de gen reportero desarrollado. Utilizando este sistema pudieron identificarse 20 compuestos sintéticos inhibidores de la actividad de los hIFNs-I y 5 compuestos naturales, 4 de ellos inhibidores y 1 potenciador de los hIFNs-I. Todos ellos fueron estudiados con el fin de validar el nuevo ensayo.

En conclusión, en este trabajo de tesis se logró desarrollar 4 líneas celulares reporteras capaces de cuantificar la actividad de los hIFNs-I, que fueron posteriormente utilizadas como herramientas biológicas para monitorear bibliotecas de compuestos sin-

téticos y naturales como posibles moduladores de la actividad de los hIFN-I.

Summary

Natural and synthetic compounds that module the biological activity of human type I interferons: analysis using a new biological tool.

Interferons are important glycoprotein from the immune system, widely used as biopharmaceuticals for some pathology treatments. In this work, a new reporter gene assay was developed using Mx2/EGFP reporter cell lines to determine the hIFNs-I potency. Therefore, the expressed EGFP is quantified by flow cytometry. The positive green cells percentage is directly correlated with the IFN quantity in the sample.

Thus, IFN is presented as a central molecule whose activity must be regulated. In this way, it is essential to increase its therapeutic efficacy in those pathologies where exogenous IFN administration is necessary and, on the other hand, to block its harmful effect on those illnesses where the endogenous IFN production constitutes a part

of etiology. Consequently, it has been proposed the identification and characterization of new molecules that act synergistically or antagonistically as regards IFNs-I activity.

In the second stage of this thesis, reporter cell lines were employed to screen 552 compounds from natural and synthetic libraries. They were analyzed in presence of rhIFN-alpha2a and rhIFN-beta1a using the reporter gene assay previously developed. This system allowed the identification of 20 synthetic compounds that inhibit the hIFNs-I activity and 5 natural compounds, 4 of them are inhibitors and 1 of them is an enhancer of hIFNs-I activity. All of them were analyzed with the purpose of validating our new reporter gene assay.

Finally, in this work 4 reporter cell lines, capable of quantifying the IFNs-I activity were achieved. They were used as biological tools to screen natural and synthetic libraries compounds, possible modulators of hIFN-I activity.

Estudio de la utilidad de las proteínas P22, P30 y P35 de *Toxoplasma gondii* para el diagnóstico de fase aguda de la toxoplasmosis

Juan Gabriel Costa

jcosta@fbcb.unl.edu.ar

Director: Iván Sergio Marcipar. Co-Director: Claudia Marina Lagier

Lugar de realización: Laboratorio de Tecnología Inmunológica. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral.

Fecha de defensa: 09/09/2014

Resumen

La toxoplasmosis es una infección causada por el protozoo *Toxoplasma gondii* y afecta a todos los animales de sangre caliente. Este parásito rara vez produce una infección sintomática en el hombre; pero puede generar complicaciones (a través de una infección congénita) en niños en gestación, que pueden ser desde afecciones en el cerebro o el tejido ocular hasta aborto del feto.

La infección en la mujer embarazada inicia con la fase aguda y luego de unos meses transita hacia la fase crónica. Pero solamente en la fase aguda el parásito puede infectar al feto. Por lo tanto, es esencial que las mujeres prevengan infecciones durante el embarazo.

Existen tratamientos para las embarazadas infectadas que permiten disminuir la probabilidad de transmisión al feto y el daño que pueda surgir en el caso de la infección transplacentaria. Sin embargo, estas terapias pueden ser teratogénicas y/o generar intolerancia para la mujer. Por tal razón, es de vital importancia administrar este tratamiento solamente en casos de infección aguda. En consecuencia, es necesario un diagnóstico confiable de esta fase en la embarazada.

En esta investigación se estudió la utilidad de las proteínas P22, P30 y P35 de *T. gondii* para su posterior uso como antígenos (Ags) en técnicas de inmunodiagnóstico. Para ello, se seleccionaron y clonaron diferentes regiones de sus secuencias y posteriormente se evaluaron mediante ELISA para detección de anticuerpos IgM, IgG e IgA, ELISA de avididad para IgG y dot blot para detectar IgG. Se emplearon sueros de individuos no infectados por *T. gondii* (SIN), con infección crónica (SIC) y con infección aguda (SIA). Por último, se realizó un análisis bioinformático de los Ags en estudio para complementar y explicar los resultados experimentales.

Se analizaron dos secuencias de P22, P22c y P22L, diferenciándose entre ambas en que sólo P22L tuvo el péptido señal y la región carboxi terminal. La adición de estos dos péptidos desencadenó la formación de cuerpos de inclusión, contrariamente a

lo ocurrido con P22c que se expresó soluble. Aunque P22L pudo solubilizarse por procedimientos posteriores, probablemente no adquirió su conformación nativa. En efecto, P22c presentó marcadamente siempre mejores resultados que P22L. Hay que destacar que P22c fue el mejor de todos los Ags ensayados en esta tesis para diferenciar SIP (combinación de SIA y SIC) de SIN mediante la detección de IgG, utilizando ELISA indirecto (área bajo la curva ROC: 0,82). Cuando se evaluó la avididad de los anticuerpos utilizando este Ag para diferenciar SIA de SIC, los resultados obtenidos también fueron muy prometedores (área bajo la curva ROC: 0,82).

En el caso de la proteína de membrana P30, se evaluaron dos secuencias con diferentes extensiones; P30c y P30L. Se utilizaron plásmidos diferentes para la expresión de ambas, siendo éstos a su vez distintos al empleado por Nigro y col. para P30c (Nigro y col., 2003). A pesar de la introducción de estos cambios, no se obtuvo una mejora significativa en relación a los resultados descriptos en la bibliografía. Los mejores resultados se lograron detectando IgA para diferenciar SIP de SIN usando P30c (área bajo la curva ROC: 0,65). Aun así, la aptitud de este Ag fue poco satisfactoria. La hipótesis propuesta fue que los Ags no lograron obtener su conformación nativa.

Para el análisis de P35, se dividió la secuencia codificante en 5 regiones superpuestas. Éstas fueron clonadas, así como la secuencia completa del Ag. Pero sólo se consiguieron expresar con éxito dos fragmentos de la región N terminal de la proteína, P35A y P35B. De todos los antígenos ensayados en este trabajo, P35B presentó los mejores resultados para discriminar

entre SIA y SIC, valorando anticuerpos IgG por ELISA indirecto o midiendo la avididad (áreas bajo la curvas ROC: 0,85 y 1, respectivamente). Además, se desarrolló con la misma un dot blot semicuantitativo (área bajo la curva ROC con P35B: 0,75), nueva metodología propuesta para el diagnóstico.

Finalmente, utilizando herramientas *in silico* se desarrolló un análisis siguiendo principalmente tres etapas: análisis de secuencias, modelado molecular y predicción de epítopes. En P22c se encontraron tres regiones antigénicas que explican el buen desempeño de este Ag. Además, se encontraron secuencias antigénicas en P22L que no están presentes en P22c y que explicarían la alta reactividad inespecífica evidenciada en P22L. En relación con P30, se identificaron 2 regiones antigénicas, una de ellas ubicada en la región en la que se diferencian las secuencias. Por último, en el estudio bioinformático de P35 se encontraron regiones antigénicas importantes en las regiones expresables, principalmente en P35B, explicando los resultados experimentales.

Como conclusión general, nuestros resultados indican que P35B y P22c son antígenos muy promisorios para integrar kits para diagnosticar la fase aguda de toxoplasmosis.

Summary

Study of the utility of P22, P30 and P35 proteins of Toxoplasma gondii for acute toxoplasmosis diagnosis.

Congenital toxoplasmosis is the second most common transplacental infection. Moreover, when it happens, there are high chances of health damage in the future child. But congenital toxoplasmosis is possible only when the mother has acute phase of infection. And although there are treatments to prevent the parasite reaches the unborn, they are dangerous. Therefore, they should not be used unless full assurance that the woman is in the acute phase of infection.

In this work, different regions of the P22, P30 and P35 proteins (specific acute phase) of the parasite *Toxoplasma gondii* were evaluated, as recombinant antigens in clinical diagnostic assays to differentiate stages of infection.

Different regions separately were tested in indirect ELISAs detecting antibodies specific IgG, IgA and IgM; in avidity assay; in dot blot and semiquantitative dot blot. Furthermore, a study of the proteins was performed using bioinformatics. By which it was possible to explain the different results of experimental trials, mainly placing antigenic regions of proteins. Regarding the detection of toxoplasmosis acute phase, significant results were obtained using antigenic sequences called P22c and P35B; with detection of IgG by ELISA and avidity assay. Even it was reached a sensitivity and specificity of 100% measuring antibody avidity against P35B.

Tramas tróficas y régimen hidrosedimentológico en el valle de inundación del río Paraná medio: el cangrejo *Trichodactylus borellianus* como modelo de estudio

Débora de Azevedo Carvalho

dazevedo@inali.unl.edu.ar

Director / Co-Director: Pablo Agustín Collins

Lugar de realización: Instituto Nacional de Limnología. Laboratorio de Macrocrustáceos. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral.

Fecha de la defensa: 18/03/2014

Resumen

Trichodactylus borellianus pertenece a la única familia de cangrejos de agua dulce que habita las planicies de inundación de Sudamérica y es parte de la comunidad litoral-bentónica. El objetivo de la presente tesis es analizar la variación en la composición de la dieta de *T. borellianus*, en la oferta trófica y en la presencia de depredadores en una escala espacio-temporal para luego estudiar las tramas tróficas desde el punto de vista de esta especie. Sin embargo, otras indagaciones surgieron durante este estudio como aquellas relacionadas a cuestiones poblacionales, comportamentales y morfológicas que están implícitamente involucradas en la comprensión de la ecología trófica de esta especie y su relación con el régimen hidrosedimentológico.

En el capítulo 1 se aplicaron tres métodos de marca-recaptura (Petersen, Schnabel y Schumacher-Eschmeyer) en un estudio preliminar para estimar el tamaño poblacional del cangrejo *T. borellianus* obteniendo información que apoye el uso de estos métodos en el campo. El estimador Schnabel fue el más preciso en ambos estudios (preliminar

y en campo). A pesar de que el estimador Schumacher-Eschmeyer también presentó resultados precisos en campo, en este se necesita más días de recaptura para que las estimaciones precisas. La aplicación de estos métodos debe realizarse a corto plazo y durante el período de bajante o estiaje asegurando los supuestos de población cerrada.

En el capítulo 2 se analizó la actividad trófica diaria del cangrejo *T. borellianus* en condiciones experimentales y en campo durante un período de estiaje excepcional en verano. Los muestreos fueron realizados cada cuatro horas durante tres días incluyendo momentos crepusculares. El ritmo trófico fue bimodal con máximos de actividad al medio día y a la media noche observados en los adultos, mientras que los juveniles mostraron una asincronía de la actividad. Los cangrejos en el mesocosmos no mostraron un patrón cíclico definido. Las respuestas a señales no fóticas pueden ser el resultado del "trade-off" entre la búsqueda del alimento en el momento óptimo y el desplazamiento del ritmo hacia momentos del día con menor riesgo de depredación y competencia. La asincronía de la actividad trófica observada en los juveniles puede ser una estrategia que les permite convivir junto a los adultos.

En el capítulo 3 se describió la morfología de los osículos del molinillo gástrico de *T. borellianus* analizando aquellas estructuras involucradas en la digestión del alimento de origen animal y vegetal. Los osículos zigo-

cardíacos (OZ), que soportan los dientes laterales, y el osículo urocardíaco (OU), que soporta el diente medio, son las principales estructuras involucradas en la maceración del alimento. Las protuberancias ventrales de los dientes laterales se encajan ayudando a mezclar el contenido de la cámara cardíaca y fragmentan el material vegetal. La cavidad de los dientes laterales se alinea con las cúspides laterales del diente medio, sirviendo como un mortero del tejido animal. De acuerdo a estas observaciones, *T. borellianus* posee rasgos morfológicos necesarios en el procesamiento tanto de material animal como vegetal, reflejando una dieta omnívora.

En el capítulo 4 se muestran los resultados de los análisis de la dieta natural de *T. borellianus*, la composición de la oferta trófica, caracterizada por las comunidades bentónicas, pleustónicas y zooplanctónicas y la caracterización de los posibles depredadores de este cangrejo. Cada uno de los muestreos correspondió a un momento del régimen hidrosedimentológico y en dos lagunas con diferentes grados de conexión al cauce principal y tiempo de permanencia del agua. También se realizaron muestreos de peces y observación de aves y mamíferos. *T. borellianus* es un cangrejo omnívoro y oportunista no siendo identificadas variaciones espacio-temporales en la dieta. Su principal depredador fue el bagre amarillo, *Pimelodus maculatus*, durante la fase de bajante.

Finalmente en el capítulo 5, se construyeron redes tróficas topológicas (más de dos niveles tróficos, datos empíricos y bibliográficos) y bipartidas (dos niveles tróficos, sólo datos empíricos) con el fin de estudiar las interacciones tróficas a las cuales *T. borellianus* participa en distintos momentos del régimen hidrosedimentológico en dos lagu-

nas diferentes (escala espacio-temporal), con los paquetes foodweb y bipartite del programa estadístico R, respectivamente. Tanto en las redes topológicas como en las bipartidas no se observó variaciones en el espacio y en el tiempo. Sin embargo, descriptivamente se observó el aumento de las interacciones tróficas, fracción de omnivoría y canibalismo durante la bajante del agua.

Summary

Food webs and hydrosedimentologic regime in the middle Paraná River floodplain: the crab Trichodactylus borellianus as a study model.

