

RESÚMENES DE TESIS: DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Efectos de la exposición perinatal a estrógenos ambientales sobre la diferenciación de la glándula mamaria durante la gestación y la lactancia

Gabriela Anahí Altamirano

galtamirano@fbc.unl.edu.ar

Directora: Dra. Laura Kass

Co-directora: Dra. Mónica Muñoz de Toro

Lugar de realización: Instituto de Salud y Ambiente del Litoral. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral

Fecha de defensa: 10 de marzo de 2017

En la mayoría de las especies, la leche es la única fuente de alimentación del recién nacido, por lo tanto, debe contener todos los nutrientes esenciales para su normal crecimiento y desarrollo. En esencia, la leche está compuesta principalmente por proteínas, glóbulos grasos, lactosa, calcio y agua, y esta composición depende de un correcto desarrollo alveolar y diferenciación bioquímica y estructural de las células alveolares. Además, factores ambientales y la dieta materna pueden afectar la composición láctea. Por lo tanto, cualquier interferencia con el crecimiento y la diferenciación de la glándula mamaria podría inducir cambios en la lactancia de las madres. El objetivo de la presente tesis doctoral fue analizar la influencia de la exposición perinatal a los estrógenos ambientales, Bisfenol A (BPA) y Dietilstilbestrol (DES), sobre el desarrollo funcional de la glándula mamaria de la rata durante la gestación y la lactancia. Para ello, se utilizaron ratas hembras preñadas de la cepa Wistar (F0) que fueron expuestas a través del agua de bebida a 0, 0.6 y 52 µg de BPA/kg/día o 5 µg de DES/kg/día desde el día de gestación 9 (DG9) hasta el destete. Una vez destetadas, las crías hembras F1 se transfirieron a un ambiente libre de xenoestrógenos y a los 90 días de edad fueron apareadas con machos de fertilidad comprobada. Luego de la confirmación de la preñez, los animales fueron distribuidos en diferentes experimentos para evaluar la influencia de la exposición perinatal a BPA ó DES sobre la síntesis, composición y producción de leche materna durante la gestación y lactancia, así como también los mecanismos moleculares involucrados en la regulación del gen de β -Caseína (β -Cas) al inicio de la lactancia.

Nuestros resultados demostraron que el tratamiento perinatal con estrógenos ambientales indujo un retraso en la maduración alveolar mamaria durante la gestación e inicio de la lactancia, restableciéndose a mitad de la misma. Además, la exposición perinatal a BPA ó DES alteró el patrón de producción de leche de hembras F1 durante la lactancia sin modificar el peso de las crías F2, indicando que la exposición a estrógenos ambientales modificaría la calidad de la leche. Teniendo en cuenta este resultado, analizamos la calidad de la leche producida por las hembras F1 lactantes y demostramos que la exposición perinatal a BPA alteró tanto la síntesis y/o secreción de las proteínas como de los lípidos de la leche al final de la gestación y durante lactancia.

La proteína de la leche más afectada por la exposición perinatal a BPA ó DES fue β -Cas, la exposición a estos estrógenos ambientales indujo una disminución en su expresión en glándula mamaria tanto al final de la gestación como durante la lactancia e inclusive en las muestras de leche extraída en día de lactancia 14. Además, demostramos que la menor expresión de β -Cas, durante la activación secretoria de la glándula mamaria, causada por la exposición perinatal a BPA se produce a través de diferentes mecanismos moleculares que actúan sinérgicamente. Siendo las modificaciones epigenéticas un potencial mecanismo de acción del BPA en este modelo experimental.

Por otro lado, la exposición perinatal a BPA también modificó el ensamblaje y/o secreción de los glóbulos grasos de la leche, así como su tamaño durante la activación secretoria de la glándula mamaria, y modificó la concentración láctea de lípidos totales, triglicéridos y fosfolípidos a mediados de la lactancia. La exposición a BPA también alteró el perfil de ácidos grasos de la leche. En ambos grupos expuestos a BPA, el tamaño de los glóbulos grasos se correlacionó con el perfil de ácidos grasos de la leche.

Los cambios en la calidad de la leche producida por las madres F1 expuestas a BPA52 se reflejaron en alteraciones en la ganancia de peso de sus crías F2 durante la lactancia. Estos resultados destacan la importancia a nivel nutricional de la cantidad y calidad de la leche, no solo para permitir el normal crecimiento y desarrollo de las crías lactantes sino también es de gran importancia para la industria lechera. En conjunto, nuestros resultados muestran que la exposición perinatal a bajas dosis de BPA no solo modifica la composición proteica, sino que también la síntesis y perfil de ácidos grasos de la leche, alterando su calidad y comprometiendo el normal crecimiento de las crías lactantes.

En conclusión, los resultados de esta Tesis aportan fundamentos a la preocupación mundial por la creciente exposición a estrógenos ambientales, enfatizan la elevada sensibilidad de las crías a cualquier perturbación endocrina durante el período embrionario y neonatal, y las consecuencias a largo plazo producidas por su acción sobre la diferenciación funcional de la glándula mamaria.

Effects of perinatal exposure to environmental estrogens on the functional differentiation of the mammary gland during gestation and lactation

In most mammals, milk is the only food source for newborns and consequently must contain all the key nutrients for normal growth and development. Environmental factors and the diet of the mother can affect milk composition. Therefore, the aim of the thesis was to analyze the influence of perinatal exposure to Bisphenol A (BPA) or Diethylstilbestrol (DES) on the functional differentiation of the rat mammary gland (MG) during pregnancy and lactation. Pregnant Wistar rats (F0) were exposed through drinking water at 0, 0.6 and 52 μg of BPA/kg/day or 5 μg of DES/kg/day from gestational day 9 until weaning. After puberty, F1 females were bred and MG samples were obtained to evaluate the influence of perinatal exposure to BPA or DES on milk synthesis, composition and production, as well as the molecular mechanisms involved in beta-casein gene regulation during early lactation. Our results

show that perinatal exposure to low doses of BPA not only modifies milk protein composition, but also the fatty acid (FA) synthesis and milk FA profile, impairing milk quality and compromising the normal growth of the offspring. Furthermore, the BPA-induced decline of beta-casein expression during secretory activation of the MG occurs through different molecular mechanisms that act synergistically. Among them, epigenetic modifications could be a potential mechanism of BPA action. In conclusion, these results show the high sensitivity of the offspring during the *in utero* and lactational period to any endocrine disruption, and the lasting consequences caused by their action on the MG functional development.

Desarrollo de un inóculo probiótico para pollos parrilleros y monitoreo durante su tránsito intestinal y en órganos del medio interno

Jesica Evelyn Blajman

jblajman@yahoo.com.ar

Director: Dr. Laureano Frizzo

Co-Director: Dr. Marcelo Rosmini

Lugar de realización: Laboratorio de Análisis de Alimentos, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas / Universidad Nacional del Litoral). Departamento de Salud Pública, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral.

Fecha de defensa: 24 de febrero de 2017

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un inóculo de bacterias ácido lácticas (BAL) indígenas con capacidad probiótica capaz de mejorar el estado sanitario y la performance de pollos parrilleros durante una crianza completa, y establecer un método de monitoreo del probiótico una vez administrado a los animales.

A partir de los aislamientos de microorganismos indígenas del tracto gastrointestinal (TGI) de pollos parrilleros realizados en el Departamento de Salud Pública Veterinaria (DSPV), tres cepas de BAL fueron elegidas para el estudio de las propiedades tecnológicas y propiedades probióticas *in vivo*. *Lactobacillus salivarius* DSPV 001P, *L. salivarius* DSPV 003P y *L. agilis* DSPV 004P fueron propagadas en leche descremada y administradas en un ensayo *in vivo* para evaluar la influencia sobre la microbiota, la translocación al medio interno y la capacidad de colonización gastrointestinal. Las cepas utilizadas fueron capaces de superar las barreras biológicas, alojarse y permanecer en el TGI sin translocar al medio interno. Luego de la administración, no se encontraron diferencias significativas en el recuento de enterobacterias y coliformes entre los grupos. La colonización de ciego y buche fue significativamente mayor para *L. salivarius* DSPV 001P, por lo que esta cepa fue seleccionada como el mejor exponente para ensayos posteriores. De esta manera, la cepa se administró en cultivo fresco para estimar el efecto sobre los parámetros productivos de los pollos parrilleros. En lo que respecta a ganancia de peso, consumo y eficiencia de conversión alimenticia, no hubo diferencias significativas entre el grupo tratado y control.

En un estudio subsiguiente, se evaluó la conservación mediante el proceso de liofilización de la cepa anteriormente descrita a diferentes condiciones medio-ambientales durante 12 semanas (temperatura ambiente a 25 °C y 4 °C) y durante 12 meses (-20 °C). La viabilidad de la cepa no fue afectada por el proceso de liofilización, y varió según las temperaturas evaluadas. La metodología de conservación por congelación resultó ser la más adecuada para administrar la cepa en condiciones de granja, debido a que fue posible mantener la viabilidad celular por encima de 8 Log UFC/g durante 12 meses. En una etapa posterior, se procedió a estimar la colonización y persistencia *in vivo* de la cepa liofilizada, para lo cual la misma fue suministrada con la dieta a los pollos durante 16 d: se obtuvo un alto grado de recuperación de la cepa probiótica en buche y ciego, y la misma pudo recuperarse durante 28 d luego del cese de la suplementación. Finalmente, se estudió la influencia de la cepa liofilizada sobre la microbiota intestinal, la translocación bacteriana, la ganancia de peso y el índice de conversión de pollos parrilleros. En cuanto a la microbiota, se hallaron diferencias significativas en el número de levaduras en ciego a favor del grupo control. La cepa estimuló el consumo y mejoró significativamente la ganancia de peso en los pollos parrilleros. Además, contribuyó positivamente en el estado sanitario al disminuir la mortandad de los mismos. Esto tiene una fuerte relevancia en los costos de producción, y justificaría el empleo de *L. salivarius* DSPV 001P durante la crianza de pollos parrilleros.