The hydrosedimentological regime exerts a structuring force in aquatic communities promoting changes in the natural diet, food availability, predators presence and, consequently, food webs. I wrote this thesis in five chapters, addressing ecological aspects of a freshwater crab, *Trichodactylus borellianus*, with the main objective of understanding the role of this crab in food webs of the middle Paraná River. Firstly, I evaluated methods of population estimation using mark-recapture methods. I concluded that the Schnabel estimator is efficient for the characteristics of the species and the environment. In chapter 2, I studied the diel rhythm of feeding activity observing that *T. borellianus* adults show a higher degree of stomach fullness in summer at midday and midnight. The third section discusses the study of functional morphology of the gastric mill showing that morphological traits are coincident with the natural diet of this crab. In chapter 4, I studied the natural diet of *T. borellianus* with respect the food availability and potential vertebrate predators throughout the hydric cycle and two lakes with different types of connectivity to the flu-

vial system. The data obtained were applied in a food webs analysis in Chapter 5, where I used the information gathered in chapter 4 for the construction of topological networks (empirical data + literature data) and bipar-

tite network (empirical data only). The diet of *T. borellianus* and food webs attributes were not variables in space and time but I observed an increase in the trophic interactions during the transition phase of the river.

Caracterización estructural de la interacción de ligandos con la ADP-glucosa pirofosforilasa

María Cecilia Esper

mesper@fbc.unl.edu.ar

Director: Alberto Álvaro Iglesias

Co-Director: Mabel Cristina Aleanzi

Lugar de realización: Laboratorio de Enzimología Molecular. Instituto de Agrobiotecnología del Litoral. Cátedra de Bioquímica Básica de Macromoléculas. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral.

Fecha de defensa: 29/05/2014

Resumen

El principal paso regulador en la síntesis de glucógeno en bacterias y de almidón en plantas corresponde a la formación de ADP-Glc, reacción catalizada por la enzima ADP-Glc PPasa a partir de Glc-1P y ATP y que requiere como cofactor esencial un ión metálico divalente, preferentemente Mg^{2+} . La mayoría de las ADP-Glc PPasas bacterianas y de plantas caracterizadas hasta el momento están reguladas alostéricamente por moduladores que comparten la característica de ser intermediarios de la ruta principal de asimilación del carbono en la célula considerada.

El objetivo principal de esta tesis es conocer el mecanismo molecular de la regulación alostérica de las ADP-Glc PPasas y ampliar el conocimiento de las interrelaciones entre los distintos efectores. Las

enzimas estudiadas fueron las de *E. coli* y *A. tumefaciens*.

En relación a los mecanismos moleculares y los residuos implicados en la activación de la enzima de *E. coli* surgió una hipótesis de trabajo a partir de resultados obtenidos con una mutante de inserción que mostraron, como cambio fundamental, la insensibilidad a la activación por FBP. La secuencia de inserción se localizó en un *loop* adyacente a otros dos *loops* que contienen los residuos conservados Gln⁷⁴ y Trp¹¹³, respectivamente. El comportamiento de las enzimas mutantes sitio dirigidas correspondientes, Q74A y W113A, fue similar, ya que mostraron una falta de sensibilidad tanto a la activación por FBP como al efecto inhibitorio que ejerce el AMP en presencia de este activador. Los resultados obtenidos por electroforesis capilar de afinidad mostraron que la ausencia de activación no se debe a fallas en la unión, ya que las enzimas mutantes unen FBP. Más aún, el cálculo efectuado de las constantes de disociación aparentes para la FBP, arrojó valores sólo 3 veces superiores respecto de la enzima salvaje. En base a estos resultados se construyó un modelo molecular tridimensional para la enzima de *E. coli*, en el que se muestran las conformaciones que adoptan los *loops* que contienen a los resi-

duos Gln⁷⁴ y Trp¹¹³, en presencia y ausencia del activador. El modelo sugiere que las interacciones entre estos *loops*, fundamentalmente de tipo puente hidrógeno, juegan un papel crítico para la propagación de la activación alostérica desde el lugar de unión de la FBP al sitio activo.

Se construyeron las mutantes homólogas a éstas para caracterizar la respuesta en la enzima de *A. tumefaciens* frente a los dos activadores principales, F6P y Pyr. Se observó que en ambos casos, la activación se vio afectada negativamente por esas mutaciones, pero en el caso del Pyr, de manera diferente según sea la Gln⁶⁷ o el Trp¹⁰⁶ el residuo mutado. Esto se debería a diferencias en los mecanismos de activación entre uno y otro efector, que utilizarían diferentes vías de transmisión de la señal alostérica al sitio activo.

Por otro lado, experiencias de modificación oxidativa con iones metálicos, realizadas sobre la enzima salvaje y las enzimas mutantes D276N y D276E, confirmaron la importancia del residuo Asp²⁷⁶ en la coordinación del Mg²⁺.

Al estudiarse la activación simultánea de la enzima de *A. tumefaciens* por parte de los dos activadores principales, la F6P y el Pyr, se observó que ambos presentan efectos cooperativos positivos mutuos en la etapa de unión y efectos no aditivos en la etapa catalítica. Además los resultados indican que, en presencia de ambos activadores, el Pyr, a pesar de que activa un número menor de veces, es el activador principal, ya la velocidad límite alcanzada fue la correspondiente a la obtenida sólo en presencia de Pyr.

Con el objetivo de verificar la relevancia del surco comprendido entre los dominios N- y C- terminal, tanto para la activación por

FBP en la enzima de *E. coli*, como por F6P en la de *A. tumefaciens*, se realizó mutagénesis sitio dirigida en ambas enzimas, obteniéndose las mutantes D385A y D378A, respectivamente. El efecto de las mutaciones en los residuos homólogos entre ambas enzimas fue distinto y del análisis de las estructuras tridimensionales se postuló que esto se debería a diferencias en los puentes salinos que se forman entre residuos pertenecientes a cada uno de los dominios, en cada enzima en particular.

Se encontraron nuevos efectores de la ADP-Glc PPasa de *A. tumefaciens*, entre ellos la R5P que produce un efecto activador, mientras que el PEP y el 3PGA producen un efecto de inhibición. Relacionando el hallazgo de los nuevos efectores con el metabolismo de la bacteria se puede concluir que la regulación alostérica de la enzima estaría gobernada por los niveles de intermediarios de la vía glucolítica de Entner-Doudoroff en conexión con la ruta de las pentosas fosfato.

Abreviaturas: ADP-Glc: adenosina-5'-difosfato glucosa; ADP-Glc PPasa: ADP-Glc pirofosforilasa; FBP: fructosa-1,6-bisfosfato; F6P: fructosa-6-fosfato; Pyr: piruvato; PEP: fosfoenolpiruvato; 3PGA: 3-fosfoglicerato; R5P: ribosa-5-fosfato.

Summary

Structural characterization of ligand interaction with ADP-glucose pyrophosphorylase.

The major regulatory step in the synthesis of glycogen in bacteria and starch in plants corresponds to the formation of ADP-Glc, catalyzed by the ADP-Glc PPase enzyme. As most of the enzymes are allosterically regulated by modulators, this thesis was conceived with the aim of expanding the knowledge of the interactions between the

different effectors as well as to understand the molecular mechanism of allosteric regulation. The studies were performed on two bacterial enzymes, the *E. coli* and *A. tumefaciens* ADP Glc PPases.

The results obtained by studying site-directed mutants of *E. coli* enzyme allowed us to establish the role of certain loops in the propagation of allosteric activation from the activator binding site to the active site.

Kinetic studies with *A. tumefaciens* enzyme showed the existence of coupled effects between the two major activators, F6P and Pyr. These activators showed mutual positive cooperative effects in the binding step

and non-additive effects in the catalytic step. A binding model was proposed and based on this model an equation was raised, whose theoretical speeds perfectly suited to the experimental values obtained from different investigated situations.

Correlating the discovery of novel effectors with the metabolism of the bacteria, it can be said that the allosteric regulation of the ADP Glc PPasa from *A. tumefaciens*, would be governed by the levels of intermediates of the Entner-Doudoroff glycolytic pathway in connection with the pentose phosphate route.

Determinación de áreas prioritarias para la conservación de reptiles en Corrientes, Argentina

Eduardo Etchepare

eduardoetchepare@hotmail.com

Director / Co-Director: Dr. Alejandro Giraudo
Lugar de realización: Laboratorio de Herpetología. Instituto Nacional de Limnología - CONICET. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral.
Fecha de la defensa: 25/03/2014

Resumen

Actualmente existe una gran preocupación debido a la crisis global de la pérdida de la biodiversidad como resultado de la destrucción y modificación de los hábitats naturales causada por las actividades del hombre. Una de las estrategias desarrolladas para enfrentar esta crisis es detectar regiones prioritarias para conservación, ya que los recursos económicos y humanos son limitados y por lo tanto deben ser optimizados. En este estudio se proponen

áreas prioritarias para la conservación de reptiles en la provincia de Corrientes analizando en 43 celdas de 0.5° de latitud-longitud la riqueza específica total y de especies focales (amenazadas y raras), la diversidad filogenética y un índice combinado de biodiversidad, los cuales fueron optimizados aplicando el algoritmo de complementariedad para determinar el mínimo número de áreas necesarias que contengan a todas las especies y el valor de los índices. La completitud del inventario fue evaluada mediante estimadores no paramétricos. Se determinaron áreas de endemismos utilizando los programas NDM/VNDM y se probó la presencia de anidamiento espacial mediante el programa Nestedness Temperature Calculator. Se establecieron las áreas con mayor número de especies focales (raras y amenazadas) y se midió la representatividad de estas especies respecto

al resto de los reptiles. Por último, se evaluó como representan las áreas protegidas (APs) actuales a los reptiles para evaluar vacíos en la representación de especies. Se analizaron 5.688 registros obtenidos de la bibliografía, consulta de colecciones y viajes de campo, ordenados en una matriz de presencia/ausencia de especies de reptiles en las 43 celdas provinciales. Con 98 especies de reptiles, Corrientes es la provincia con mayor riqueza de este grupo en Argentina. De acuerdo a los estimadores de riqueza, el nivel de completitud del inventario fue elevado (promedio 90%). Se identificaron un mínimo de 13 celdas prioritarias y complementarias (30% del total provincial) necesarias para representar a todas las especies de reptiles al menos una vez (eficiencia máxima). Los índices de diversidad filogenética y el combinado de biodiversidad requieren de las mismas 13 celdas anteriores, sólo existiendo diferencias en su orden de prioridad. Se identificaron 11 celdas prioritarias para representar a todas las especies raras y amenazadas, con una celda diferente entre ellas. Las especies focales fueron efectivas para representar al resto de las especies. Se detectaron 16 áreas endemismo (consenso 50%), tres de ellas coincidentes con el Distrito de los Campos y cuatro con el Chaco Húmedo. Se encontró un patrón significativamente anidado. Las APs representan al 73% de las especies y son necesarias 10 áreas adicionales para cubrir la totalidad de reptiles de la provincia de Corrientes. Estas áreas, son coincidentes con regiones prioritarias determinadas en otros estudios para serpientes, aves y comunidades de pastizales, por lo que focalizar los esfuerzos de conservación en las áreas propuestas beneficiaría a la protección de otros grupos y comunidades.

Summary

Identifying priority areas for reptiles conservation in Corrientes, Argentina

Currently, there is a great concern about the global biodiversity crisis as a result of the destruction and modification of natural habitats caused by human activities. One of the developed strategies to address this crisis is identifying priority regions for conservation. In this study is proposed the priority areas for reptile conservation in 43 cells of 0.5° latitude-longitude in Corrientes province, based in an analysis of species richness (all reptiles, rare and threatened species), phylogenetic diversity and a combined index of biodiversity, which were optimized using the complementarity algorithm to determine the minimum of needed area to contain all reptiles species and values of the different indices employed. A total of 5,688 species records were obtained by mean of field trips and revision of herpetological collections and literature. With 98 reptile species, Corrientes is the Argentinean province with the greatest species richness. A minimum number of 13 priority and complementarity cells (30 % of the total) were necessary to contain all species at least once (maximum efficiency). Phylogenetic diversity and combined biodiversity indices supported this solution and matches in all cells, with differences only in the priority order. Protected areas systems represent 73% of the reptile species and other 10 additional areas will be necessary to cover all species of the Corrientes province. These proposed areas are consistent with the priority areas identified in other studies using snakes, birds and grassland communities, so focusing the conservation efforts in these proposed areas will ensure the protection of multiple taxonomic groups.

Formulación de productos nutroterápicos de interés social aptos para tratamientos hospitalarios

María Gimena Galán

Directora: Dra. Silvina Rosa Drago

Lugar de realización: Laboratorio de Cereales y Oleoginosas, Instituto de Tecnología de Alimentos, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral.

Fecha de defensa: 21/11/2014

Resumen

La nutrición enteral es la administración de nutrientes a cualquier nivel del tubo digestivo (incluyendo la vía oral) de formulaciones especiales, denominadas fórmulas enterales (FE), y tiene por objetivo reducir la morbi-mortalidad asociada a malnutrición en pacientes que no pueden, no deben o no quieren consumir los alimentos por las vías convencionales por diferentes motivos. El principal inconveniente de las FE comerciales (FEC) es su elevado costo que, en muchas ocasiones lleva a restringir su uso sólo cuando es estrictamente necesario. Por otro lado, las FE son sistemas complejos por tener en su constitución numerosos ingredientes, los cuales pueden interaccionar con los minerales y otros nutrientes, disminuyendo su absorción, y reduciendo las cualidades nutricionales. Además, es una práctica hospitalaria común el incluir las FE en preparaciones alimentarias, pero se desconoce el impacto en las propiedades nutricionales de dichas fórmulas.

El objetivo general de la tesis fue desarrollar productos nutroterápicos con distintos fines, de alta calidad y bajo costo, cuya fabricación pueda ser encarada por organismos provinciales y cuya utilización esté dirigida en principio, a hospitales públicos.