El destino de la cepa probiótica pudo ser monitoreado mediante diferentes métodos. La obtención de mutantes resistentes a rifampicina, permitió rastrear a la cepa en diferentes secciones del TGI de pollos parrilleros. A través de electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) y posterior secuenciación, se confirmó la presencia de *L. salivarius* sólo en pollos parrilleros de 45 d de edad. La electroforesis en gel por campos pulsados (PGFE) fue empleada para comprobar si la cepa administrada presentaba diferencias con la recuperada desde el TGI, observándose una similitud del 100 % entre la cepa administrada y la recuperada. Por último, la tinción con isotiocianato de fluoresceína (FITC), permitió estimar el recuento bacteriano en buche y duodeno 30 min después de la suplementación, y en ciego 6 y 12 h después de la administración de *L. salivarius* DSPV 001P.

Todo lo expuesto anteriormente demuestra que la cepa probiótica *L. salivarius* DSPV 001P podría ser incorporada en la dieta de pollos parrilleros de manera estratégica para mejorar las condiciones sanitarias y de producción de las explotaciones intensivas.

Development of a probiotic inoculant for broilers and its monitoring during their intestinal transit and in organs of internal milieu.

Lactobacillus salivarius DSPV 001P was selected for the study of technological and *in vivo* probiotic properties. Fresh cultures of *L. salivarius* DSPV 001P were administered to estimate the impact on growth performance of broilers. With regard to weight gain, consumption and feed conversion efficiency, no statistical differences were observed between control group and probiotic group.

Then, *in vivo* colonization and persistence of the lyophilized strain was estimated. *L. salivarius* DSPV 001P was administered to the diet during 16 days and it could be recovered from crop and caecum 28 days following cessation of feeding.

In a subsequent study, the influence of the lyophilized strain *L. salivarius* DSPV 001P on intestinal microbiota, bacterial translocation, and performance parameters of broilers was studied. The number of yeast was higher in the caecum of the control group. Furthermore, the strain stimulated consumption and significantly improved weight gain in broilers. It also contributed positively in the health status by reducing mortality.

Finally, the fate of the probiotic strain could be monitored by different methods: rifampicin marking, denaturing gradient gel electrophoresis, pulsed-field gel electrophoresis and fluorescein isothiocyanate-labelling technique.

Subunidades Fksp del complejo β -1,3- D-Glucan sintasa de *Candida glabrata*: Rol en la síntesis de la pared celular, en la resistencia a las equinocandinas y como marcadores de resistencia clínica

Catiana Beatriz Dudiuk

cbdudiuk@gmail.com

Director: Dr. Guillermo Garcia-Effron

Co-Directora: Dra. María Soledad Gamarra

Lugar de realización: Laboratorio de Micología y Diagnóstico Molecular. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral.

Fecha de defensa: 17 de marzo de 2017

Las infecciones invasoras por *Candida spp.* se presentan como uno de los problemas clínicos más significativos en inmunocomprometidos, asociadas a altas tasas de mortalidad. La gran mayoría de estas infecciones son causadas por *Candida albicans* seguida por *Candida glabrata sensu lato* y *Candida parapsilosis sensu lato*. En Argentina *C. glabrata* es la cuarta especie aislada con mayor frecuencia en candidemias. Las infecciones causadas por *C. glabrata*, se presentan como un reto terapéutico ya que esta especie presenta sensibilidad reducida a los polienos y tiene la capacidad de adquirir resistencias secundarias a los triazoles con gran facilidad. Esta situación se vuelve aún más complicada, por la emergencia de dos especies crípticas (*C. nivariensis* y *C. bracarensis*) dentro del grupo *glabrata*, imposibles de diferenciar fenotípicamente y con perfiles de resistencia diferentes. Por estas razones, el uso de las equinocandinas para el tratamiento de las micosis sistémicas causadas por estas levaduras se considera un gran avance en Micología. Las equinocandinas actúan sobre la pared celular inhibiendo el complejo enzimático β -1,3- D-Glucan sintasa, que cataliza la síntesis de los 1,3- β -D-glucanos. El complejo β -1,3- D-Glucan sintasa está formado por al menos 2 subunidades, Rho1p y Fksp. La primera es un elemento regulatorio de varios procesos celulares mientras que los Fksp son el centro catalítico putativo del complejo y el blanco de las equinocandinas. Los Fksp, son codificados

por 3 genes homólogos (*FKS1*, *FKS2* y *FKS3*). La resistencia clínica a las equinocandinas en *C. glabrata* ha sido vinculada estrictamente a mutaciones en regiones conservadas de las subunidades Fksp1 y Fksp2, denominadas hot spot. Esto produjo que se plantearan grandes interrogantes en cuanto a la función específica de las subunidades Fks1p y Fks2p de *C. glabrata*, en cuanto a la síntesis de la pared celular y a la resistencia a las equinocandinas. Por otro lado, la relación de las mutaciones en *FKS* con la resistencia a las equinocandinas no ha sido explotada en el diseño de herramientas moleculares que permitan diagnosticar la resistencia a las mismas. En base a estos interrogantes nos planteamos cuatro objetivos. El primero fue la obtención de cepas de *C. glabrata* defectivas en los genes *FKS1*, *FKS2* y *FKS3*, con el fin de determinar la participación de cada uno de estos genes en la resistencia a las equinocandinas y en la regulación de la síntesis de la pared celular fúngica. Con el segundo se trató de establecer la función de los genes de la vía de síntesis de quitina en la compensación de los efectos de las alteraciones funcionales del complejo β -1,3- D-Glucan sintasa. Como tercer objetivo se llevó a cabo la generación de herramientas moleculares de diagnóstico de la resistencia a las equinocandinas en *C. glabrata* y *C. albicans*. Por último, se planteó la necesidad de diseñar una herramienta molecular que permita la diferenciación de las especies crípticas que componen el complejo *C. glabrata*. Los mutantes defectivos en genes *FKS* fueron expuestos a diferentes antifúngicos, diversos compuestos que alteran diferentes vías metabólicas (calcineurina, mTOR) y, además se utilizaron para la realización de estudios de virulencia. Los resultados obtenidos demostraron que la función de los genes *FKS* es redundante durante el crecimiento normal en *C. glabrata sensu stricto* y ante la acción de las equinocandinas. Sin embargo esta redundancia se pierde cuando la célula debe responder ante situaciones de estrés. Así, se puede concluir que el gen *FKS1* es más importante para la fisiología de *C. glabrata*, ya que la mayoría de las drogas/compuestos probados afectan más al mutante defectivo en *FKS1* que sería el que tiene funciones fisiológicas constitutivas, mientras que el gen *FKS2* presenta una innegable función efectora de respuesta ante situaciones de estrés celular. Respondiendo al objetivo número 2 se demostró que la vía de compensación de quitina parece probablemente regulada por la vía de la calcineurina. Si bien no se encontraron diferencias marcadas en las expresiones de la Chitin sintase 3 (*CHS3*) en los mutantes defectivos, los resultados obtenidos en las pruebas de sinergismo reflejan de manera evidente la participación de la quitina en la compensación del déficit de glucanos de pared. En cuanto a los estudios de virulencia se realizó un estudio *in vivo* utilizando *G. mellonella* y un estudio para determinar la participación de los genes *FKS* en la formación de biofilm. En el estudio *in vivo* se observó que la deficiencia individual de cada uno de los genes *FKS* no afectarían la capacidad de *C. glabrata* para infectar a *G. mellonella*. En cuanto a la evaluación de producción de biofilm, se observó que el gen *FKS2* contribuye en mayor medida con la producción de β -1,3-D-glucanos, que conforman la matriz de biofilm. Para cumplir con el objetivo número 3 la herramienta de diagnóstico molecular diseñada permitió detectar en solo 4h, los mecanismos más comunes de resistencia a equinocandinas que se relacionan con falla terapéutica, en *C. glabrata* y *C. albicans*. Con la PCR múltiple diseñada, como parte del objetivo N° 4, se logró identificar las especies del complejo *C. glabrata sensu lato*, con un 100% de concordancia con el método de secuenciación considerado como gold estándar. La identificación es

rápida (4h), de bajo costo, y mediante la realización de un estudio doble ciego demostramos que es robusta y altamente reproducible.

Fksp subunits of *Candida glabrata* beta-1,3-D-glucan synthase complex: Role in cell wall synthesis, echinocandins resistance and as markers of clinical resistance

Candida glabrata complex infections are a therapeutic challenge as they easily acquire triazole resistance and have reduced susceptibility to polyenes. For these reasons, echinocandins are the treatment of choice for these infections. Echinocandin drugs act by inhibiting the beta-1,3-D-Glucan synthase complex that catalyzes fungal-wall-glucan synthesis. This complex includes 2 subunits, named Rho1p and Fksp. The last subunit is encoded by the *FKS1*, *FKS2* and *FKS3* genes. Echinocandin clinical resistance in *C. glabrata* has been strictly linked to mutations in two conserved regions of the Fksp. In addition, there is a need to develop tools capable of detecting echinocandin resistant strains.

These facts made us raise the as one of the main objectives of this PhD thesis to establish the Fks1p and Fks2p function in *C. glabrata* and its relatedness with cell wall synthesis and echinocandin resistance. We produce *C. glabrata* strains defective in *FKS* genes and we evaluated the implication of each of them in echinocandin resistance and in the regulation of the fungal wall synthesis. In addition, the role of chitin in the compensation of the effects of the functional alterations of the beta-1,3-D-Glucan synthase complex was established. In the other hand, molecular tools for the diagnosis echinocandin secondary resistance in *C. albicans* and *C. glabrata* strains, were developed.

Caracterización funcional y molecular de los rizobios noduladores de *Desmanthus virgatus* aislados en suelos argentinos

Laura Viviana Fornasero

lfornase@fca.unl.edu.ar

Director: Dr. Antonio Lagares

Co-Director: Dr. José Francisco Pensiero

Lugar de realización: Laboratorio de Biotecnología y Biología Aplicada. Facultad de Ciencias Agrarias. UNL.

Instituto de Biotecnología y Biología Molecular. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata.

Fecha de defensa: 20 de febrero de 2017.

El empleo de leguminosas nativas asociadas a gramíneas constituye un recurso eficiente para mantener el suelo con buenos niveles de fertilidad nitrogenada minimizando el uso de fertilizantes químicos, generalmente costosos y de alto impacto ambiental. En este contexto, las especies de leguminosas forrajeras nativas presentan un gran potencial práctico y un ejemplo de ello es *Desmanthus virgatus* (L.) Willd. leguminosa perenne de amplia distribución en el centro norte de Argentina. Hacia el uso sustentable de esta leguminosa,

en este trabajo de tesis se presenta la caracterización fenotípica, genotípica y simbiótica de rizobios noduladores del complejo *D. virgatus* recuperados de suelos argentinos. Para ello, se seleccionaron y colectaron 10 poblaciones de plantas de *D. virgatus* (sensu lato) en diferentes ambientes de las provincias de Santa Fe, Chaco, Santiago del Estero, Entre Ríos, Corrientes, Misiones, Jujuy y Salta. A partir de los nódulos de las plantas de campo y de los obtenidos de las poblaciones cultivadas con sus propios suelos de origen en cámaras de crecimiento se estableció una colección de más de 170 aislamientos de rizobios noduladores del complejo *D. virgatus* mantenidos por criopreservación como reservorio de germoplasma de las bacterias simbiotes.

La caracterización fenotípica de los simbiotes permitió reconocer rizobios de crecimiento rápido que mostraron un desarrollo óptimo en un amplio rango de pH, temperaturas entre 28 y 35°C, y en condiciones de salinidad entre 0,5% y 1% (p/v) de NaCl (85 y 171 mM). Por otro lado, se identificaron rizobios con capacidad de crecer en condiciones que se consideran adversas y que sugieren una mayor flexibilidad fisiológica y capacidad de adaptación al ambiente. Posteriormente, los perfiles de amplificación de ADN genómico (*fingerprints*) evidenciaron una marcada diversidad genética entre los aislamientos de rizobios presentes en suelos de diferentes provincias de nuestro país. En particular, el análisis filogenético de aislamientos recuperados de suelos de la provincia de Santa Fe realizado a partir de la secuenciación parcial del rDNA 16S reveló la presencia de rizobios y mesorizobios. En dichos simbiotes se observó además la presencia de al menos dos tipos bien diferenciados de genes *nodC*. Con respecto a las características simbióticas, los ensayos de inoculación de plantas realizados en cámara de crecimiento de cultivo evidenciaron que en los suelos de nuestro país se encuentran poblaciones de rizobios con una amplia variación en términos de efectividad simbiótica permitiendo seleccionar cepas con muy buena capacidad potencial de fijación biológica de nitrógeno y competencia por el nicho simbiótico. Finalmente, en la evaluación de la performance a campo de los aislamientos previamente seleccionados en condiciones de laboratorio se comprobó que las cepas de rizobios locales inoculadas en las semillas de *D. virgatus* promovieron un mejor comportamiento agronómico con importantes incrementos de biomasa vegetal y fijación de nitrógeno. Los resultados presentados enfatizan la importancia de la inoculación con cepas eficientes y adaptadas a nuestras condiciones edafoclimáticas para lograr un establecimiento exitoso y crecimiento inicial adecuado de las plántulas de *D. virgatus* en condiciones de campo.

Molecular and functional characterization of rhizobial nodulators of *Desmanthus virgatus* isolated in argentine soils.

The use of grass-associated native legumes is an efficient resource in order to keep good nitrogen fertility levels in the soil, minimizing the use of chemical fertilizers, which are usually expensive and of high environmental impact. In this context, the native forage legumes species have great practical potential, an example being *Desmanthus virgatus* (L.) Willd widely distributed in the central northern

area of Argentina. Toward sustainable use of this legume, this thesis paper includes a phenotypic, genotypic and symbiotic characterization of *D. virgatus* complex rhizobia nodulators retrieved from Argentinian soils. For that, ten populations of *D. virgatus* plants (sensu lato) were selected and collected from different environments. A collection of over 170 isolations of *D. virgatus* complex rhizobia nodulators was generated. The phenotypic characterization of the symbionts allowed for the recognition of rapid growth rhizobia that showed a capacity for growth in conditions deemed adverse and which suggest a higher physiological flexibility and an ability to adapt to environmental. The genomic DNA amplification profiling (fingerprints) exhibited a clear genetic diversity amongst the isolations. Regarding the symbiotic characteristics, rhizobia with a great potential for biological nitrogen fixation and competition for the symbiotic niche were found. The results presented here emphasize the importance of using efficient strains adapted to our edaphoclimatic conditions for inoculation in order to achieve a successful establishment and a proper early growth of the *D. virgatus* seedlings in field conditions.

Rol de la adhesión mediada por Cadherina E

Carolina Daniela Galetto

cgaletto@bioingenieria.edu.ar

Director: Dr. Víctor Hugo Casco

Co-Directora: Dra. María Fernanda Izaguirre

Lugar de realización: Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional Entre Ríos. Laboratorio de Microscopía Aplicado a Estudios Moleculares y Celulares, Departamento de Biología.

Fecha de defensa: 22 de febrero del 2017

La morfogénesis de los epitelios polarizados condujo a la multicelularidad y a la evolución de los metazoos. En los animales superiores, la integridad estructural y funcional de dichos tejidos involucra a las uniones adherentes dependientes de cadherina E (UAs). Estos complejos proporcionan una conexión mecánica al citoesqueleto celular además de organizar vías de señalización intracelular mediante la interacción con las cateninas (alfa-, beta- y p120) y la modulación de la actividad de algunas GTPasas pequeñas involucradas en la diferenciación epitelial.

En esta tesis se ha estudiado la regulación de las UAs por la hormona tiroidea 3,5,3'-triiodotironina (T3) en un modelo in vivo, la metamorfosis de anuros inducida con T3 exógena.

El tratamiento provocó una remodelación drástica del epitelio estomacal, evidenciándose en primer lugar el desensamblaje y endocitosis de UAs, adquiriendo luego las características del epitelio maduro. A nivel molecular, se determinó que cadherina E, alfa- y beta-catenina son genes de repuesta temprana a T3, mientras que las GTPasas pequeñas presentaron perfiles de expresión diferenciales, siendo la respuesta de Rac1 temprana y la de Rap1 tardía. Los cambios moleculares estuvieron asociados en primer lugar a la

migración celular y la formación de contactos intercelulares y posteriormente al reforzamiento de las UAs y el establecimiento de la polaridad epitelial.

Estos hallazgos, permitieron dilucidar el rol de la hormona T3 en la dinámica de las UAs y la determinación del fenotipo epitelial polarizado en un modelo in vivo, siendo las GTPasas pequeñas moduladores de su efecto a nivel intracelular.

Role of cell adhesion E Cadherin-dependent

The polarized epithelia morphogenesis would have led to multicellularity, and the metazoans evolution. In higher animals, the structural and functional integrity of such tissues involves the adherent junctions (AJs) cadherin E-dependent. These complexes provide mechanical connection to the cellular cytoskeleton in addition to organizing intracellular signaling pathways through interaction with catenins (beta-, alfa- and p120) and modulation of the activity of some small GTPases involved in epithelial differentiation.

In this thesis was studied the regulation of AJs by the thyroid hormone 3,5,3'-triiodothyronine (T3) in an in vivo model, the anuran metamorphosis exogenously induced by T3.

The treatment provoked a drastic remodeling of the epithelium, evidencing first the disassembly and endocytosis of AJs, acquiring then the characteristics of the mature epithelium. At molecular level, was determined that E cadherin, beta- and alfa-catenin are early response genes to T3, whereas the small GTPases showed differential expression profiles, being Rac1 the first to react, and following, Rap1. Molecular changes were primarily associated with cell migration and the formation of intercellular contacts and subsequently the UAs reinforcement, and the establishment of epithelial polarity.