En una primera etapa, se evaluaron 20 FEC en relación a su composición y características fisicoquímicas y nutricionales: actividad acuosa, sólidos totales y solubles, perfil de ácidos grasos, oxidación de lípidos, nitrógeno total, nitrógeno no proteico, solubilidad proteica, digestibilidad proteica (DP), lisina disponible (LD), electroforesis SDS-PAGE, ácido fólico, azúcares reductores, ácido ascórbico, contenido de Fe, Zn, Ca, Na, K, Cu, Mg, P y bioaccesibilidad de Fe, Zn, Ca, Cu y Mg. Además, se evaluó el efecto de la inclusión de las FEC en distintas preparaciones (té: T, postre de chocolate: PC, arroz con leche: AL y licuado de banana: LB), para evaluar el efecto de las matrices alimentarias y procesos de cocción sobre la bioaccesibilidad y aporte potencial de Fe, Zn y Ca. Luego, se procedió al desarrollo de FE experimentales (FEE). En primer lugar, se realizaron dos diseños experimentales para evaluar el efecto de la composición de las distintas formulaciones (contenido de Ca, proteínas de soja, caseína y povidona) sobre algunas propiedades nutricionales (bioaccesibilidad de Fe, Zn, Ca y DP). También, se desarrollaron tres FEE base con distinta fuente proteica (aislados de proteínas de soja: APS, caseína: C y proteínas del suero lácteo: WPC) y se estudió el efecto de la incorporación de fibra, de la hidrólisis de las fuentes proteicas (FE oligoméricas) y de distintas fuentes de fortificación de Fe (sulfato ferroso, bisglicinato ferroso y FeNaEDTA) sobre propiedades nutricionales (bioaccesibilidad de Fe, Zn y Ca, DP y LD).

En base a los resultados obtenidos, se seleccionó una FEE (normocalórica, normoproteica, polimérica, sin fibra, con caseína como fuente proteica, con sulfato ferroso como fuente de Fe y con citrato de Ca como fuente de calcio). Se evaluaron propiedades físico-químicas y microbiológicas. También se evaluó el efecto de la inclusión de la FEE selecta en distintas matrices alimentarias (AL, PC, T, LB, jugo de naranja y manzana, gelatina y puré de papas) y por último se analizó el período de vida útil (VU), durante 90 días, bajo diferentes condiciones de almacenamiento (5, 15, 30 y 45°C).

Los resultados obtenidos en la primera etapa mostraron que existen discrepancias entre los valores declarados en los rótulos de las FEC y los valores determinados experimentalmente. Por otro lado, se hallaron valores elevados de oxidación de lípidos y valores bajos de LD y bioaccesibilidad de minerales. Al incluir dichas FEC en las matrices alimentarias, el resultado más relevante fue el efecto negativo sobre la bioaccesibilidad mineral de aquellas preparaciones que involucraron el calentamiento (T y PC). Por otro lado, se observó un efecto positivo en aquellas preparaciones que no implicaron un calentamiento de la FEC (AL y LB). Al desarrollar las FEE, se observó que los distintos componentes de las mismas afectaron de manera diferente las propiedades nutricionales, pero en todos los casos resultaron mejores que las halladas previamente para las FEC. Además, se observó un aumento de la bioaccesibilidad mineral y DP y una disminución de la LD en las FEE oligoméricas. Con respecto a las fuentes de Fe estudiadas, el FeNaEDTA mostró mejor bioaccesibilidad de Fe, para las tras fuentes proteicas estudiadas. La FEE selecta mostró ser apta para el consumo, desde el

punto de vista microbiológico y adecuada en cuanto a sus propiedades físico-químicas. Al incluir dicha FEE en las matrices alimentarias, se observaron resultados similares a los hallados para las FEC. Respecto a la VU, se seleccionó la oxidación de lípidos como indicador de pérdida de calidad, por ser el parámetro más afectado en las condiciones de temperatura y tiempo de almacenamiento del estudio. La VU calculada a diferentes temperaturas sería relativamente corta, en comparación con las que presentan las FEC, lo que se debe principalmente al tipo de envase utilizado en el estudio. Éste fue seleccionado debido a sus características de impermeabilidad al O₂ y a la humedad y por ser un envase más económico, que permitiría un mayor fraccionamiento y evitar de esta manera, que las FE se deterioren en las cocinas hospitalarias.

Se concluye que sería conveniente implementar medidas de control de los productos nutroterapicos importados, ya que algunos no cumplieron con lo declarado en el rótulo y que se podría incentivar la fabricación de FE nacionales, dado que se demostró que es factible elaborar productos de alta calidad y bajo costo, cuya fabricación pueda ser encarada por organismos provinciales.

Summary

Formulation Of Social Interest Formulas For Nutritional Therapy Apt To Hospital Treatments

Enteral nutrition is the nutrient management of enteral formulas (EF) at any level of the digestive tube, and aims to reduce the morbidity and mortality associated with malnutrition in patients who cannot, should not or do not want to consume foods by the conventional oral way. The overall objective of this work was to develop nutrotera-

pics for different purposes, with high quality and low cost manufacturing, which can be addressed by state agencies, for using in public hospitals. For this, commercial EF were evaluated for their physicochemical and nutritional properties. The effect of EF inclusion in different food matrices, with different cooking processes was also studied. Then, polymeric and oligomeric experimental EF, with different energy value were developed. The effects of different ingredients on nutritional properties, and EF inclusion in dif-

ferent food matrices were evaluated. Finally, based on the results, an experimental EF was selected and evaluated regarding its physicochemical and microbiological properties. Also, a shelf life study under different storage conditions was performed. Through this study it was possible to develop EF with national raw materials (and thus with lower cost), nutritionally enhanced, suitable from a microbiological point of view and with physical characteristics that help decrease the incidence of complications.

Diseño de sistemas poliméricos biocompatibles de liberación controlada de drogas oncológicas en matrices cilíndricas y cilíndricas huecas

Juan Carlos Daniel Ibarra

jcdibarra@santafe-conicet.gov.ar

Director: Julio A. Luna.

Codirector: † Ricardo J. A. Grau.

Lugar de realización: Laboratorio de Química Fina. INTEC I. Centro Científico Tecnológico CONICET. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral.

Fecha de la defensa: 21/03/2014

Resumen

Los tratamientos quimioterapéuticos para tumores sólidos que utilizan vías de administración sistémicas producen severos efectos adversos, lo que en algunos casos imposibilita la continuidad del tratamiento. La investigación para el desarrollo de sistemas de liberación de drogas oncológicas en forma sitio-específica se encuentra en auge desde hace más de 20 años. El diseño de sistemas de liberación de drogas tipo implantes, para la admi-

nistración endovascular de paclitaxel para tratamientos de tumores sólidos situados adyacentes o cercanos al sitio de implantación, fue el objetivo central de la presente investigación.

En primer lugar, se procedió a la selección del material polimérico a utilizarse como matriz del sistema de liberación, proceso que fue establecido teniendo en cuenta la biocompatibilidad requerida para su uso in vivo, y las velocidades y períodos de aplicación de los tratamientos quimioterapéuticos vigentes. Además, las propiedades mecánicas del sistema deben adecuarse a los factores anatómicos y fisicoquímicos del sistema circulatorio sanguíneo. El material polimérico seleccionado fue el etilen vinil acetato (EVA) por sus propiedades y antecedentes como material de implantes de liberación de drogas.

Se desarrollaron modelos matemáticos para la predicción de la liberación in vitro aplicables a los sistemas matriciales dise-

ñados con el polímero seleccionado. Esta plataforma teórica para la simulación de perfiles de liberación se utilizó como una herramienta imprescindible para la correcta formulación y optimización de los implantes de liberación de drogas. La caracterización y determinación de parámetros del sistema matricial de EVA cargado con progesterona como droga modelo, fue realizada según los métodos y técnicas reportados en bibliografía para este tipo de material. Los resultados obtenidos fueron utilizados como parámetros en los modelos matemáticos desarrollados y permitieron establecer que el material polimérico seleccionado cumple con los requisitos para su aplicación como implante de liberación controlada.

La comprobación y validación de los modelos matemáticos por comparación con datos experimentales de bibliografía y datos experimentales obtenidos mediante ensayos propios resultó en la constitución de una plataforma matemática fiable, para distintas geometrías de los dispositivos.

La metodología de caracterización y determinación de parámetros fue aplicada a un nuevo sistema matricial: EVA-paclitaxel. Con los resultados obtenidos fue posible la aplicación del modelo matemático para cilindros huecos a los dispositivos de EVA cargados con la droga oncológica. La comparación entre los perfiles teóricos y los datos experimentales obtenidos demostró una excelente concordancia.

El comportamiento de la arteria coronaria de cerdo como una membrana no controlante de la velocidad de liberación in vitro de paclitaxel desde los dispositivos cilíndricos huecos confirmó el potencial de dicho sistema para liberación endovascular. Además, la biocompatibilidad del EVA como polímero, y del Elvax 260 como

marca comercial, fue comprobada con ensayos in vivo realizados en ratas Wistar. La implantación subcutánea generó reacciones consideradas normales para un proceso quirúrgico convencional, no mostrando en ningún caso una reacción inflamatoria severa contra el material.

Una correlación in vitro-in vivo para la liberación de paclitaxel demostró que se produce una liberación más lenta en condiciones in vivo, respecto a la liberación in vitro. El período de tiempo cubierto por la liberación de la droga oncológica en condiciones in vivo, permite una evaluación favorable del sistema diseñado, teniendo en cuenta las dosis y duración de los tratamientos quimioterapéuticos vigentes para distintos tipos de tumores sólidos.

Se puede concluir que el empleo de la plataforma matemática desarrollada junto a la metodología de caracterización establecida constituyen herramientas valiosas en el proceso de diseño, optimización de la formulación, y posterior fabricación de implantes de liberación controlada de drogas oncológicas desde matrices cilíndricas huecas no degradables.

Summary

Design of biocompatible polymer systems for oncological drug controlled release from cylindrical and hollow cylindrical matrices

Design of implant drug release system for endovascular administration of paclitaxel for treatment of solid tumors located adjacent or near the site of implantation, was the main objective of the present investigation.

The selected polymeric material was ethylenevinylacetate for their biocompatibility and mechanical properties. Mathematical models for predicting in vitro release were

developed. Characterization and parameters determination of system loaded with progesterone as a model drug was performed according to methods reported. The validation of mathematical models for comparison with experimental data from literature and own resulted in a reliable mathematical platform for different geometries.

The characterization methodology was applied to the system loaded with paclitaxel. The hollow cylinder mathematical model was used and the comparison between experimental data and theoretical profiles showed excellent agreement.

The behavior of the pig coronary artery as non-controlling membrane of paclitaxel in-

vitro release from hollow cylindrical devices confirmed the potential of the system for endovascular delivery. Ethylenevinylacetate biocompatibility was tested with in vivo trials in Wistar rats by subcutaneous implantation. An in vitro-in vivo correlation for paclitaxel release showed slower release in vivo conditions. The time period covered by the in vivo release allows a successful assessment.

The uses of mathematical platform next to the characterization methodology are valuable tools in the design, development and manufacture of implants for oncological drug controlled release cancer drugs from cylindrical matrices.

Diseño de inmunosensores electroquímicos para la detección de biomoléculas marcadoras en el diagnóstico clínico

Silvina Vanesa Kergaravat

skergaravat@fbc.unl.edu.ar

Director / Co-Director: Dra. Silvia Raquel Hernández / Dra. María Isabel Pividori

Lugar de realización: Laboratorio de Sensores y Biosensores. Química Analítica

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

Fecha de la defensa: 19/02/2014

Resumen

En la presente tesis se optimizaron siete sistemas de detección electroquímicos basados en la respuesta enzimática de la peroxidasa de rábano picante (HRP) frente a H_2O_2 como sustrato y diferentes cosustratos: o-fenilendiamina (OPD), hidroquinona, fenol, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina, p-clorofenol, p-aminofenol y catecol. El sistema

HRP-OPD- H_2O_2 presentó el mejor comportamiento analítico en la determinación de HRP hasta un límite de detección de $3,8 \times 10^{-11}$ mol L^{-1} , en un amplio intervalo lineal ($9,5 \times 10^{-11}$ a $1,9 \times 10^{-8}$ mol L^{-1}), lo cual supone una gran ventaja para su posterior aplicación como sistema de revelación en los magnéticos sensores de afinidad electroquímicos.

Con la finalidad de poner a prueba la capacidad de las partículas magnéticas (PM) de preconcentrar y recuperar a un analito de interés a partir de una matriz compleja, se desarrolló un magneto biosensor electroquímico para la cuantificación de biotina a partir de productos alimentarios. La reacción de afinidad tuvo un formato competitivo, donde biotina estándar o presente en las muestras compitió con biotina marcada con HRP por los sitios de unión de la estreptavidina inmo-

vilizada en la superficie de las PM. Luego las PM modificadas se capturaron mediante el transductor magneto compuesto grafito-epoxi (m-GEC) y se realizaron las lecturas electroquímicas con el sistema de revelación de HRP-OPD-H₂O₂. Recuperaciones entre 86 a 120% se obtuvieron a partir de los productos alimentarios, lo cual sugiere que, la simple extracción de biotina se ve favorecida con el uso de las PM como soporte.