These findings allowed to elucidate the role of the T3 hormone in the dynamics of the AJs and the determination of the polarized epithelial phenotype in an in vivo model, being small GTPases, modulators of their effect at the intracellular level.

Conservación de la diversidad del sotobosque en bosques de *Nothofagus pumilio* bajo distintos tipos de aprovechamiento forestal

Emilce Andrea Gallo

emilcegallo@hotmail.com

Director: Dr. Guillermo Martínez Pastur

Codirectora: Dra. María Vanessa Lencinas

Lugar de realización: Laboratorio de Recursos Agroforestales. Centro Austral de Investigaciones Científicas (CADIC-CONICET). Ushuaia. Tierra del Fuego.

Fecha de defensa: 22 de junio de 17

En general, los sistemas silvícolas más utilizados en todo el mundo generan la homogeneización de la estructura forestal y la pérdida de ambientes y biodiversidad. En las últimas décadas se han propuesto métodos silvícolas que compatibilizan objetivos económicos con ecológicos, y proponen dejar diferentes formas y grados de retención de árboles vivos para mejorar la conservación. En Tierra del Fuego, Argentina, estas nuevas alternativas se contrastaron contra la corta de protección, el sistema de aprovechamiento tradicionalmente utilizado en bosques de *Nothofagus pumilio*, basado estrictamente en parámetros económicos. En esta tesis se estudiaron sistemas silvícolas que aplican retención variable, y se analizó su contribución a la conservación de plantas del sotobosque (cobertura, riqueza y biomasa), incluyendo el análisis de la regeneración natural. Se trabajó en rodales puros, donde se realizaron muestreos de base (antes de la intervención) considerando gradientes de calidad de sitio y cobertura arbórea. Asimismo, se realizaron muestreos posteriores a la intervención durante cuatro años consecutivos, en cuatro tratamientos: *retención agregada*, que deja retención en forma de parches circulares (un agregado por hectárea) y en torno a ellos aplica tala rasa (28% de retención); *retención dispersa*, con árboles distribuidos homogéneamente (20-30% de retención), equiparable con la corta de protección tradicional; *retención agregada y dispersa combinadas*, con un agregado por hectárea y retención dispersa alrededor (40-50% de retención); y *bosques primarios no intervenidos* como control. Se realizaron ANOVAS simples y dobles, y análisis multivariados para evaluar los datos.

La estructura del *bosque primario* fue heterogénea por la presencia de diferentes calidades de sitio en parches contiguos y de aperturas naturales en el dosel, lo que generó variedad de hábitats y microclimas para las plantas del sotobosque. La cobertura, riqueza y biomasa del sotobosque en el bosque primario varió en función de la calidad de sitio pero no en relación al grado de apertura del dosel. El sotobosque de los bosques de mejor calidad de sitio fue más productivo y rico en especies nativas, mientras que las exóticas fueron más abundantes en sitios de mediana calidad.

Los sistemas silvícolas generaron cambios en la estructura y el microclima que se tradujeron en pérdida de heterogeneidad estructural e incremento de radiación, precipitación y viento en el interior del bosque aprovechado, con consecuentes cambios en las temperaturas del aire y del suelo y en la composición química del piso forestal y el suelo mineral. Sin embargo, dichos cambios fueron proporcionales al grado de intervención, siendo la *retención dispersa* el sistema que más homogenizó la estructura del bosque y más modificó el microclima. Esto impactó en la diversidad del sotobosque facilitando el ingreso de especies desde los ambientes asociados, el aumento de especies exóticas y de la abundancia relativa de monocotiledóneas y briófitas, la disminución en la frecuencia de ocurrencia de las especies típicas del bosque cerrado y la pérdida de las especies más sensibles del bosque primario. Por otra parte, los sistemas con agregados conservaron parte de la heterogeneidad estructural y un microclima atemperado, destacándose la *retención combinada* por implicar un menor grado de intervención, lo que generó menores variaciones en riqueza, cobertura y biomasa respecto del sotobosque original, menor ingreso de plantas exóticas o de ambientes asociados, y menor pérdida de especies sensibles.

La producción de semillas de *N. pumilio* fue variable entre sistemas silvícolas y entre años. En la *retención agregada* y en la *retención combinada*, la presencia de agregados generó un patrón espacial diferencial en el aporte de semillas dependiendo de la distancia al mismo, siendo mayor en el interior de los agregados respecto a las posiciones más alejadas. En las superficies con menor retención de árboles (menor cobertura del dosel), la cantidad de semillas fue baja, siendo éstas más livianas y no viables. En el bosque intervenido, la regeneración incrementó rápidamente su crecimiento con la apertura del dosel. La incorporación de nuevas plántulas estuvo relacionada con la disponibilidad de semillas, su viabilidad, la cobertura del dosel y las condiciones microclimáticas.

La aplicación de sistemas silvícolas que combinen retención agregada y dispersa genera un menor grado de impacto sobre las plantas del sotobosque de los bosques de *N. pumilio* de Tierra del Fuego, mejorando la conservación de plantas típicas del bosque primario, por lo que la retención variable debería ser incluida en los planes de manejo.

Conservation of understory diversity in *Nothofagus pumilio* forest whit differents silvicultural systems.

Traditional harvesting homogenizes forest structure and affects biodiversity. New harvesting alternatives combine economic and ecological objectives across different shapes and degrees of retention to improve conservation. I studied variable retention harvesting alternatives, and analyzed its contribution to understory conservation.

Sampling was done in pure *Nothofagus pumilio* stands (Tierra del Fuego), before (along a site quality and canopy cover gradients) and after harvesting during the first four years, on four treatments: aggregated retention (28% retention); dispersed retention (30%); combined dispersed and aggregated retention (50%); and primary forests (control). I surveyed forest structure, soil and microclimatic characteristics, regeneration and understory plant diversity. Data analyses included parametric and non-parametric, univariate and multivariate tests.

Before harvesting, primary forest structure and understory diversity changed naturally whit site qualities (more productive and diverse in high qualities).

Harvesting modified forest structure, microclimate and soil nutrient contents, increasing richness, cover and biomass of understory plants. The change magnitude was related with shape and degrees of retention, and it was intensified with the years. Aggregated retention maintained many conditions of the original forest, while dispersed retention attenuated impacts of clear-cut. The site quality influenced the understory response to harvesting, with greater changes in bryophyte and pteridophyte.

The success of regeneration is related with the degree of retention, showing greater seed production and recruitment under high canopy cover (aggregates), and higher growth and survival under intermediate cover (dispersed retention). Combined retention generates lesser impacts on understory

than other retention harvestings, being the best alternative to satisfy production and conservation objectives.

Diseño y optimización de un proceso de producción de muteínas de interferón- α 2b humano con mayor actividad biológica mediante glicosilación en células de mamífero

Agustina Gugliotta

agugliotta@fbc.unl.edu.ar

Director: Dr. Marcos Oggero

Co-Directora: Dra. Natalia Ceaglio

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

Fecha de defensa: 15 de marzo de 2017

La producción de proteínas recombinantes de uso terapéutico es llevada a cabo principalmente mediante el empleo de células CHO-K1. Sin embargo, las células HEK293 son de interés debido a su capacidad de producir proteínas recombinantes con características de mayor similitud a las proteínas secretadas naturalmente por humanos, evitando así la presencia de determinantes antigénicos de origen glicosídico que son producidos por las células CHO. Ambas líneas celulares han permitido llevar a cabo con éxito la producción de nuevos bioterapéuticos y su aprobación por parte de los organismos regulatorios para su empleo en salud humana.

El hIFN- α 2b constituye una citoquina de gran interés para la industria farmacéutica ya que puede ser empleada como agente antiviral y antitumoral. Sin embargo, su empleo requiere de la administración de dosis elevadas y frecuentes para alcanzar la ventana terapéutica. Por este motivo, se han desarrollado numerosas estrategias que han permitido mejorar su actividad biológica *in vivo*, tal es el caso de la glicoingeniería, que condujo a la obtención del IFN4N.

En el presente trabajo de tesis se llevó a cabo la generación de líneas y clones celulares recombinantes de células CHO y HEK productores de IFN4N. Ambas proteínas fueron producidas en condiciones de adherencia y purificadas mediante cromatografía de inmunoafinidad (CIA).

La caracterización fisicoquímica de ambas moléculas evidenció que el IFN4N_{CHO} presentó una masa molecular aparente superior respecto del IFN4N_{HEK} y un mayor contenido de isoformas ácidas. Además, la variante producida en células CHO demostró N-glicanos altamente ramificados con un mayor contenido de ácido siálico respecto de la molécula obtenida a partir de células HEK. Ensayos de espectrometría de masas revelaron que la variante IFN4N derivada de células humanas poseía N-glicanos truncos o simples, mientras que en la variante proveniente de células de hámster predominaron estructuras bi-, tri-, y tetraantenarias con extensiones de N-acetilactosamina completamente sialiladas.

Estudios de farmacocinética establecieron la existencia de diferencias significativas sólo en los valores de concentración plasmática máxima y el tiempo requerido para alcanzarla. La velocidad de depuración y el tiempo de vida media plasmática no demostraron diferencias estadísticas.

Si bien ensayos de actividad biológica (AB) antiviral *in vitro* demostraron similitud entre el IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK}, la actividad antiproliferativa *in vitro* resultó dos veces superior para la variante obtenida a partir de células HEK. El análisis de la actividad biológica antitumoral *in vivo* permitió confirmar los resultados obtenidos *in vitro*, demostrando así la mayor potencia antitumoral del IFN4N_{HEK}.

Como parte de este trabajo también se llevó a cabo la generación de nuevas muteínas hiperglicosiladas del hIFN- α 2b, con el objetivo de optimizar la molécula del IFN4N. Las estrategias propuestas involucraron la introducción de nuevos sitios potenciales para N-glicosilación, la restauración de la modificación R23N (involucrada en el descenso de la AB específica (ABE) antiproliferativa del IFN4N) y la fusión del péptido ANITVNITV en el extremo N de la secuencia de la proteína. Las nuevas muteínas fueron producidas en células CHO, purificadas mediante CIA y caracterizadas, lo que permitió observar que el grado de glicosilación de las mismas se incrementó conforme aumentó el número de sitios potenciales para N-glicosilación. Si bien las variantes 4N evidenciaron una masa molecular aparente y un contenido de ácido siálico similar al IFN4N (IFN3NM47 e IFN2NM47/95), las muteínas 5N (IFN4NM47, IFN3NM47/95) y 6N (IFN4NMutNter e IFN3N47MutNter) presentaron un notable incremento. Esto se tradujo en un aumento del tiempo de vida media plasmática y una disminución de la velocidad de depuración.

Las variantes carentes de la modificación R23N (IFN3NM47, IFN2NM47/95, IFN3N47MutNter e IFN3NM47/95) evidenciaron valores de ABE antiproliferativa *in vitro* superiores respecto del IFN4N. Mientras que las muteínas IFN4NM47 e IFN4NMutNter, que conservaron dicha mutación, presentaron comportamientos diferentes: la primera con una ABE similar a la variante de referencia y la segunda con un valor superior.

Las variantes que mejor representaron el incremento en la ABE *in vitro* (IFN3NM47), el incremento de las propiedades farmacocinéticas (IFN4NM47) o el mejoramiento simultáneo de ambas cualidades (IFN3N47MutNter) fueron evaluadas en ensayos de actividad antitumoral *in vivo*. Tales muteínas fueron capaces de reducir la velocidad de crecimiento de los tumores respecto del IFN4N, resultando las variantes IFN4NM47 e IFN3N47MutNter las más promisorias para reducir significativamente el volumen de los tumores respecto del tratamiento con IFN4N.

Los resultados de esta tesis demuestran que la búsqueda de un balance apropiado entre la AB *in vitro* y las propiedades farmacocinéticas en el contexto del huésped de producción adecuado, constituirían las claves para la obtención de un producto terapéutico innovador y efectivo.

Design and optimization of a process to produce human interferon alpha2b muteins with increased biological activity through glycosylation in mammalian cells

In the present thesis work, a hyperglycosylated hIFN- α 2b, previously generated in our lab and called IFN4N, was produced in CHO and HEK cells and further purified. IFN4N_{CHO} and IFN4N_{HEK} were characterized in terms of glycosylation, pharmacokinetics and biological activity. IFN4N_{CHO} exhibited higher average molecular mass and more acidic and ramified isoforms compared to IFN4N_{HEK}. Despite their glycosylation patterns were distinct, pharmacokinetic parameters did not differ significantly. Besides, IFN4N_{HEK} was more efficient as an *in vitro* antiproliferative agent. Finally, *in vivo* antitumor activity assays confirmed the *in vitro* biological activity and pharmacokinetic results since the HEK-derived IFN4N showed a higher antitumor potency compared to IFN4N_{CHO}.

As part of this thesis work, new muteins of hIFN- α 2b were designed and constructed by introducing new N-glycosylation sites. These modifications highly improved their glycosylation degree and their pharmacokinetic properties. Also, a back mutation of IFN4N (R23N) was carried out to restore the *in vitro* antiproliferative activity of the IFN. The new muteins increased the antiproliferative activity compared to IFN4N and two of them behaved as promising molecules due to their action in reducing the volume of tumors during *in vivo* experiments. The results of this thesis demonstrated that searching for an appropriate balance between the *in vitro* biological activity and the pharmacokinetic properties in the context of an adequate production host would constitute the basis to generate an innovative and effective therapeutic product.

***Staphylococcus aureus* con sensibilidad disminuida a tigeciclina. Análisis de los mecanismos de resistencia involucrados**

Melina Elizabeth Herrera

invest5@uap.edu.ar, meliherrera31@hotmail.com

Director: Dr. José Alejandro Di Conza

Co-Directora: Dra. Marta Eugenia Mollerach

Lugar de realización: Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Adventista del Plata. Entre Ríos.

Cátedra de Microbiología General. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe.

Fecha de defensa: 18 de diciembre de 2017

Staphylococcus aureus es uno de los agentes patógenos frecuentemente recuperados de infecciones tanto nosocomiales como de la comunidad. Este organismo se caracteriza por su plasticidad genómica y su gran capacidad para adaptarse a diversos ambientes y adquirir rápidamente nuevos mecanismos de resistencia a los antibióticos, limitando las opciones de tratamiento.

Tigeciclina (TIG) es un antibiótico bacteriostático, derivado de la minociclina, perteneciente a la familia de las gliciliclinas, que presenta un amplio espectro de actividad. Fue aprobado para el tratamiento de in-

fecciones intra-abdominales complicadas, infecciones de piel y tejido celular subcutáneo complicadas y neumonía bacteriana adquirida en la comunidad. Representa una opción útil en el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos multirresistentes con limitadas opciones de tratamiento.

El objetivo de este trabajo fue seleccionar mutantes *in vitro* de *S. aureus* con sensibilidad disminuida o resistentes a TIG, para posteriormente realizar una evaluación comparativa de diversos aspectos entre las cepas mutantes seleccionadas y sus correspondientes aislamientos parentales.

A partir de 20 aislamientos clínicos de *S. aureus*, se seleccionaron *in vitro* 12 mutantes resistentes a TIG (SARTm), pertenecientes a 7 linajes genotípicos diferentes, que aumentaron entre 16 y 128 veces la CIM de TIG con respecto a los aislamientos parentales (rango de CIM: 1-16 µg/mL).

En dos SARTm se observaron cambios en la sensibilidad a otros antibióticos con respecto a sus aislamientos parentales. En uno de ellos se detectó un aumento en la sensibilidad a oxacilina, pasando de ser resistente a ser sensible a este antibiótico. En otro SARTm se observó un cambio en el perfil de sensibilidad a oxacilina, cefoxitina y vancomicina, adquiriendo fenotipo VISA (*Staphylococcus aureus* con sensibilidad intermedia a vancomicina).

El estudio de la cinética de muerte confirmó el poder bacteriostático de TIG, y los SARTm mostraron menor velocidad de muerte que los aislamientos parentales.

La adquisición de resistencia a TIG no se asoció a un costo significativo en el *fitness* bacteriano, el cual fue evaluado a través de curvas de crecimiento, frecuencia mutacional y perfil autolítico.

La evaluación fenotípica de la actividad eflujo empleando inhibidores específicos dio como resultado que los SARTm tenían incrementada esta actividad. Se analizó la participación de dos bombas de eflujo, NorB y MepA, involucradas en la expulsión de tetraciclina y gliciliclinas respectivamente, mediante el análisis de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de los genes *norB*, *mepA* y *mepR* (codifica para un regulador transcripcional de *mepA*). Se encontraron diversas mutaciones en las secuencias del gen *mepA* y *mepR* en los SARTm, que dieron lugar a alteraciones en las secuencias de aminoácidos de las proteínas correspondientes, MepA y MepR. Mientras que en *norB* no se encontraron alteraciones entre cepas parentales y mutantes.

En dos SARTm que fueron seleccionados para determinar mediante RT-qPCR el nivel de expresión de los genes *mepA* y *norB*, se observó una expresión significativamente mayor de *mepA* que en los correspondientes aislamientos parentales. La expresión de *norB* fue menor en los dos SARTm estudiados. Se evaluó en estas cepas la movilización de la IS256, encontrándose en una de ellas un aumento en el número de copias de IS256 mediante análisis del perfil de hibridación, luego de la digestión con *EcoRI*. Además, ambas cepas mostraron una expresión mayor del gen *tnp*, codificante de la transposasa de IS256, que su cepa parental. Por otra parte, mediante el análisis bioinformático de las secuencias de los genomas completos de estos dos SARTm, se detectó la presencia de dos copias extras de IS256 en cada uno de ellos. En uno de estos SARTm, (que adquirió fenotipo VISA luego de la exposición a TIG), el nuevo sitio de inserción de IS256 se localizó en la región *upstream* del gen *walR*, lo cual se ha asociado a la adquisición de fenotipo VISA. Por último, se

detectó una mutación en el gen *rpsJ* en uno de los SARTm, alterando la proteína codificada, una proteína ribosómica S10. Las mutaciones en esta proteína se han asociado a disminución de la sensibilidad a TIG.