A continuación, el uso de PM como soporte de la reacción de afinidad se implementó en el desarrollo de magnetos inmunoensayos con detección fluorescente y electroquímica, destinados a la detección de anticuerpos presentes en enfermos celíacos, con la finalidad de mejorar la sensibilidad de las metodologías utilizadas rutinariamente en los centros de salud para el diagnóstico de dicha patología. En primer lugar, se elaboró un magneto inmunoensayo fluorescente con la finalidad de determinar los anticuerpos anti-transglutaminasa (ATG2) del isotipo IgA en enfermos celíacos. El protocolo con formato indirecto, llevado a cabo en placas de microtitulación, consistió en la inmovilización de TG2 sobre las PM y dos etapas de incubación: la primera con ATG2 estándar o muestra y la segunda con un anticuerpo anti-IgA rotulado con HRP (anti-IgA-HRP). Las etapas de separación se llevaron a cabo mediante un magneto ubicado debajo de las placas. Luego de la optimización de las concentraciones de los inmunoreactivos, se aplicó esta metodología a la detección de ATG2 en sueros de pacientes diagnosticados como celíacos o no celíacos. El análisis de los resultados se realizó mediante las curvas de Características Operativas de Receptor (ROC), obteniendo un valor de sensibilidad (SE) de 96,6% y especificidad (ES)

de 94,7%. Además, se obtuvo una eficiencia de 93,7%, comparados con los resultados de un ensayo enzimo-inmunoanálisis (ELISA) comercial. En segundo lugar, se desarrolló un magneto inmunoensayo electroquímico para la detección de ATG2-IgA. El formato fue similar al del inmunoensayo fluorescente, sólo que en el caso del inmunoensayo el desarrollo se realizó en tubos Eppendorf y la captura de las PM modificadas se llevó a cabo sobre la superficie del electrodo de trabajo. El análisis de sueros mediante las curvas ROC brindó una mayor SE (100%) y una menor ES (84%) en comparación al magneto inmunoensayo fluorescente; pero la misma eficiencia al ser comparada con un ensayo ELISA comercial. En tercer lugar, se diseñaron diversas estrategias basadas en magnetos inmunoensayos electroquímicos para detectar anticuerpos anti-péptido deaminado de gliadina (APDG) isotipo IgA e IgG y ATG2-IgA en los pacientes celíacos con la finalidad de aumentar la sensibilidad en el diagnóstico de la enfermedad celíaca y disminuir los posibles falsos negativos, especialmente en los niños menores de 2 años, en los cuales los ATG2 pueden estar normales, mientras los APDG se encuentran elevados, para este grupo etario. Los resultados experimentales obtenidos al evaluar 70 sueros mediante las tres metodologías se analizaron con las curvas ROC y los rendimientos analíticos se compararon con los obtenidos mediante los ensayos ELISA para APDG y APDG/ATG2 comerciales. El menor rendimiento analítico se obtuvo en la detección de APDG-IgG, lo cual puede deberse a un posible efecto matriz causado por anticuerpos IgG presentes en los pacientes, pero no específicos de la enfermedad celíaca. Por otro lado, APDG-IgA mostró el mayor

rendimiento analítico con una SE de 91% y una ES de 96%. Para mejorar estos parámetros, se propuso como perspectiva futura, el desarrollo de inmunosensores electroquímico con diferentes secuencias de PDG como elementos de reconocimiento.

Como conclusión, se demostró la utilidad de diferentes metodologías basadas en la detección electroquímica de APDG y ATG2 como herramienta de diagnóstico de la enfermedad celíaca. Las metodologías electroquímicas presentan la factibilidad de disminuir el tamaño del instrumental y hacerlo portátil, de manera que pueda ser trasladado a cualquier centro de salud.

Summary

Design of electrochemical immunosensors for the detection of biomolecules in the clinical diagnostic

The electrochemical detection for seven horseradish peroxidase-cosubstrate- H_2O_2 systems were optimized for their subsequent applications as detection systems of immunoassays. *o*-Phenilendiamine (OPD), phenol, hydroquinone, pyrocatechol, *p*-chlorophenol, *p*-aminophenol and 3,3'-5,5'-tetramethylbenzidine were evaluated as cosubstrates of horseradish peroxidase (HRP) enzyme. OPD showed the highest electrochemical efficiency and good characteristics in its role as HRP cosubstrate

(high affinity and efficiency for the enzyme) in comparison with the other cosubstrates.

Then, an electrochemical magneto biosensor for the rapid determination of biotin with limit of detection of $8.4 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ in food samples was developed to evaluate the capacity of the magnetic beads (MBs) of preconcentrate and recovery to analyte from complex matrixes. The biotinylated HRP enzyme competed with free biotin in the sample for the binding sites of streptavidin on MBs and the electrochemical signal was measured by square wave voltammetry.

After, the MBs were used as support of affinity reaction in magneto immunoassays for the antibody detection in celiac disease. The electrochemical and fluorescent detection of anti-transglutaminase antibodies (ATG2) and electrochemical detection of anti-deaminated gliadine peptide antibodies (ADGP) in celiac disease were applied. The ATG2 and ADGP were recognized by transglutaminase enzyme and deaminated gliadine peptide immobilized on MBs and then the immunological reaction was revealed by antibodies labeled with HRP enzyme. Sera samples from control and clinically confirmed cases of celiac disease were tested and the data were submitted to the receiver-operating characteristic plot analysis. Good sensitivities and specificities were obtained with high efficiencies compared with the commercial optical ELISA kit.

Metabolismo redox en *Trypanosoma cruzi*. Estudio de vías metabólicas dependientes de glutatión

Vanina E. Márquez

vmarquez@fbc.unl.edu.ar

Director: Sergio A. Guerrero

Lugar de realización: Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (FBCB-UNL-CONI-

CET). Laboratorio de Bioquímica Microbiana. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral.

Fecha de defensa: 14/10/2014

Resumen

En todas las formas de vida existen aspectos estrechamente ligados a la biología redox. Muchas formas de vida han tenido que desarrollar diversos mecanismos para resistir al desafío impuesto por las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno. Por otra parte, otros mecanismos evolucionaron para utilizar a estas especies reactivas con fines de regulación o señalización. El delicado balance redox intracelular depende de la acción conjunta y coordinada de proteínas y compuestos de baja masa molecular. Dentro de estos actores que forman parte del metabolismo redox, podemos mencionar a los tioles de baja masa molecular, como el glutatión, y los sistemas tiorredoxina y glutarredoxina. En los parásitos tripanosomátidos, el metabolismo redox constituye una compleja red dependiente fundamentalmente de tripanotión, un tiol de baja masa molecular específico de este tipo de organismos. Sin embargo, otros tioles como la glutatiónil espermidina y el glutatión también están presentes en estos parásitos. En el marco de este trabajo de tesis, se han abordado objetivos vinculados a la caracterización cinética y funcional de enzimas y proteínas redox de *T. cruzi* que en otros organismos han sido relacionadas al glutatión por su dependencia con este tiol.

En este trabajo se presentan resultados obtenidos en ensayos realizados con el fin de caracterizar una glutatiónil espermidina sintetasa, cuyo estudio resulta interesante ya que solo se encontraría en algunos tripanosomátidos. El gen que codifica para esta proteína fue amplificado desde el ADN del parásito y luego clonado para obtener la proteína recombinante, que fue empleada en ensayos cinéticos. Por otra parte, a través de

un ensayo de western blot se pudo concluir que en el parásito, la enzima se expresa en el estadio replicativo en el huésped.

En esta tesis se presentan los estudios sobre una glutarredoxina monotiólica que forma parte de una proteína multidominio. El gen que codifica esta proteína fue amplificado a partir del ADN genómico de *T. cruzi*, y luego clonado para su expresión recombinante en un huésped procariota. Se realizaron ensayos de caracterización cinética valiéndose de la proteína recombinante. En estos ensayos se pudo establecer su capacidad de para catalizar la reducción de sustratos como el 2-hidroxi-etil disulfuro y el glutatión disulfuro. Se pudo establecer que el tripanotión es un sustrato reductor fisiológico en el parásito de la redoxina. Se presentan estudios de localización subcelular de esta proteína multidominio, en los que se estableció su ubicación en el citoplasma. A través de ensayos de complementación en levaduras se obtuvieron resultados que nos permitieron apoyar nuestra hipótesis sobre posibles funciones de esta proteína multidominio en el parásito.

También se abordó en esta tesis, el estudio de una glutarredoxina ditiólica en *T. cruzi* (*TcrGrx*). Mediante el análisis *in silico*, se ha podido establecer la presencia de dos genes que codifican para esta proteína, en el genoma del parásito. Residuos aminoácidos presentes en otras glutarredoxinas previamente caracterizadas, han sido identificadas en la *TcrGrx*. La obtención de la proteína recombinante, producida en un hospedero procariota, fue una herramienta que permitió la caracterización de esta proteína a través de ensayos cinéticos. Como resultado de estos ensayos fue posible identificar diversos sustratos de baja masa molecular que podrían ser blanco de la actividad tiol-

transferasa en esta proteína. Asimismo, se ha encontrado que sus posibles reductores fisiológicos podrían ser tanto el glutatión, el tripanotión o la glutationilpermidina. Se estudiaron aspectos de una modificación postraduccional escasamente abordados en el marco del metabolismo redox de los tripanosomátidos como es la glutationilación. Se estudió que esta modificación de las proteínas, con fines de protección, regulación y de señalización, involucra a la *Tcr-Grx* en *T. cruzi*. Desde una perspectiva *in vivo*, se presentan ensayos para poner de manifiesto los roles que podría cumplir esta glutarredoxina en procesos vinculados con el ciclo de vida del parásito como el estrés oxidativo, la apoptosis y la infección de células hospedadoras.

Considerando el escenario metabólico redox tan particular en tripanosomátidos en general, y en *T. cruzi* en particular, los resultados obtenidos constituyen un aporte al conocimiento de los distintos componentes de este escenario metabólico y serán de utilidad para avanzar en el conocimiento de la fisiología de este parásito.

Summary

Redox metabolism in Trypanosoma cruzi. Study of glutathione dependent metabolic pathways

Many forms of life have developed mechanisms to resist to the challenge of reactive oxygen species, or to use them for

regulation or signalling purposes. In trypanosomatid parasites, redox metabolism is a complex network based on trypanothione, but other low molecular weight thiols such as glutathionylspermidine and glutathione are also present. In this thesis, we have addressed objectives related to the characterization of redox proteins from *Trypanosoma cruzi*, which were linked to glutathione metabolism. Kinetic assays with a recombinant glutathionylspermidine synthetase are presented. The analysis of the protein expression led to the conclusion on its occurrence in the replicative stage of the parasite in the host. The properties of a monothiolic and a dithiolic glutaredoxin from the parasite were studied. Through kinetic assays using the recombinant forms of the proteins, it was established their capacity to mediate in the reduction of many substrates, and to use reducers systems, such as those dependent of trypanothione or glutathione, which result physiologically relevant in the parasite. By using techniques based on the immunodetection of these proteins, it was possible to determine the specific sub-cellular localization in *T. cruzi*. The functional analysis using cultures of the parasites revealed the possible roles that the dithiolic glutaredoxin may assume, in the context of processes linked to the trypanosoma life cycle. The results presented in this thesis contribute to the knowledge about the biology redox in this parasite.

La eritropoyetina como agente neuroprotector: una potencial droga para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central

Lic. Mónica Mattio

mmattio@fbc.unl.edu.ar

Director / Co-Director: Dra. Marina Etcheverrigaray / Dr. Marcos Oggero Eberhardt

Lugar de realización: Laboratorio de Cultivos Celulares. Facultad de Bioquímicas y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral.

Fecha de la defensa: 14/02/2014

Resumen

La eritropoyetina (EPO) es una glicoproteína perteneciente a la superfamilia de citoquinas de tipo I. Además de su conocido efecto hematopoyético, esta proteína presenta un alto potencial neuroprotector. Sin embargo, su aplicación prolongada en el tratamiento de enfermedades neurológicas podría causar serios efectos adversos debido a la estimulación de la eritropoyesis, tales como elevación de la masa de glóbulos rojos, hipertensión arterial y fenómenos trombóticos. Por lo tanto, el desarrollo de análogos con propiedades neuroprotectoras pero escasa actividad hematopoyética podría constituir una solución al problema planteado.

En este trabajo de tesis y a partir de un proceso de purificación alternativo de EPO humana recombinante producida en células CHO.K1 (rhEPO), se obtuvo una combinación de glicofomas que se denominó Neuroepoetin (rhNEPO), la cual presentó una composición de isoformas menos ácidas y con menor contenido de ácido siálico. El

análisis de las estructuras de los oligosacáridos de tipo N- demostró que la rhNEPO no sólo está enriquecida en estructuras menos sialidades (mono-, di- y tri-sialidades) sino que, además, presentó mayor porcentaje de estructuras menos ramificadas (di y tri-antenarias), correspondiéndose con una reducción del contenido de ácido siálico del 38% con respecto a la rhEPO.

Estas características se tradujeron en una actividad eritropoyética *in vivo* prácticamente nula, siendo sólo del 4% con respecto a la hormona hematopoyética. A pesar de esto, no se detectaron cambios en su afinidad por el receptor en ensayos *in vitro* en células UT-7/EPO, pero sí con la línea celular TF-1, donde la nueva combinación presentó una mayor afinidad por el receptor con respecto a rhEPO.

La caracterización farmacocinética de esta nueva variante, realizada por vía intravenosa (iv), intraperitoneal (ip) y subcutánea (sc), demostró que fue eliminada más rápidamente que la rhEPO. Sin embargo, cuando se evaluó la capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica (BHE), tras su administración iv o ip, la misma lo hizo a mayor velocidad, llegando más rápidamente a su potencial sitio de acción.

Por otra parte, se evaluó una estrategia de permeabilización de la BHE mediante apertura osmótica empleando manitol (iv), que permitió la detección más temprana de la rhEPO en el líquido cefalorraquídeo, no observándose este efecto con la rhNEPO.

La acción neuroprotectora y antiapoptótica de esta nueva combinación fue evaluada *in vitro* en líneas celulares con características neuronales (células SH-SY5Y y PC-12) y en cultivo primario de neuronas corticales empleando diversos estímulos apoptóticos. En ambos ensayos, la rhNEPO evidenció un efecto citoprotector y antiapoptótico similar o superior a la variante hematopoyética.

Por último, la actividad neuroprotectora fue evaluada *in vivo* empleando un modelo de isquemia cerebral focal mediante oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) en ratones Balb/c. En esta oportunidad, ambas variantes de rhEPO permitieron una recuperación del estado neurológico de los animales luego del daño ocasionado por la oclusión de dicha arteria. Asimismo, se observó que ambas variantes tendieron a disminuir el volumen de infarto del tejido cerebral. A nivel morfológico, en la región CA1 del hipocampo, se preservó la respuesta astrogial luego de los tratamientos con rhEPO o rhNEPO, mientras que la expresión de MAP2 y NF-200 se incrementó con respecto a los animales tratados sólo con el vehículo. Estos resultados indicarían que los tratamientos con rhEPO y rhNEPO no sólo permiten una disminución de la respuesta inflamatoria ocasionada por la MCAO en dicha región sino también favorecen la recuperación de la arborización dendrítica y la preservación de la estructura neuronal.

En resumen, los resultados obtenidos permiten postular a la nueva combinación de rhEPO como un candidato terapéutico neuroprotector. De hecho, es una molécula segura dado que deriva de una droga actualmente utilizada y, además, no sólo demostró efecto citoprotector y antiapoptótico *in vitro* sino que, también, exhibió rol neuroprotector en un

modelo *in vivo* de daño neuronal isquémico con un reducido efecto hematopoyético.

Summary

Erythropoietin as neuroprotective agent: a potential drug for the treatment of central nervous system diseases

In this thesis, a novel combination of erythropoietin (EPO), called Neuroepoetin (rhNEPO), was obtained through an alternative purification process of the recombinant hormone produced in CHO cells. This variant exhibited a higher proportion of less acidic isoforms and, consequently, lower content of sialic acid if compared to rhEPO, resulting in a very low *in vivo* erythropoietic activity but with preserved or enhanced receptor affinity in *in vitro* assays.

Also, the cytoprotective and antiapoptotic effects of rhNEPO were similar or better than rhEPO in cell lines with neuronal characteristics and primary culture of cortical neurons.

Pharmacokinetic analysis after intravenous (iv), intraperitoneal (ip) and subcutaneous (sc) administration showed that the new variant was eliminated faster than rhEPO. However, when its ability to cross the blood brain barrier (BBB) after iv or ip administration was evaluated, rhNEPO crossed faster than haematopoietic hormone, quickly reaching its potential site of action.

On the other hand, permeabilization of the BBB by using a mannitol hyperosmolar solution (iv) allowed the earlier detection of rhEPO in the cerebrospinal fluid, an effect that was not observed with rhNEPO.

Finally, a neuroprotective role of rhNEPO was demonstrated in an *in vivo* ischemic neuronal damage model after ip administration. These results propose rhNEPO as a candidate for the treatment of central nervous system diseases.

Factores asociados a parasitismo gastrointestinal en guanacos silvestres (*Lama guanicoe*)

Pablo Gastón Moreno

blitum@gmail.com

Director: Pablo Beldomenico

Codirector: Pablo Carmanchahi

Lugar de realización: Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral. Laboratorio de Ecología de Enfermedades (CONICET-UNL). Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral.

Fecha de la defensa: 21/03/2014

Resumen

Recientes investigaciones han demostrado que el estado general de salud en animales silvestres es crucial para modular las dinámicas de infección de las enfermedades, ya que existe un sinergismo entre la condición fisiológica, el sistema inmunológico de un individuo y su susceptibilidad para contraer infecciones o infestaciones. A su vez, la fauna silvestre se encuentra expuesta a diferentes estímulos, naturales y antrópicos, que desencadenan respuestas de estrés secretando glucocorticoides que, a largo plazo, deprimen al sistema inmunitario. Las enfermedades parasitarias tienen un gran impacto en las dinámicas poblacionales de algunas especies silvestres, por lo que pueden representar una amenaza considerable para la biodiversidad. La meta de esta tesis fue investigar los factores determinantes de abundancia parasitaria en guanacos silvestres (*Lama guanicoe*) de la Reserva La Payunia, provincia de Mendoza, Argentina. Para ello se identificaron a las especies que componen la comunidad parasitaria gastrointes-

tinal de esta población de guanacos, y se investigaron las asociaciones entre abundancia parasitaria y los factores tradicionalmente considerados como determinantes de abundancia, extrínsecos (estación climática, condiciones meteorológicas) e intrínsecos (sexo, edad, condición corporal, tipo y tamaño de grupo social) del hospedador. A su vez, se analizaron asociaciones entre carga parasitaria y niveles de metabolitos de cortisol fecal (como indicador de estrés); y entre niveles séricos de anticuerpos naturales (componentes de inmunidad innata) de guanacos esquilados con su carga parasitaria. La comunidad parasitaria se estudió identificando las formas evolutivas eliminadas en heces (huevos de helmintos y ooquistes de protozoos), por identificación de nematodos adultos de tracto intestinal de guanacos muertos, por identificación de larvas de cultivos fecales, e identificando ooquistes luego de esporulación. La abundancia parasitaria se estimó por conteos de huevos y ooquistes fecales aplicando la técnica de Wisconsin modificada. Los niveles de metabolitos de cortisol fecal se determinaron por radioinmunoensayo y los niveles de anticuerpos naturales con una técnica de hemaglutinación. Los análisis estadísticos se realizaron con modelos multivariantes. Se encontró una riqueza de 11 especies parásitas, siendo *Nematodirus* spp., *Eimeria lamae*, *E. alpaca*, *E. punoensis*, y *E. macusaniensis* las de mayor prevalencia y abundancia. *Trichuris* sp., *Capillaria* sp., *Moniezia* cf. *benedeni*, huevos compatibles con *Strongyloides* sp., y *Eimeria ivitaensis*

completaron el ensamble de esta comunidad parasitaria. Las abundancias parasitarias estuvieron influenciadas por algunas de las variables extrínsecas (año, estación, condiciones climáticas, sector geográfico) e intrínsecas de los individuos (sexo, edad, tamaño de grupo) consideradas tradicionalmente, y también por algunas interacciones interespecíficas entre parásitos. Los niveles de metabolitos de cortisol fecal y de anticuerpos naturales no tuvieron impacto en la abundancia parasitaria. No se encontraron asociaciones entre los niveles de anticuerpos naturales y los niveles de metabolitos de cortisol fecal. *Nematodirus* spp., *Strongyloides* sp. y *Moniezia benedeni* son parásitos propios de rumiantes domésticos y su presencia refleja la susceptibilidad del guanaco, por lo que se recomienda realizar monitoreos parasitológicos periódicos, a fin de poder anticiparse ante incrementos importantes en este tipo de parasitismo en los guanacos silvestres. Esta tesis pone de manifiesto la importancia de considerar los múltiples factores que influyen en las dinámicas parasitarias en poblaciones silvestres, teniendo en cuenta que interactúan estableciendo una intrincada red de causalidad.

Summary

Factors associated to gastrointestinal parasitism in wild guanacos (Lama guanicoe)

Recent studies have shown the importance of the health status of wild animals to modulate the dynamics of disease infection, due to a synergism between physiological condition, immune system and susceptibil-

ity to acquire infections or infestations. The objective of this work was to investigate the driving factors of parasite abundance in wild guanacos (*Lama guanicoe*) from La Payunia Reserve, Mendoza Province, Argentina. To do this, the species comprising the gastrointestinal parasite community of guanacos were identified; and associations between parasite abundance and the traditionally considered driving factors, extrinsic (season, weather conditions) and intrinsic (sex, body condition score, type and group size) of the host were assessed. A richness of 11 parasite species was found, including *Nematodirus* spp., *Eimeria lamae*, *E. alpaca*, *E. punoensis*, and *E. macusaniensis*; whose prevalence and abundance were the highest. *Trichuris* sp., *Capillaria* sp., *Moniezia* cf. *benedeni*, eggs similar to *Strongyloides* sp., and *Eimeria ivitaensis* completed the assembly of this parasitic community. Parasitic abundances were influenced by some of the extrinsic and intrinsic factors of the host individuals traditionally considered, and also by some interspecific interactions between parasites. *Nematodirus* spp., *Strongyloides* sp., and the detected species of *Moniezia* are typical parasites of livestock, and their presence reflects the guanaco susceptibility to be parasitized by them. We suggest conducting parasitological surveys periodically to be able to anticipate to an important rise in this type of parasitism in wild guanacos. This work emphasizes the importance of assessing multiple factors that may affect parasite dynamics in wild populations.

Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuícola cavador *Zilchiopsis collastinensis* (Decapoda, Trichodactylidae)

Carlos Leandro Negro

leonegro82@hotmail.com

Director: Pablo Agustín Collins

Lugar de realización: Laboratorio de Macrocrustáceos. Instituto Nacional de Limnología (CONICET-UNL). Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral.

Fecha de la defensa: 26/03/2014

Resumen

En la agricultura se utiliza una amplia variedad de biocidas, los cuales luego de su aplicación migran hacia los sistemas acuáticos y pueden producir diferentes efectos sobre la fauna acuática. El objetivo de esta tesis fue reconocer los efectos de los insecticidas más utilizados en la región, endosulfán y clorpirifós, sobre el cangrejo dulceacuícola cavador *Zilchiopsis collastinensis* (Decapoda; Trichodactylidae), un integrante común y abundante de los sistemas acuáticos propios del tramo medio del río Paraná. Entre los efectos evaluados se encuentran la toxicidad de estos biocidas sobre adultos y sobre embriones de esta especie. Además, se evaluaron los efectos de concentraciones subletales de estos sobre hepatopáncreas y gónadas femeninas, así como también la bioconcentración de endosulfán en ambos tejidos. También se evaluaron los efectos de diferentes concentraciones subletales de estos plaguicidas sobre tiempo de incubación de los embriones, eclosión efectiva, supervivencia de las crías y metabolismo de juveniles.

Clorpirifós es letal a concentraciones menores que endosulfán, siendo en ambos casos los embriones más resistentes que los adultos. La exposición a estos biocidas puede causar modificaciones en las células hepatopancreáticas, especialmente en las células F y B, relacionadas con los procesos de detoxificación. Estos plaguicidas no producen efectos en los índices gonadosomáticos y en el volumen de los ovocitos, pero pueden producir aumentos en la proporción de ovocitos atrésicos, especialmente aquellos expuestos a clorpirifós. Las concentraciones de endosulfán bioacumuladas en hepatopáncreas fueron decreciendo a medida que disminuyeron las concentraciones en agua. Las concentraciones en gónadas se mantuvieron en el tiempo, sin observarse diferencias entre las concentraciones de exposición. La exposición de embriones a ambos plaguicidas causó aumentos en el tiempo de incubación, disminución en la eclosión efectiva y en la supervivencia de los neonatos. El metabolismo de los juveniles fue modificado por la exposición a endosulfán, disminuyendo el consumo de proteínas y aumentando el consumo de lípidos como sustrato energético.

Zilchiopsis collastinensis es un cangrejo común y abundante en el tramo medio del río Paraná, de gran porte y de hábitos sedentarios. Presenta una alta resistencia a plaguicidas y múltiples variables de respuesta a concentraciones subletales, las cuales podrían ser utilizadas en biomonitoreos de calidad ambiental.

Summary

*Biocide effects in the freshwater burrowing crab *Zilchiopsis collastinensis* (Decapoda, Trichodactylidae)*

In modern agricultural systems there is a widely use of pesticides, which may migrate to aquatic ecosystems after their application affecting the biota, including the burrowing crab *Zilchiopsis collastinensis* (Decapoda: Trichodactylidae). Chlorpyrifos causes lethality in lower concentrations than endosulfan. The embryos were less sensitive to pesticides than adults for both pesticides. The exposure to biocides may cause shifts in hepatopancreatic cells, especially in the F and B cells, which are related to detoxification processes. There were no effects in gonadosomatic indexes or in oocyte volume. However, there was an increase in the atretic oocyte proportion in the individuals exposed

to chlorpyrifos. The endosulfan concentrations in hepatopancreas decreased whereas there was a decrease in the endosulfan concentrations in water. Endosulfan concentrations in gonads were similar in all the concentrations and did not varied in time. The embryo exposure to both pesticides caused increases in the incubation period and decreases in effective hatching and neonate survival. The exposure to endosulfan caused shifts in juvenile metabolism, decreasing the protein consumption and increasing the lipid consumption as energy substrate. The crabs of this species are resistant to pesticides. Nevertheless, the exposure to sublethal concentrations may produce long term effects that eventually cause death, decreasing the population. Due to their characteristics, *Zilchiopsis collastinensis* could be used for biomonitoring.

El conflicto madre-infante en el mono aullador negro y dorado (*Alouatta caraya*) y su comparación en dos sitios del noreste argentino

Romina Pavé

rominaepave@yahoo.com.ar

Director de tesis: Dr. Martín M. Kowalewski. Co-Director de tesis: Dr. Alejandro R. Giraudo. Director de beca: Dr. Gabriel E. Zunino

Lugar de realización: Estación Biológica Corrientes, dependiente del Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia" (CONICET). Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral.