Se pudo concluir entonces que el mecanismo de resistencia implicado en la disminución de la sensibilidad a TIG está relacionado a un incremento en la actividad de la bomba de eflujo MepA, debido a la presencia de mutaciones, que afectan la función represora del regulador transcripcional *mepR*. Mutaciones en el gen *mepA* también podrían estar contribuyendo a la mayor actividad eflujo. Además, la presión ejercida por TIG está asociada a un aumento en la frecuencia de transposición de la IS256, provocando rearrreglos genéticos. Es probable que algunos de estos rearrreglos puedan estar implicados en la modificación de la sensibilidad a otras drogas antibacterianas en los SARTm estudiados. Alteraciones mutacionales presentes en el gen *rpsJ* también podrían estar contribuyendo a la disminución de la sensibilidad a TIG.

***Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to tigecycline. Analysis of the resistance mechanisms involved**

Staphylococcus aureus is one of the major pathogens causing serious infections both within the hospital setting and in the community. Is characterized by their ability to adapt to different environments and acquire new antibiotics resistance mechanisms. Tigecycline (TIG) is a bacteriostatic antibiotic that represents a useful therapeutic option for the treatment of complicated infections caused for multiresistant organisms.

Twelve TIG resistant mutants (TRSA_m) belonging to 7 different genotypic lineages, were obtained *in vitro*, which showed 16 to 128 fold increase in their MIC values compared to their parental strain. The TIG pressure caused an alteration in the susceptibility to others antibiotics in some mutant strains. The time-kill curve of parental strains confirmed the bacteriostatic effect of TIG, and the TRSA_m showed a lower killing rate that parental isolates.

Acquisition of TIG resistance was not associated with a significant cost in bacterial fitness, evaluated through growth curves, mutation frequency, and autolysis assays.

All of TRSA_m showed a higher in efflux activity, and this is related to an increase in the activity of the efflux pump MepA, associated with an increase in *mepA* gene expression, probably due to mutations affecting the transcriptional regulator *mepR*. In addition, TIG pressure could be associated with an increase in transposition of IS256, causing genetic rearrangements. Mutational alterations in *rpsJ* gene could also contribute to decreased susceptibility to TIG.

Evaluación de novedosas metodologías analíticas ambientalmente compatibles para monitoreo terapéutico y estudios farmacocinéticos de antirretrovirales en fluidos biológicos

Gabriel Alejandro Hunzicker

gabriel.hunzicker@dominguezlab.com.ar

Directora: Dra. Jorgelina Cecilia Altamirano

Co-Directora: Dra. Silvia Raquel Hernández

Lugar de realización: Centro de investigaciones clínicas DominguezLab S.R.L. y Cátedra Química Analítica I. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral.

Fecha de defensa: 06 de diciembre de 2017

Desde que los primeros casos de SIDA comenzaron a surgir en 1981, se han realizado varios intentos de combatir la enfermedad. A finales de 2009, se estimaba que 33 millones de personas en todo el mundo estaban infectadas con el VIH, en comparación con 26 millones en 1999. Sin embargo, el número de infecciones por el VIH recientemente diagnosticadas tiende a estabilizarse. El número de muertes relacionadas con el VIH se ha reducido gracias a los avances en el diagnóstico, los tratamientos y el seguimiento cuidadoso del paciente. En los últimos 10 años, la disponibilidad de nuevos fármacos antirretrovirales (ARVs), más potentes y altamente específicos ha sido un gran avance en la supervivencia de los pacientes. En particular, el uso combinado de tres a cuatro ARVs diferentes, en lo que se conoce como Tratamiento Antirretroviral de Gran Actividad (TARGA), ha mejorado el estado clínico y el pronóstico de la mayoría de los pacientes infectados por el VIH, reduciendo su morbilidad y mortalidad y mejorando su calidad de vida. Sin embargo, el TARGA requiere un alto grado de adherencia al tratamiento para que alcance su máxima eficacia.

Los medicamentos genéricos son una alternativa mucho más asequible a los innovadores, concebidos para reemplazar a estos últimos en el tratamiento de los pacientes. Un medicamento genérico es todo aquel que presenta la misma composición cualitativa y cuantitativa en principios activos y la misma forma farmacéutica que un medicamento innovador o de referencia.

Para probar la seguridad y la eficacia en el tratamiento, los medicamentos innovadores soportan un período de 10 a 15 años de desarrollo, incluyendo diversas fases de ensayos clínicos antes de llegar a los pacientes. Por el contrario, los medicamentos genéricos deben demostrar bioequivalencia al producto de referencia, cumpliendo con pruebas igualmente estrictas (in vitro e in vivo) pero en menor tiempo, diseñadas para asegurar la intercambiabilidad con respecto al producto de referencia. Los estudios de bioequivalencia (BE) se basan en la caracterización comparativa de los perfiles farmacocinéticos del ingrediente farmacéutico activo (IFA) en fluidos biológicos de sujetos después de la ingestión de ambos medicamentos (Prueba y Referencia). La demostración de BE es la condición necesaria, en la mayoría de los casos, para poder afirmar que dos medicamentos con la misma cantidad de un mismo principio activo producen el mismo efecto terapéutico (equivalencia terapéutica) y pueden ser responsables de la aparición de los mismos efectos adversos (seguridad). Estos argumentos son imprescindibles para la autorización de la comercialización de los medicamentos genéricos por parte de las autoridades sanitarias. La validez de pruebas estadísticas de bioequivalencia depende en gran medida de la precisión y sesgo de la medición de los parámetros farmacocinéticos y a menudo requiere la determinación de nanogramos o incluso picogramos de fármacos o sus metabolitos por mililitro de matrices biológicas complejas tales como sangre, plasma u orina. Por esta razón, la fiabilidad de

los resultados analíticos es uno de los factores más críticos en los estudios farmacocinéticos de bioequivalencia.

El objetivo general de éste trabajo de tesis fue desarrollar y validar metodologías analíticas altamente sensibles para la evaluación simultánea de varios ARVs. Para ello, se desarrollaron y validaron diferentes metodologías bioanalíticas utilizando HPLC con detección UV y espectrometría de masas en tándem (MS² y MS³). Las metodologías de HPLC-MS/MS, permitieron cuantificar varios ARVs simultáneamente y resultaron eficientes en términos de análisis de un gran número de análisis. Diferentes métodos de procesamiento de muestras (precipitación de proteínas, extracción en fase sólida y extracción de punto de nube) permitieron cuantificar simultáneamente ARVs en el mismo análisis con adecuado sesgo y precisión. Las metodologías desarrolladas y validadas en este trabajo de tesis se aplicaron en estudios de bioequivalencia de fármacos ARVs, para los cuales se obtuvieron los perfiles farmacocinéticos en voluntarios argentinos sanos. Nuestros resultados muestran que no todas las formulaciones farmacéuticas de ARVs son intercambiables en la práctica médica, y los estudios de bioequivalencia son por lo tanto un paso final muy importante en la línea de garantía de calidad de productos farmacéuticos genéricos antes de llegar a los pacientes.

Evaluation of novel analytical methodologies environmentally compatible for therapeutic monitoring and pharmacokinetic studies of antiretroviral in biological fluids

Since the first AIDS cases began to emerge in 1981, the number of newly diagnosed HIV infections now tends to stabilize. The simultaneous use of three to four different antiretroviral agents (ARVs), a therapy known as Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART), has improved the clinical status and quality of life for the majority of patients infected with HIV. Generic drugs are a more affordable and equally effective alternative to innovator medicines. A generic medicine presents the same qualitative and quantitative composition in active principles and the same pharmaceutical form as the innovator. In order to be used in general medicinal practice, generic medicines must demonstrate bioequivalence to the innovator through clinical bioequivalence (BE) trials. The validity of statistical tests of bioequivalence depends on the accurate measurement of pharmacokinetic parameters; for this reason the reliability of analytical results is a critical factor in BE trials. The general objective of this thesis work was to develop and validate bioanalytical methodologies for the simultaneous evaluation of several ARVs using HPLC with UV detection and tandem mass spectrometry (MS² and MS³). Different methods of sample processing (protein precipitation, solid phase extraction and cloud point extraction) were developed, which allowed the simultaneous quantification of different ARVs in biological fluids. The methodologies were applied to BE trials of single ARV drugs and in HAART combinations in healthy Argentine volunteers showing that not all pharmaceutical formulations are interchangeable in medicinal practice. BE trials are therefore a crucial step for granting quality of generic pharmaceutical products before reaching patients.