Fecha de defensa: 27/03/2014

Resumen

En esta tesis se evaluó la importancia de los factores que influyen en la relación entre madres e infantes a lo largo del desarrollo de los mismos en monos aulladores negros y dorados (*Alouatta caraya*). En particular se examinó la relación entre la intensidad y la duración del conflicto madre-infante y características ecológicas y de historia de vida de 11 grupos de monos aulladores en 2 bosques con diferente estructura y composición florística del noreste argentino. La hipótesis más importante de este trabajo fue que el hábitat con mayor abundancia y disponibilidad constante de alimento a tra-

vés del año, permite a las hembras acortar el intervalo entre nacimientos y el tiempo de inversión parental. Durante 27 meses (entre Septiembre de 2008 y Noviembre de 2010) se estudió el comportamiento de 37 díadas madre-infante, 21 pertenecientes a 6 grupos en bosques semidecíduos y fragmentados de San Cayetano (SC), Corrientes (27° 30' S - 58° 41' O) y 16 díadas pertenecientes a 5 grupos se estudiaron en Isla Brasileira (IB), Chaco (27° 18' S - 58° 38' O) que corresponde a una isla de inundación con bosque continuo. Ambos sitios están distantes a 18 km y no varían en temperatura, precipitación, fotoperíodo o latitud. Para registrar los datos comportamentales se utilizaron 2 técnicas: 1) muestreo focal continuo en madres e infantes durante 1 día de observación por mes de vida del infante y 2) puntos de muestreo instantáneo en infantes, tomados cada 5 minutos durante el muestreo focal. Se obtuvieron 3.732 horas de observación y 27.588 puntos de muestreo. En ambos sitios se realizaron además muestreos mensuales de disponibilidad de recursos vegetales en las especies más importantes en la dieta de los aulladores (17 especies en SC y 11 especies en IB). Se registraron los nacimientos y muertes de infantes ocurridos en los grupos de estudio. Con respecto a los estudios de vegetación, los resultados indican que los recursos alimenticios de IB fueron más abundantes y presentaron mayor disponibilidad mensual que en SC. En ambos sitios de estudio, los nacimientos ocurrieron a lo largo del año pero existieron picos en otoño-invierno (Abril-Junio) y no se encontraron relaciones entre esta característica de historia de vida con la temperatura, precipitación y disponibilidad de alimento. El intervalo entre nacimientos fue similar en ambos

sitios de estudio ($13,07 \pm 2,37$ meses en SC y $13,63 \pm 1,72$ meses en IB) con lo cual se refuta parte de la hipótesis principal de trabajo. Por otro lado, la mortalidad infantil fue mayor en IB (57,14%) con respecto a SC (10,53%) y se debió principalmente al infanticidio producto del reemplazo de machos adultos. También se encontraron diferencias entre los sitios con respecto al tiempo invertido en los distintos comportamientos que conforman el patrón de actividad. Las diferencias más notables fueron con respecto al tiempo invertido en movimiento independiente (16,4% en IB y 14,6% en SC), alimentación independiente (10,1% en IB y 13,5% en SC) y descanso (31% en IB y 35% en SC). En general, en SC los infantes invirtieron más tiempo en alimentación independiente, descanso y exploración que los infantes de IB. Y por el contrario, los infantes de IB invirtieron más tiempo en lactación, movimiento independiente, traslado e interacciones sociales afiliativas con las madres. Sin embargo, en ambos sitios se observó un patrón muy similar con respecto al tiempo invertido mes a mes en las distintas actividades del patrón de actividad. En ambos sitios, los infantes invirtieron más tiempo en interacciones sociales afiliativas con madres y otros individuos del grupo social (3,2% en IB y 3,1% en SC) que en interacciones agonísticas (0,2% en IB y 0,16% en SC). Por último, las variables utilizadas para medir el conflicto madre-infante (rechazo maternal, *distress* infantil, tiempo en contacto y establecer/romper contacto) indicaron que el conflicto fue mayor en IB, ambiente continuo, con mayor disponibilidad de recursos alimenticios a lo largo del año, mayor densidad ecológica y con mayor tasa de encuentros intergrupales (de características afiliativas, agresivas

y neutrales) con respecto a San Cayetano. En IB los infantes finalizaron la lactación a los $11,8 \pm 0,98$ meses y en SC a los $9 \pm 1,52$ meses. Sin embargo, en ambos sitios de estudio las manifestaciones de conflicto (rechazo maternal y *distress* infantil) comenzaron en el mes de nacimiento, se intensificaron entre los meses 3 y 7, y se prolongaron hasta el final del periodo infantil. La principal conclusión de esta tesis es que la comida disponible en los ambientes no puede ser considerada como el único factor determinante de los cambios producidos en la relación madre-infante como se considera tradicionalmente. La intensidad y duración del conflicto madre-infante puede verse influenciado por un efecto multicausal de factores que varían en el tiempo e incluyen factores sociales, demográficos, de historia de vida y ecológicos.

Summary

Comparative study of parent-offspring conflict in black and gold howler monkeys (Alouatta caraya) in two sites of northern Argentina

This comparative study addresses how food availability affects the length of the interbirth interval (IBI) and the intensity and timing of parent-offspring conflict (POC) in groups of black and gold howler monkeys (*Alouatta caraya*) living in forests that vary in floristic composition and structure, and food availability. I simultaneously used focal and instantaneous point sampling techniques

to record the behavior and interactions of 37 infants in 11 groups during 27 months (September 2008-November 2010; 1 day/month/infant) at Isla Brasilera (IB; $27^{\circ} 18' S - 58^{\circ} 38' W$) characterized by a continuous flooded forest over the Parana River and in a nearby fragmented semi-deciduous forest at San Cayetano (SC; $27^{\circ} 30' S - 58^{\circ} 41' W$). I collected 3.732 observation hours and 27.588 point samples. I also recorded births and infant mortality and I made monthly sampling of food availability. The main hypothesis of this work was that the forest with high abundance and constant availability of food throughout the year (IB), allow females shorten the IBI and the time in parental investment. I found similar IBIs in both populations (13 months) but infant mortality was higher in IB (57.14%) compared with SC (10.53%). Also, there were differences in the activity pattern between sites; infants from SC invested more time in feeding, resting, and exploration than infants from IB. Contrary, infants from IB invested more time in suckling, independent moving, transport, and affiliative social interactions with mothers. Finally, the variables used to estimate POC (time in contact, make and break contact, maternal rejection, and infant distress) showed that the conflict was higher at IB. This study suggests that POC can be influenced by a multi-causal effect of factors that vary over time and include demographic, social, and ecological factors and life-history.

Producción y evaluación de leches fermentadas probióticas con colesterol reducido

Yanina Lorena Pavón

yanipavon781@yahoo.com.ar

Director / Co-Director: Dr. Sergio Rozycki / Dra. Pilar Buera

Lugar de realización: Instituto de Tecnología de Alimentos. Área Lácteos. Facultad de Ingeniería Química. Universidad Nacional del Litoral.

Fecha de la defensa: 28/03/2014

Resumen

Hoy en día, existe una creciente demanda en el mercado de productos libres o bajos en contenido de grasa, porque se sostenía que la grasa láctea contiene ácidos grasos saturados (AGS) y colesterol que participan en el desarrollo de enfermedades cardíacas coronarias. Los AGS de esta grasa se están considerando, recientemente y por algunos investigadores, no hipercolesterolémicos; en cambio el colesterol puede generar compuestos oxidados que son aterogénicos, citotóxicos y carcinogénicos. La remoción parcial o total de la grasa de los productos lácteos disminuye la aceptabilidad por los consumidores, además de limitarse el aporte de ácidos grasos esenciales y vitaminas liposolubles asociados a la misma. Es por ello, que es deseable extraer sólo el colesterol, sin remover la grasa láctea. La β -ciclodextrina puede utilizarse para extraer el colesterol con un rendimiento cercano al 90%.

Los hidrocoloides aumentan la estabilidad física de los productos y las propiedades de *mouthfeel* (sensación en boca). La goma espina corona (GEC), es una galacto-

manano extraído de las semillas de *Gleditsia amorphoides*, un árbol que crece en América Latina. Debido a su similitud con la goma guar y garrofín (importadas), algunos autores consideran que podría reemplazarlas.

Por otro lado, el contenido de sólidos de la leche es incrementado mediante el agregado de leche en polvo descremada (LPD) y/o concentrado de proteínas de suero (WPC), al elaborar leches fermentadas (LF). Se ha demostrado que el agregado de estos ingredientes tiende a aumentar la firmeza y viscosidad del producto, y a su vez reducir la sinéresis (defecto principal de los productos lácteos coagulados). Además, las proteínas de suero poseen un elevado valor biológico. Sin embargo, la relación óptima en que estos aditivos deben adicionarse depende de las características texturales deseadas. Así mismo, las LF se plantean como uno de los mejores vehículos de microorganismos probióticos y para ayudar a combatir la deficiencia de calcio.

El objetivo de la siguiente tesis fue por un lado, producir y evaluar (físicoquímica, reológica, textural y sensorialmente) LF probióticas con colesterol reducido, adicionadas con hidrocoloides nacionales (gelatina, GEL; almidón modificado de mandioca, AMM y goma espina corona, GEC) o modificando su contenido en calcio y caseína. Además, se evaluó la capacidad fermentativa de sustratos prebióticos y aditivos espesantes y la supervivencia a diferentes condiciones simuladas gastrointestinales de diferentes cepas aisladas de productos del mercado europeo y otras provenien-

tes de una colección propia de la Universidad de Bologna. Los microorganismos que mostraron mejores aptitudes se inocularon en una matriz láctea para evaluar también su supervivencia.

Los resultados mostraron que fue posible remover eficientemente el colesterol de la leche (porcentaje de extracción superior a 85%) utilizando β -ciclodextrina y el recuento de microorganismo probiótico fue siempre superior a 7 log UFC/g.

Para ambos casos de estudio, se logró caracterizar la composición química de las muestras obtenidas, según los diseños adoptados en cada caso, y obtener coágulos de gran estabilidad (sinéresis casi nula) cuanto mayor fue el contenido de los hidrocoloides estudiados. Se conservaron adecuadamente las características organolépticas y los defectos sensoriales encontrados fueron calificados como “apenas perceptibles” en la mayoría de las experiencias.

Se comprobó que la GEL afecta principalmente las características reológicas, mientras que la GEC influye más sobre las propiedades sensoriales de los productos. El AMM parece no tener influencia significativa sobre las características estudiadas. La GEL gobierna la consistencia, viscosidad y tixotropía de las LF, y las aleja más del comportamiento newtoniano ($n=1$). La GEC enmascara la aspereza y astringencia, y genera productos con mayor cremosidad. Por su parte, el agregado de calcio y caseína aumentó la consistencia y viscosidad de las LF debido a una mayor asociación del calcio con las micelas de caseína y entre ellas. Así mismo, parámetros como dureza y adhesividad estuvieron asociados directamente con el contenido del mineral.

Por otro lado, la GEC fue el único aditivo

espesante que pudo ser utilizado por algunas cepas de bifidobacterias, mientras que la GEL y el AMM no fueron metabolizados por ningún microorganismo. De los compuestos prebióticos comerciales ensayados, GOS y FOS fueron los sustratos más utilizados. De las especies testeadas en los ensayos de supervivencia en condiciones gastrointestinales, resistencia a antibiótico y viabilidad en la matriz láctea, se determinó que *B. animalis* ssp. *lactis* MB29 (Colección Scardovi de la Universidad de Bologna) fue la que mejores aptitudes mostró tener frente a los parámetros estudiados.

Desde un punto de vista económico, sensorial y textural la GEC tiene el potencial de transformarse en una importante goma comercial, como nuevo hidrocoloide para utilizar en productos lácteos con un precio mucho menor y la consecuente sustitución de importaciones.

Summary

Development and evaluation of cholesterol-reduced probiotic yogurts

Today, there is a growing demand in the market for free or low fat products. Cholesterol is associated with coronary heart disease so, its removal is desirable in food products while dairy fat is preferable to be present because of its mouthfeel and essential fatty acid content and lipophilic vitamin associated. Partial or total removal of fat from dairy products decreases the perceived overall acceptability by consumers. The β -cyclodextrin was suggested as an alternative to extracting the cholesterol with a yield close to 90%. The effects of hydrocolloids (gelatin, GEL; espina corona gum, ECG, and cassava modified starch, CMS) and calcium/casein content on tex-

tural, physicochemical and sensory properties of cholesterol-reduced probiotic yogurts were studied in two different experimental designs. The results showed that it was possible to efficiently remove the cholesterol (> 85%) and probiotic microorganism counts were > 7 log CFU.g⁻¹. GEL and calcium affect texture, consistency and viscosity, while ECG imparted better sensory characteristics (it masks the grittiness and astringency, and generates products with more creaminess). CMS and casein affect

in minor proportion. Susceptibility to syn-eresis is inversely related to the amount of stabilizers and calcium/casein added during shelf life. ECG was the only thickener used by some *Bifidobacterium* species. From an economical, sensory and textural point of view, ECG has the potential of becoming an important commercial gum as a novel source of food hydrocolloid, with priced fairly minor and in replacement of imported gums (like guar gum).

Caracterización funcional de los factores de transcripción vegetales pertenecientes a la familia HD-Zip que participan en los mecanismos de respuesta al estrés

Delfina Adela Ré

delfina.a.re@gmail.com

Director / Co-Director: Gustavo Bonaventure / Raquel Chan

Lugar de realización: Instituto de Agrobiotecnología del Litoral. Cátedra de Biología Celular y Molecular. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral.

Fecha de la defensa: 11/03/2014

Resumen

Las plantas son organismos que se enfrentan constantemente a cambios del ambiente en el que se encuentran, y al no poder trasladarse en busca de nutrientes o de mejores condiciones, deben adaptarse continuamente a estas modificaciones. Para desarrollarse correctamente necesitan de un fino control de sus moléculas efectoras y respuestas a señales externas e internas. En este proceso de control intervienen fundamentalmente los factores de transcripción

(FTs), proteínas que reconocen secuencias específicas de ADN y regulan la expresión génica de sus blancos. Éstas modifican el transcriptoma vegetal, generando respuestas rápidas a los cambios externos. La familia de FTs *HD-Zip* es exclusiva de plantas, por lo que resulta particularmente interesante su estudio en el contexto del desarrollo vegetal y de las respuestas moleculares a las condiciones externas. En este trabajo de Tesis caracterizamos funcionalmente tres FTs de la subfamilia HD-Zip I. Dos de éstos, de *Arabidopsis thaliana*, de los cuales se tenía información sobre su regulación por condiciones de estrés hídrico, AtHB12 y AtHB7. El tercero, NaHD20, era hasta el momento de este estudio un miembro desconocido de *Nicotiana attenuata* que comparte una alta similitud de secuencia con los dos primeros.

Se obtuvieron distintos genotipos de plantas transgénicas y mutantes, a saber: plantas de *N. attenuata* silenciadas en el gen

NaHD20, plantas mutantes de *Arabidopsis* en los genes AtHB12, AtHB7 y silenciadas para ambos genes, y también plantas que sobreexpresan ectópicamente AtHB12 o AtHB7. Éstas fueron utilizadas en estudios fenotípicos y moleculares que ayudaron a comprender la funcionalidad de los tres FTs. La expresión de NaHD20 se indujo por el tratamiento con las hormonas ácido jasmónico, ácido salicílico y ácido abscísico (ABA) y por estrés hídrico. Este FT se expresa fuertemente en las flores, particularmente en la corola, de *N. attenuata*. Mediante ensayos fenotípicos de desarrollo se demostró que NaHD20 controla el aumento de los niveles de ABA de las hojas cuando las plantas se encuentran en condiciones de deshidratación y regula la producción y apertura de flores tanto en condiciones normales como de estrés hídrico severo. NaHD20 también induce el desarrollo y la apertura de las flores, controlando los niveles de la hormona ABA. Durante la apertura de la corola, este FT regula positivamente la emisión del compuesto volátil floral, acetona de bencilo, responsable de atraer a los polinizadores de esta especie. Respecto de AtHB12 y AtHB7, observamos que su una expresión es dependiente del estadio de desarrollo de la planta. AtHB12 se expresa especialmente en estadios tempranos, controlando el desarrollo foliar y radicular durante el estadio vegetativo. AtHB7 aumenta su expresión cuando la planta pasa al estadio reproductivo, y allí induce el desarrollo foliar, la producción de clorofila y la fotosíntesis. Ambos FTs se regulan entre sí, afectado la expresión de su parálogo.

Cuando las plantas deben enfrentar limitaciones en la disponibilidad de agua, estos FTs se inducen fuertemente aunque actúan cada uno de manera diferente. AtHB12

regula el consumo mientras que AtHB7 controla la pérdida de agua a través del cierre estomático. AtHB12 tiene un efecto positivo en la producción de semillas en situación de estrés hídrico leve. Ninguno de los dos FTs es indispensable para la supervivencia a las condiciones de estrés hídrico pero la expresión de al menos uno de ellos es necesaria para la correcta producción final de semillas.

Los resultados presentados en esta Tesis permiten concluir que NaHD20, AtHB12 y AtHB7 participan en mecanismos relacionados al estrés hídrico y a la hormona ABA. Las tres proteínas regulan mecanismos del desarrollo vegetal ligados a estrés de tipo abiótico. NaHD20 participa particularmente en los mecanismos de desarrollo floral y respuestas a estrés hídrico. AtHB12 tiene funciones en raíces y hojas en estadios tempranos, y en la producción de semillas en plantas sometidas a estrés. AtHB7 tiene funciones en hojas de plantas de estadios tardíos. En cuanto a AtHB12 y AtHB7, considerados duplicaciones génicas, coordinan finamente la regulación de los procesos en los que están involucrados; ambos intervienen en procesos muy similares y cercanos pero cada uno en un momento distinto del desarrollo, no superponiéndose en sus funciones.

Summary

Functional Characterization of HD-Zip family transcription factors that participate in stress responses mechanisms

Plants are sessile organisms continuously dealing with environmental changes. They use Transcription factors (TFs) in order to finely control the responses to internal and external changes. The *Arabidopsis thaliana* AtHB12 and AtHB7 are paralogues, known to be involved in water stress

responses. NaHD20 from *Nicotiana attenuata* was unknown so far and presents high sequence similarity with the first two. Aiming to contribute to the understanding of HD-Zip TFs functionality, transgenic plants were obtained as follows: *N. attenuata* silenced in *NaHD20*, Arabidopsis single mutants and double silenced plants for *AtHB7* and *AtHB12* and plants ectopically expressing these genes. The phenotype of these plants was deeply analysed.

The results indicated that *AtHB7* and *AtHB12* are part of a feedback loop that regulates each other expression either positively or negatively, depending on the developmental stage and environmental conditions. The results also showed that *NaHD20* controls ABA levels in leaves dur-

ing water stress and regulates flowers production and opening in both control and stress conditions. During the opening of the corolla, *NaHD20* regulates the release of the volatile compound, benzyl acetone, responsible for pollinators attraction.

We conclude that these three TFs participate in mechanisms involved in water stress and ABA responses. *NaHD20* acts primarily in flowers development, *AtHB12* in roots and leaves growth in early developmental stages while *AtHB7* in advanced developmental stages. Regarding *AtHB12* and *AtHB7*, considered as gene duplications, a feed-back loop allows them to regulate each other expression finely coordinating the functions in which they are involved.

Efectos de la exposición postnatal a estrógenos ambientales (xenoestrógenos) sobre el desarrollo folicular en ovejas

Med. Vet. Oscar Edgardo Rivera

oerivera@yahoo.com

Director: Dr. Enrique Hugo Luque. Co-Direc-

tor: Dra. Jorgelina Guadalupe Varayoud

Lugar de realización: Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes.

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

Fecha de la defensa: 25/02/2014

Resumen

El término perturbador endocrino (PE) hace referencia a aquellas sustancias que tienen la capacidad de imitar o antagonizar a las hormonas endógenas. Según la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos se define a un PE como una "sustancia o mezcla de sustancias exóge-

nas que altera una o más funciones del sistema endócrino y en consecuencia causa efectos adversos en la salud de un organismo intacto, su progenie o subpoblaciones". Algunos PEs que han sido asociados con efectos sobre el desarrollo y la reproducción imitan la actividad del 17beta-estradiol (E2) y se hipotetizó que estas sustancias podrían ser responsables de varias patologías reproductivas tanto en humanos como en animales. Entre los PEs más utilizados y estudiados podemos mencionar a dos xenoestrógenos sintéticos: Bisfenol A (BPA) y Dietilestilbestrol (DES). DES es un potente xenoestrógeno. BPA es un químico de la industria plástica con un alto volumen de producción. Los compuestos seleccionados para el presente estudio

poseen alto impacto ambiental. Las dosis utilizadas fueron semejantes a las determinadas por otros estudios como presentes en el ambiente y a las cuales los animales y el hombre están cotidianamente expuestos.

Objetivos: Determinar si la exposición postnatal temprana a los xenoestrógenos DES ó BPA altera el desarrollo del ovario de la oveja. Estudiamos: la dinámica folicular ovárica estableciendo el número de folículos de cada una de las distintas poblaciones foliculares; la expresión de moléculas asociadas al ciclo de división celular; el porcentaje de folículos atrésicos y la incidencia de folículos multiovulares (FMOs); los cambios en la esteroidogénesis ovárica y la respuesta a un tratamiento gonadotrófico. Adicionalmente estudiamos el patrón de expresión de receptores esteroides en el ovario de corderas controles durante el primer mes de vida, con el propósito de determinar su ontogenia en el momento que los animales serán expuestos a los xenoestrógenos. **Materiales y Métodos:** Se realizaron 3 experimentos: **Exp.1:** Se estudió mediante inmunohistoquímica (IHQ) la ontogenia de los receptores de hormonas esteroides en los días postnatales 1, 5, 10 y 30. **Exp. 2:** Las corderas se identificaron y fueron asignadas al azar a alguno de los siguientes tratamientos postnatales administrados diariamente por SC desde el DPN 1 (día del nacimiento) al DPN 14: 1) Control a los que se les administró aceite de maíz (vehículo) (n=10); 2) DES dosis: 5 µg/kg/día (n=6); 3) BPA50: 50 µg/kg/día (n=6). En el DPN 30 se les practicó ovariectomía. Se evaluó: el peso del órgano, dinámica folicular, reserva total de ovocitos, incidencia de FMOs y porcentaje de folículos atrésicos; expresión por IHQ de receptores de hormonas esteroides y marcadores asociados al ciclo de división

celular. En el DPN 30 se tomaron muestras de suero para estudiar esteroidogénesis. **Exp.3:** Fue diseñado para investigar si la exposición postnatal a xenoestrógenos afecta la funcionalidad ovárica. Se utilizaron corderas expuestas postnatalmente a xenoestrógenos según el diseño del experimento 2 con el agregado de un grupo de animales expuestos a BPA con una dosis 100 veces inferior a la dosis segura (0,5 µg/kg/día). Luego en el DPN 30 todos los animales fueron sometidos a un tratamiento gonadotrófico de superestimulación folicular con FSH ovina. Se determinó: número de folículos iguales o mayores a 2 mm, el porcentaje de folículos atrésicos y la expresión de receptores esteroides. También se obtuvieron muestras de suero al inicio del tratamiento gonadotrófico y al final del mismo para determinar los niveles circulantes de E2 por radioinmunoensayo. **Resultados:** Los resultados demuestran que: a) Durante el periodo de exposición a los xenoestrógenos seleccionados el ovario de la cordera expresa receptores esteroides en diferentes compartimientos tisulares b) Las corderas expuestas a DES y BPA presentaron una disminución de la reserva de folículos primordiales y un aumento del desarrollo folicular. c) La exposición a BPA redujo el peso ovárico e incrementó la incidencia de FMOs. d) La exposición neonatal a BPA y DES redujo el pool de folículos primordiales al estimular su reclutamiento inicial así como el subsecuente desarrollo folicular hasta el estadio antral. Esta aceleración en la foliculogénesis en corderas prepuberales tuvo como consecuencia un mayor número de folículos atrésicos. e) Las corderas expuestas a BPA o DES desarrollaron un menor número de folículos ≥ 2 mm y menor número de folículos atrésicos en

respuesta al tratamiento con oFSH. f) alteración en la respuesta esteroideogénica. La exposición postnatal a dosis bajas de BPA y DES alteró tanto el desarrollo como la funcionalidad ovárica en el modelo utilizado. Las dosis utilizadas para el presente trabajo son dosis bajas y en el caso de BPA seleccionamos la dosis definida como segura (50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ BPA). Los efectos detectados no sólo en este trabajo sino en publicaciones previas con otras especies, implican la necesidad de una revisión en las dosis definidas como seguras para BPA.

Summary

Effects of postnatal exposure to environmental estrogens on ovarian follicular dynamics in lambs

The term endocrine disruptor (ED) refers to those substances which have the ability to imitate or antagonize endogenous hormones. Among most used and studied EDs we can mention two synthetic xenostrogens: Biphenol A (BPA) and diethylstilbestrol (DES). The objective was determine whether early

postnatal exposure to DES or BPA affects the development of the sheep's ovary and may cause reproductive consequences during adulthood. The work was divided into 3 experiments: 1) By IHQ, the ontogeny of the receptors of steroid hormones (RE α , RE β , RA) on samples of lambs ovaries on postnatal days 1, 5, 10 and 30 was studied. 2) We determined the effects of the exposure to xenostrogens on the development of the ovary on postnatal day 30. 3) It was designed to study whether the postnatal exposure to xenostrogens affects the ovarian functionality. Results: a) Lambs neonatally exposed to DES and BPA showed a decrease in primordial follicles reserves and an increase of follicular development. b) The exposure to BPA reduced the ovarian weight and raised the incidence of MOFs. c) Lambs neonatally exposed to DES and BPA developed a lower number of follicles ≥ 2 mm and a lower number of atretic follicles in response to oFSH treatment. Postnatal exposure to low doses of BPA and DES altered both the development and ovarian functionality in the model used.

Aplicación de modelado quimiométrico a datos de segundo orden como herramienta para la corrección de problemas de interferencias en la determinación de analitos en muestras complejas

Agustina V. Schenone

aschenone@fbc.unl.edu.ar

Director: Dr. Héctor C. Goicoechea. Co-

Director: Dra. María J. Culzoni

Lugar de realización: Laboratorio de Desarrollo Analítico y Quimiometría. Cátedra de Química Analítica I. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral.

Fecha de defensa: 20/03/2014

Resumen

En la presente tesis se desarrollaron métodos de análisis combinando distintos tipos de señales instrumentales con herramientas quimiométricas adecuadas, que permitieron extraer información relevante de cada muestra y cuantificar los analitos aún

en presencia de interferencias no modeladas. Específicamente, en este trabajo se analizaron datos de dos vías con algoritmos que presentan la ventaja de segundo orden para solucionar distintos tipos de problemas analíticos, entre los que podemos mencionar datos no trilineales, efecto de filtro interno y datos con pérdida de bilinealidad.

En el Capítulo 2 se presenta el desarrollo de un método cromatográfico rápido con detección de arreglo de diodos para la determinación de tres colorantes sintéticos: tartrazina, amaranto y amarillo ocaso, en muestras de bebidas no alcohólicas comerciales. El método consistió en utilizar una fase móvil que permitiera una elución rápida de los componentes. La generación de datos de segundo orden presentó corrimiento de picos entre los diferentes cromatogramas, originando datos no trilineales. Éstos no pudieron ser modelados satisfactoriamente por U - PLS/RBL. Por el contrario, MCR-ALS arrojó resultados aceptables. El tiempo de análisis del método propuesto se redujo a un 14.2% con respecto a la separación completa de los colorantes permitiendo ahorrar tiempo y solventes, reduciendo el costo por análisis y el impacto ambiental.

En el Capítulo 3 se evaluaron los algoritmos MCR-ALS y U-PCA/RBL en el análisis de datos no lineales obtenidos a través del seguimiento de una reacción cinética utilizando un sistema FIA de flujo interrumpido. Se determinó tartrazina en presencia de azul brillante y amarillo ocaso en distintos tipos de bebidas. Se aplicaron ambos algoritmos para remover la contribución de componentes inesperados no incluidos en la calibración. A continuación, los datos obtenidos fueron modelados con una función polinomial. MCR-ALS fue el único algoritmo que permitió una determinación exacta de tar-

trazina en las muestras de validación por lo que se aplicó a los datos de las muestras reales. Los resultados se compararon con los arrojados por un procedimiento cromatográfico clásico. Se pudo establecer que MCR-ALS puede manejar este tipo de datos y generar resultados comparables a los obtenidos con el método separativo.

En el Capítulo 4 se demostró que se puede disminuir el trabajo experimental para la determinación de un analito en presencia de compuestos inesperados y efecto de filtro interno, sin tener que aplicar el método de adición estándar. La metodología propuesta consiste en el modelado de matrices de excitación-emisión con PARAFAC combinado con transferencia de calibración para la cuantificación de felinefrina en muestras de agua en presencia de ibuprofeno, aspirina y paracetamol (filtro interno en el rango de trabajo). Además, esta estrategia permitió mantener la sensibilidad de la curva de calibrado en ausencia de efecto de filtro interno manteniendo cifras de mérito aceptables. Los resultados fueron comparados con los obtenidos al aplicar el método de adición estándar convencional combinado con PARAFAC. Esta metodología puede ser una herramienta útil para determinar fármacos presentes en ambientes acuáticos y para evaluar el efecto de las plantas de tratamiento de efluentes en su eliminación.