Efectos de largo plazo del uso del suelo sobre la comunidad de lombrices de tierra (Annelida, Oligochaeta) en la provincia de Santa Fe

Carolina Elisabet Masin

cmasinb@yahoo.com.ar

Director: Fernando Roberto Momo

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

Laboratorio: Laboratorio de Ecotoxicología - Grupo Medio Ambiente

Fecha de defensa: 28 de marzo de 2017

En los últimos 30 años la provincia de Santa Fe fue afectada por el proceso de agriculturización que implicó no sólo la utilización de nuevas tierras, sino la reconversión de los sistemas agrícolas, frutihortícolas y ganaderos existentes. La degradación del suelo y su relación con la edafofauna se volvió un tema crucial para el manejo del recurso. Las lombrices cumplen un rol clave en la estructura y fertilidad del suelo, constituyendo un buen indicador de la calidad del mismo. Esta tesis tuvo por objetivo estudiar la comunidad de lombrices de tierra de la provincia de Santa Fe, con la finalidad de determinar si los cambios observados en la diversidad de estos organismos son atribuibles al uso y manejo del suelo y evaluar la magnitud de estos cambios. Se realizaron muestreos en 23 localidades de la provincia, donde en cada sitio se determinaron el nivel de perturbación (NiP) del uso del suelo, propiedades edáficas y, la densidad poblacional, riqueza y diversidad de especies para la comunidad de lombrices. Los resultados mostraron que la abundancia y riqueza de la comunidad de lombrices variaron en los diferentes sitios, respondiendo sensiblemente al NiP del uso del suelo. Los sitios con NiP bajos y medios registraron ensambles de lombrices más diversos. En conclusión, la comunidad de lombrices resultó ser un indicador eficiente del estimador de la calidad del suelo, herramienta potencial para el monitoreo del uso y manejo del suelo de los sistemas de producción en la provincia de Santa Fe.

Long term effects of the soil use in the earthworms' community (Annelida, Oligochaeta) in Santa Fe province

In the last 30 years, Santa Fe' province was affected by the process of agriculturization that involved not only the use of new land, but also the conversion of existing agricultural, fruit and vegetable and livestock systems. Degradation of soil and its relation with the edafofauna became a crucial issue for the management of the resource. Earthworms play a key role in soil structure and fertility, constituting a good indicator of soil quality. This thesis aimed to study earthworm' community in Santa Fe' province, in order to determine if the observed changes in the diversity of these organisms are attributable to the use and management of the soil and to evaluate the magnitude of these changes. Samplings were carried out in 23 localities of the province, where were determined the level of disturbance (NiP) of soil use, soil properties and population density, richness and species diversity for each sites. The results

showed that abundance and richness of earthworm' community varied in the different sites, responding sensibly to NiP of the soil use. Sites with low and medium NiP recorded more diverse earthworm' assemblages. In conclusion, earthworms' community proved to be an efficient indicator of the soil quality estimator, a potential tool for monitoring soil use and management in Santa Fe' province production systems.

Modificación de implantes cardiovasculares con propiedades anti-restenóticas y anti-trombóticas: tratamiento de superficie y liberación controlada de drogas

Lucila Navarro

lnavarro@intec.unl.edu.ar

Director: Dr. Ignacio Rintoul

Co-Director: Dr. Julio Luna

Lugar de realización: Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC). Laboratorio Química Fina. Universidad Nacional del Litoral

Fecha de defensa: 14 de marzo de 2017

La angioplastia percutánea coronaria transluminal seguida por la implantación del stent ha ganado particular interés a desde su surgimiento en 1986. Sin embargo, a pesar de la mejora que significó la implantación del stent, aún presenta serias limitaciones clínicas que incluyen intra-stent restenosis y trombosis. Frente a esta problemática, la presente tesis plantea un aumento en la funcionalidad del stent coronario a través de un mejoramiento en sus propiedades anticorrosivas, así como también el empleo de plataformas liberadoras de drogas con el fin de evitar el sobre-crecimiento celular.

La mayor parte de los stents disponibles comercialmente están fabricados en acero inoxidable 316L. Es por esta razón, que la corrosión va a tener un impacto en la funcionalidad del implante a largo plazo, afectando tanto su desempeño mecánico debido a la disolución del material, como biológico debido a la liberación de iones metálicos tóxicos al tejido que lo rodea y que se identifican como un desencadenante clave del proceso restenótico. Se realizó un estudio detallado de los eventos corrosivos que suceden en los stents cuando se sitúan en un entorno fisiológico. Asimismo, se realizaron una serie de pasivados químicos destinados a retardar dichos eventos corrosivos. La superficie tratada fue caracterizada mediante técnicas espectroscópicas para la determinación química de la capa de óxido formada. Las propiedades corrosivas fueron caracterizadas por técnicas electroquímicas y mediante ensayos de inmersión para el seguimiento *in vitro* de los procesos corrosivos. Adicionalmente, se estudiaron con fines comparativos, otros sistemas de recubrimientos de stents comercialmente disponibles.

Los sistemas de administración local de drogas han adquirido una gran importancia en la última década. Los stents liberadores de drogas surgieron para afrontar la problemática de la restenosis ocasionado por un

sobre-crecimiento del tejido vascular. Se planteó la utilización de poli (ácido láctico-co-glicólico) como polímero base para el empleo en sistemas de liberación fármacos anti-proliferativos como paclitaxel. En primera instancia se caracterizaron diferentes proporciones de ácido láctico/ácido glicólico, así como también diferentes pesos moleculares. En base a los resultados obtenidos se propuso la utilización de mezclas poliméricas, con el fin de incrementar la elasticidad de la matriz ya que podría comprometer su uso como recubrimientos de stents, y a su vez modificar los patrones de liberación a una velocidad deseada. Para ello se sintetizaron y caracterizaron una serie de poliésteres alifáticos de bajo peso molecular derivados de ácido sebácico y dioles de diferentes longitudes. Se realizaron diferentes mezclas poliméricas y se caracterizaron las propiedades logrando incrementar la flexibilidad y modular la velocidad de liberación de Paclitaxel.

Frente a la elevada rigidez del PLGA y sus limitaciones en su empleo en tejidos blandos. A los que se suma, su elevado índice de captación de agua que ocasiona una deformación excesiva por su naturaleza de erosión por masa, es que se propone como recubrimiento alternativo el uso de polímeros elastoméricos. Éstos suponen un mejor desempeño debido a su naturaleza elástica y erosión por superficie que conducen a una mínima deformación durante el proceso de degradación. Adicionalmente, presentan un mejor desempeño que los materiales empleados actualmente, para su aplicación en ingeniería de tejidos blandos como cartílago, tendones y arterias. En la presente tesis se sintetizan elastómeros derivados de ácido adípico y derivados de ácido sebácico, utilizando diferentes dioles y entrecruzantes (glicerol y eritritol). Sus propiedades térmicas y mecánicas fueron caracterizadas, así como también los perfiles de degradación y captación de agua. Se realizaron ensayos de citotoxicidad in vitro demostrando una buena biocompatibilidad celular. Finalmente los polímeros fueron utilizados como recubrimientos de stent pudiendo ser empleados mediante diversas técnicas como inmersión, electrospray y electrospinning.

Despite significant advances that represented the implementation of cardiovascular stent over regular angioplasty, there are still some serious clinical limitations that include intra-stent restenosis and thrombosis. To face this issue, the current thesis propose an increase in coronary stent functionality through different approaches. As corrosion events of stainless steel stents has been identified as a key mechanism in triggering the process of restenosis, a series of strategies has been developed in order to generate a stable oxide layer over implant surface capable of delaying the corrosive events. On the other hand, various polymeric platforms were employed based on the use of poly (lactic-co-glycolic acid) and novel polyesters for the modulation of anti-proliferative drugs release in order to avoid cell overgrowth and arterial occlusion. Finally, as an alternative approach to the use of conventional thermoplastic polymers, a series of biocompatible elastomers derived from adipic acid and sebacic acid were synthesized. These elastomers were extensively characterized and used as polymeric coatings material on cardiovascular stents that can be applied by various techniques such as immersion, electrospray and electrospinning.

Biología reproductiva de especies de aves del río Paraná Medio, Argentina

Pamela Olguin

pameolguin_06@hotmail.com

Directo: Adolfo Héctor Beltzer

Co-director: Alejandro Raúl Giraudo

Lugar de realización: INALI. Laboratorio Biodiversidad y Conservación de Tetrápodos.

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral

Fecha de defensa: 23 de marzo de 2017

La reproducción es un proceso fundamental de la historia de vida de las aves y uno de los que demandan mayor gasto de energía. Numerosos parámetros reproductivos (éxito reproductivo, eclosión y volantón) se pueden correlacionar con ciertos factores biológicos (depredación y parasitismo) y climáticos (temperatura y precipitación) que pueden influir en la estructura de los nidos, sitio de nidificación, tamaño y número de huevos, supervivencia de los mismos y de los pichones. Asimismo, los factores intrínsecos de las aves permiten responder a los retos que imponen los ambientes de diferentes maneras, por ejemplo, existen pichones que eclosionan del huevo muy desarrollado capaces de desplazarse inmediatamente y son prácticamente independientes de los padres al nacer, denominados precociales, como por ejemplo algunos No Passeriformes como *Gallinula galeata*. Por otro lado, las Passeriformes (como *Polioptila dumicola*) y algunas No Passeriformes (*Butorides striata*), no completan su desarrollo y son completamente dependientes de los padres, llamadas altriciales. Las estrategias y parámetros reproductivos en cuanto a la inversión en la calidad, cantidad de huevos y pichones, pueden variar entre estas especies. En este sentido, se propuso evaluar estrategias, parámetros reproductivos y la influencia de los factores intrínsecos, biológicos y ambientales con el éxito reproductivo de algunas aves en Santa Fe. Se estudiaron 4 especies de No Passeriformes (*Butorides striata*, *Rostrhamus sociabilis*, *Phimosus infuscatus* y *Gallinula galeata*) y 4 de Passeriformes (*Polioptila dumicola*, *Fluvicola pica*, *Chrysomus ruficapillus* y *Agelasticus cyanopus*), de las cuales se analizaron y caracterizaron los nidos, huevos y pichones. El estudio abarcó tres temporadas reproductivas entre septiembre 2012 y marzo 2015, en dos sitios de Santa Fe. Se calculó el período de incubación y permanencia de los pichones, éxito reproductivo, eclosión, volantón, tasa de natalidad específica, tasa bruta de mortalidad y la tasa de mortalidad específica por edades. Además, se estimó la frecuencia e intensidad del parasitismo, depredación de nidos y la inferencia de los factores climáticos como temperatura y precipitación. En general, se observó que los nidos no registraron diferencias entre la altura desde el nivel del agua o del suelo entre temporadas. Se puede exceptuar, los nidos exitosos y fracasados que registraron diferencias, siendo los primeros los que se ubicaron a baja altura, como por ejemplo: *Butorides striata* y *Rostrhamus sociabilis*. En las Passeriformes no se hallaron diferencias. Todas las especies de aves registradas construyeron sus nidos en microhabitat con protección vegetal o semiprotegidos, logrando un mayor éxito que los nidos que se encontraron desprotegidos. En cuanto a la estructura de los nidos se puede concluir que las especies No Passeriformes presentaron