En el Capítulo 5 se desarrolló un método para la determinación de doxorrubicina en muestras de plasma en presencia de riboflavina utilizando matrices de espectroscopia de fluorescencia sincrónica total. La característica más importante de este trabajo es la obtención de la ventaja de segundo orden por primera vez para datos no bilineales. Esto se logró de dos maneras: a) aplicando MCR-ALS a datos de primer orden (desdo-

blando las matrices) y b) U-PLS/RBL. Con respecto a MCR-ALS se demostró la obtención de la ventaja de segundo orden cuando se modelan datos de primer orden y se aplica de la restricción de correlación. El rendimiento de ambas metodologías demostró ser muy satisfactorio.

En el Capítulo 6 se presentó un nuevo algoritmo que modela datos no bilineales denominado cuadrados mínimos parciales con modelado residual de datos no bilineales (U-PLS/RMNB) donde los perfiles correspondientes a las interferencias son extraídos por modelado de los datos desdoblados con MCR-ALS e incorporados en el paso de minimización que modifica los coeficientes de la regresión PLS. Se analizaron datos simulados y experimentales. Los resultados se compararon con los arrojados por MCR-ALS, U-PLS/RBL y PARAFAC para mostrar cómo la pérdida de bilinealidad afecta el modelado y la habilidad de predicción de este tipo de algoritmos.

Summary

Application of chemometric modelling to second order data as a tool for interference correction in the determination of analytes in complex samples

In the present thesis, new analytical tech-

niques were developed and validated with the combination of simple instrumentation and suitable chemometrics algorithms. The proposed methods enabled the determination of different compounds present in samples of complex composition as additives in food samples, and drugs in biological materials and in environmental samples. The successful implementation of these methods allowed solving problems related to incomplete separation of components in a mixture, the presence of unmodeled species and/or matrix effect. The analyzed systems involved the use of second order data, within which non trilinear data and data with loss of bilinearity were modelled. The algorithms used throughout the thesis were MCR-ALS, PARAFAC, U-PLS/RBL y U-PCA/RBL. Furthermore, a new algorithm that models non bilinear data called partial least squares with no residual bilinear modeling data (U-PLS/RMNB) was developed.

The analytical methods selection was based in improving the accuracy, precision, sensitivity and / or selectivity using different strategies. The environmental impact, simplicity, feasibility of simultaneous analysis, the lowest analysis time and decreased volumes of solvents used were also taken into account, which leads to a decrease in costs.

Desarrollo de un sistema de biopreservación para sangre aviar obtenida en mataderos

María Virginia Zbrun

mvzbrun@fcv.unl.edu.ar

Director: Dr. Marcelo R. Rosmini

Co-Director: Dr. Marcelo L. Signorini

Lugar de realización: Laboratorio de Análisis de Alimentos. Departamento de Salud Pública. Facultad de Ciencias Veterinarias.

Universidad Nacional del Litoral.

Fecha de la defensa: 10/03/2014

Resumen

La recuperación y utilización de proteínas provenientes de sangre animal obtenida en mataderos, considerando todas las espe-

cies que son faenadas anualmente, significa un volumen importante el cual podría ser utilizado para paliar la grave deficiencia de proteínas que existe a nivel mundial. Asimismo, la utilización de este subproducto impactaría de manera positiva en el ambiente ya que se evitaría la contaminación provocada por la sangre vertida a los lechos de agua sin tratamiento previo. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un sistema de biopreservación (SB) de sangre aviar obtenida en mataderos conformado por Bacterias Ácido Lácticas (BAL) y aditivos que permita extender su vida útil reduciendo de esta forma la necesidad de procesamiento inmediato. Se realizaron aislamientos de BAL desde sangre aviar obtenida en matadero y se realizó una selección de las mismas con base en la capacidad de inhibir bacterias alterantes/patógenas (A/P) presentes en la misma. Luego se evaluó la capacidad de las BAL seleccionadas de desarrollarse en sangre con diferentes aditivos. De esta forma, el SB quedó conformado por *E. faecalis* DSPV 008SA y *L. salivarius* DSPV 032SA más los aditivos (lactosa bacteriológica 2%, extracto de levadura 0,4%, citrato de amonio 0,4% y cloruro de sodio 1%). Luego de incubar sangre de matadero con el SB durante 24 h a 30°C, se observaron menores recuentos de las poblaciones microbianas indicadoras (enterobacterias totales, coliformes, *Pseudomonas* spp. y *S. aureus*) que en la sangre de matadero utilizada como control. El descenso de pH colaboró con el pobre desarrollo de los microorganismos A/P pero a su vez fue controlado para evitar la coagulación de las proteínas evitando así una dificultad en el procesamiento tecnológico. Además se observó que en la sangre inoculada con el SB, el proceso de hemólisis

fue menor indicando una mejora en la calidad del producto tratado. Con base en estos resultados se concluye que la aplicación del SB en sangre aviar obtenida en matadero reduce la carga microbiana contaminante/alterante extendiendo la vida útil, evitando que el procesamiento de la misma sea inmediato manteniendo de forma adecuada las características tecnológicas más importantes (bajo nivel de hemólisis y acidez).

Summary

Development of a system for avian blood biopreservation obtained in slaughter

The recuperation and utilization of animal blood proteins is of utmost importance if we consider the amount of bovine, porcine and poultry that are slaughtered annually and the high levels of protein deficiencies in the world. The use of this subproduct would impact positively on environment because the untreated slaughterhouse blood would not be eliminated into municipal sewage systems or rivers. The objective of this study was to investigate the use of indigenous lactic acid bacteria (LAB) and additives as slaughterhouse blood biopreservative system (BS) against spoilage/pathogen microbiota. Also, BS impact in blood pH and blood hemolysis was investigated. The BS was integrated by two LAB (*E. faecalis* DSPV 008SA, *L. salivarius* DSPV 032SA) and four additives (bacteriological lactose 2%; yeast extract 0.4%; ammonium citrate 0.4%; sodium chloride 1%). After 24 h at 30°C, lower counts of enterobacterias, coliforms, *Pseudomonas* spp., and *S. aureus* were obtained in blood containing BS in comparison with the non-inoculated blood. An ability of LAB to prevent blood's hemolysis was observed. Decrease in blood pH impacted directly on the reduced devel-

opment of spoilage microorganisms; however pH blood must be controlled with the aim to prevent proteins coagulation. On the basis of these results it seems worthwhile to supplement blood with BS to avoid undesirable changes during storage and during the

time before it is processing. The application of biopreservation system to blood could reduce the microbiological load, extending its shelf life, and thus avoiding immediate processing after blood collection.

Interacciones bioquímico-nutricionales del *c9,t11*-CLA y de la mezcla *c9,t11*-CLA + *t10,c12*-CLA con aceites ricos en ácidos grasos insaturados de las series n-3, n-6, y n-9 en animales de experimentación

María Victoria Scalerandi

mvscalerandi@fbc.unl.edu.ar

Director / Co-Director: Dr. Claudio A. Bernal / Dra. Marcela A. González

Lugar de realización: Cátedra de Bromatología y Nutrición. Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral.

Fecha de la defensa: 14/04/2014

Resumen

Los conjugados del ácido linoleico (CLA) son un grupo de isómeros posicionales y geométricos del ácido linoleico con dobles enlaces conjugados. Los principales orígenes de los CLA en la dieta habitual humana son los alimentos derivados de rumiantes, tales como lácteos y carnes, en los cuales predomina el isómero *c9,t11*-CLA (ácido ruménico) (>80%). Sin embargo, comercialmente hay disponibles suplementos dietarios y ayudas ergogénicas derivados de procesos de síntesis química, conteniendo cantidades equimoleculares de *c9,t11*-CLA y *t10,c12*-CLA (aprox. 35-45% de cada uno). Estudios desarrollados principalmente en modelos animales, han demostrado una

variedad de efectos funcionales de los CLA sobre la salud, incluyendo efectos anticarcinogénicos, antiaterogénicos y antiobesogénicos. No obstante, en ratones ciertos efectos negativos también han sido observados, como hepatomegalia y esteatosis. Ambos tipos de isómeros poseen efectos específicos y diferenciales relacionados a numerosos factores. Entre ellos, el entorno metabólico-nutricional y específicamente las diferentes proporciones relativas de ácidos grasos insaturados (AGI) de las series n-9, n-6 y n-3 podrían ser fundamental para modular el efecto de los distintos isómeros CLA. Por lo tanto, el objetivo general de la tesis fue investigar algunos efectos metabólico-nutricionales potencialmente benéficos y/o adversos de las interacciones del *c9,t11*-CLA y de la mezcla equimolecular de *c9,t11*-CLA + *t10,c12*-CLA con aceites ricos en diferentes tipos de AGI en un modelo experimental con ratones. Para tal fin, ratones CF1 macho, jóvenes, fueron alimentados durante 30 días con dietas conteniendo aceite de oliva (O), aceite de maíz (M) o aceite de canola (C), suplementadas con aceite rico en *c9,t11*-CLA (AR) o con una mezcla equimolecular de CLA (Mix). Los

aceites dietarios utilizados contienen distintas relaciones de AGI n-9, n-6 y n-3 (ácido oleico/ ácido linoleico/ ácido α -linolénico en O: 55,2/17,2/0,7, M: 32,0/51,3/0,9 y C: 61,1/18,4/8,6), y representan patrones de dietas habituales. El trabajo se focalizó en aspectos nutricionales y del metabolismo lipídico: cambios en la ganancia de peso, adiposidad y composición corporal, incorporación tisular de isómeros CLA y ácidos grasos (AG), perfil de lípidos plasmáticos y tisulares, cambios histológicos y lipoperoxidativos a nivel hepático, y mecanismos involucrados en la regulación de AG y triglicéridos (TG) en suero y tejidos.

Los resultados mostraron que, ratones alimentados con Mix presentaron una profunda disminución de la ganancia de peso, de la adiposidad visceral y de los depósitos grasos en músculo esquelético, asociado a hepatomegalia y esteatosis hepática. La reducida masa grasa estuvo asociada en el tejido adiposo, a una baja captación de AG, a bajos niveles de AG adipogénicos y a una reducción en la capacidad lipogénica. En cambio, la reducción en los TG musculares fue debida a una mayor oxidación mitocondrial de AG. Este cuadro lipoatrófico, fue acompañado de hipertrigliceridemia y modificaciones en el metabolismo de lípidos tisulares, los cuales fueron modulados por el origen de grasa dietaria. Los mecanismos involucrados en la hipertrigliceridemia estuvieron asociados a una reducida remoción de TG por el tejido adiposo, que en el caso de los animales alimentados C+Mix estuvo además relacionado con una mayor secreción de TG hepática que previno la esteatosis. Una elevada lipogénesis hepática en todos los animales suplementados con Mix, en conjunción a desequilibrios en la biosíntesis de ácidos grasos poliin-

saturados de cadena larga de las familias n-6 y n-3 condujeron a un marcado cuadro inflamatorio hepático que se mostró más acentuado en los animales alimentados con aceite de maíz y atenuado en aquellos con aceite de canola.

Un cuadro metabólico muy diferente estuvo presente en los animales suplementados con AR, los cuales manifestaron efectos antiobesogénicos más atenuados, pero sin esteatosis y hepatomegalia. Estos efectos estuvieron presentes a pesar de una mayor lipogénesis en hígado y tejido adiposo epididimal, como de ciertas alteraciones histológicas en hígado. La mayor lipogénesis hepática fue compensada por una elevada secreción de TG que evitó la acumulación de lípidos en dicho tejido. La mayor secreción de TG hepática inducida por el AR fue contrarrestada en el grupo C+AR, pero no en el M+AR, por una mayor remoción de TG a nivel muscular. Así en los animales alimentados con aceite de maíz se observaron los menores efectos benéficos por la suplementación con AR, dado que además, un significativo estado inflamatorio hepático con alteraciones histológicas estuvo presente. Si bien en el grupo C+AR se observó el mayor efecto antiobesogénico del AR, los animales alimentados con O+AR mostraron que la acción preventiva de la acumulación de grasa fue asociada a niveles normales de TG en suero, hígado y músculo esquelético. Por lo tanto se puede concluir que: 1) los efectos antiobesogénicos y lipoatróficos del Mix, pueden ser modulados por la composición de la grasa dietaria; 2) si bien el AR posee menor acción funcional antiobesogénica que el Mix, los efectos negativos son escasos; y 3) los mejores efectos funcionales de los CLA, con menor grado de disturbios

metabólicos han sido encontrados en los animales alimentados con aceite de oliva suplementados con AR.

Summary

Biochemical-nutritional interactions between c9,t11-CLA or the mixture c9,t11-CLA + t10,c12-CLA and oils rich in n-3, n-6 and n-9 unsaturated fatty acids in experimental animals.

Conjugated linoleic acid (CLA) is a collective term used to describe the mixture of positional and geometric isomers of linoleic acid with conjugated double bonds. The major sources of CLA in the natural human diet are foods derived from ruminants, such as dairy products and beef, and in these products the predominant CLA isomer is c9,t11-CLA (rumenic acid) (> 80%). However, CLA are commercially available as dietary supplements and ergogenic aids derived from chemical synthesis processes, containing equimolecular proportions of c9,t11-CLA and t10,c12-CLA (35-45% of each).

The general aim of this doctoral thesis was to investigate some potential beneficial

and/or adverse effects of the interactions of c9,t11-CLA (RA) and the equimolecular mixture of c9,t11-CLA+t10,c12-CLA (Mix) with edible oils rich in different types of unsaturated fatty acids (UFA) in an experimental mouse model. For this purpose, growing mice were fed diets containing different proportions of n-9, n-6 and n-3 UFA provided by olive, maize and rapeseed oils supplemented with RA rich oil or with Mix for 30 days. The research focused on nutritional parameters and lipid metabolism.

The results showed that mice fed the Mix decreased the body weight gain, visceral adiposity and fat depots in the skeletal muscle, associated with hypertriglyceridemia, hepatomegaly, hepatic inflammatory state and steatosis. This lipotrophic status and changes in lipid metabolism were modulated by the source of dietary fat. A very different metabolic state was present in RA-supplemented animals, which showed attenuated antiobesogenic effects, but without hepatomegaly, hepatic steatosis and hypertriacylglyceridemia observed by Mix supplementation.