nidos en forma de plato poco elaborados, exceptuando a *Gallinula chloropus*. Los nidos de Passeriformes evidenciaron un alto grado de elaboración y variaron morfométricamente durante las tres temporadas reproductivas. En *Polioptila dumicola* dichas diferencias no se relacionaron con el número de huevos puestos ni con su éxito. Dentro de las especies No Paseriformes y Passeriformes registradas las medidas morfométricas de los huevos no variaron entre las temporadas en la mayoría de las especies. En cambio, se observó una reducción en la cantidad de huevos por nido y no en el tamaño de los mismos. En las precociales los huevos fueron de mayor tamaño y número por nido a diferencia de las altriciales. Del total de pichones de No Passeriformes se observó que las medidas morfométricas, durante los tres períodos reproductivos presentaron diferencias en algunas de las especies en los diferentes rangos de edad. En algunas especies de Passeriformes (*Polioptila dumicola* y *Chrysomus ruficapillus*) no se observaron diferencias en las medidas morfométricas de los pichones entre 0 y 3 días de eclosión. Esto se podría relacionar con la capacidad o cantidad de alimento que reciben en esta etapa. En cambio, se registraron diferencias en las medidas morfológicas en las edades superiores en *Fluvicola pica*. Entre los pichones de aves altriciales y precociales las diferencias encontradas fueron las esperadas. El éxito reproductivo de las aves Passeriformes varió entre 12% y 35% y en las No Passeriformes estudiadas el rango osciló entre 49% y 82%. Se observó que *Butorides striata* presentó el mayor éxito reproductivo y *Chrysomus ruficapillus* el menor. Las aves No Passeriformes presentaron en general un rango mayor de éxito de eclosión (de 67% a 80%) que las Passeriformes (de 42% a 56%) y todas las especies registradas presentaron un éxito de volantón mayor del 50%. Los resultados obtenidos evidenciaron que el parasitismo y la depredación son factores biológicos que influyeron muy poco en el éxito reproductivo de las No Passeriformes. Sin embargo, no sucedió lo mismo en las Passeriformes, como por ejemplo en *Polioptila dumicola*, cuyo principal factor biológico que afectó el éxito reproductivo fue la depredación y en *Fluvicola pica* se observó que un 26,41% de los nidos fracasaron por parasitismo de *Molothrus* sp. En las dos especies de ictéridos estudiadas (*Chrysomus ruficapillus* y *Agelasticus cyanopus*) el parasitismo y depredación fueron los factores que en menor medida afectaron su éxito reproductivo. Los períodos de incubación entre las especies con mayor y menor depredación fueron diferentes, siendo menor en las especies con menor depredación. Los factores climáticos como temperatura y precipitación influyeron en mayor o menor medida según las especies, se observó que la precipitación influyó en el número de nidos, tamaño de huevo y número de volantones, en tanto que la temperatura se correlacionó, en las No Passeriformes, con el tamaño de los huevos y número de volantones, mientras que, en las Passeriformes, con el número de nidos observados. La información obtenida aporta datos inéditos, que son escasos en la región y que constituyen un avance de importancia en el estudio de las aves y en la biología reproductiva de especies de interés local, regional y global, con implicancias en el entendimiento de la ecología, las estrategias y las interacciones bióticas y abióticas.

Reproductive biology of bird species of the river Paraná Medio, Argentina

Numerous reproductive parameters (reproductive success, hatching and fledging) can be correlated with certain biological (predation and parasitism) and climatic (temperature and rainfall) factors than can exercise influence on the structure of nests, nesting site selection, size and number of eggs, and survival of eggs and chicks. And that, in addition, can vary between species. Likewise, some intrinsic factors of birds enable them to meet the challenges imposed by environments in different ways in birds. In this sense, it was proposed to evaluate strategies, reproductive parameters and the influence of the intrinsic, biological and environmental factors with the reproductive success of the birds. Non - Passeriformes and Passeriformes were studied, from which the nests, eggs and pigeons were analyzed and characterized. Different reproductive parameters were calculated and the frequency and intensity of parasitism, nest predation and inference of climatic factors were estimated. Within the registered species a reduction was observed in the number of eggs per nest and not in the size of the eggs. In precocial eggs the eggs were larger and number per nest unlike the altricial ones. *Butorides striata* had the highest reproductive success and *Chrysomus ruficapillus* the smallest. Parasitism and predation are factors that most strongly influenced the reproductive success of the Passeriformes. The information obtained in this thesis provides original data which are scarce for this region. These data constitute an important step forward in the study of birds and the reproductive biology of species of local, regional and global interest, with implications on the understanding of ecology and of biotic and abiotic strategies and interactions.

Fagos autóctonos de *Leuconostoc*: caracterización, interacción con sus cepas sensibles e implicancias industriales

Silvina Pujato

spujato@unl.edu.ar

Directora: Dra. Andrea Quiberoni

Co-Directora: Dra. Daniela Guglielmotti

Lugar de realización: Instituto de Lactología Industrial. Ingeniería Química. Universidad Nacional del Litoral

Fecha de defensa: 9 de marzo de 2017

Leuconostoc es utilizado en la producción de gran variedad de productos lácteos como quesos, cremas, manteca y leches fermentadas, desempeñando un rol esencial en la formación del *flavor* y textura, a través de la producción de compuestos de aroma y gas (CO₂). Específicamente, el empleo de *Leuconostoc mesenteroides* en la elaboración de quesos azules tiene por objeto generar una textura abierta en la masa, lo que posibilita la colonización de *Penicillium roqueforti* y contribuye, además, a la inhibición de mohos contaminantes sensibles a elevadas concentraciones de CO₂.

En nuestro país, no existen reportes de episodios que involucren a fagos de *Leuconostoc*, posiblemente porque las cepas de este género son utilizadas, en muchos casos, como fermentos adjuntos, y el problema podría haber pasado desapercibido o haber sido adjudicado a otros factores. Sin embargo, durante un monitoreo realizado por nuestro grupo en una planta quesera local, fue posible aislar fagos infectivos de las cepas de *Leuconostoc* que forman parte del fermento utilizado para la elaboración de ciertos quesos. Nueve de estos aislamientos (LDG, CHA, CHB, CyC1, CyC2, Ln-6, Ln-7, Ln-8 y Ln-9) fueron materia de estudio durante la presente Tesis.

Los perfiles de restricción obtenidos con XhoI, ClaI, HindIII y EcoRV permitieron agrupar a los fagos en 6 *clusters* distintos y seleccionar uno de cada patrón para los posteriores estudios (LDG, CHA, CHB, Ln-7, Ln-8 y Ln-9). La caracterización molecular de los seis fagos evidenció genomas de ADN lineal de doble cadena, con tamaños que oscilaron entre 26,5 y 28,9 kb y mecanismo de empaquetamiento del ADN genómico del tipo *cos* para todos ellos. De acuerdo a la similitud de las secuencias nucleotídicas, se los clasificó en dos grupos notablemente diferentes. Los genomas de los fagos CHA, CHB, Ln-7, Ln-8 y Ln-9 mostraron una homología mayor al 90 % con diversos fagos que infectan cepas de *Leuconostoc mesenteroides*. Por su parte, el genoma del fago LDG mostró 90 % de homología con fagos infectivos de cepas de *Leuconostoc pseudomesenteroides*. De acuerdo a sus características morfológicas (cápsides icosaédricas, colas no contráctiles, más o menos rígidas), los seis fagos se incluyeron en la familia *Siphoviridae*.

En cuanto a la resistencia de las partículas fágicas a la congelación (-20 °C y -80 °C), tratamientos térmicos (63 °C, 72 °C, 80 °C y 90 °C) y valores extremos de pH (4 y 11) se observó, en general, una buena viabilidad en las diferentes condiciones. Durante los ensayos de inactivación con biocidas industriales y de laboratorio, fue notable la resistencia demostrada por algunos fagos (LDG, Ln-7 y Ln-8) frente a NaClO (>1400 ppm cloro activo durante 45 min para inactivación completa).

La determinación del espectro de hospedadores arrojó resultados sorprendentes, ya que todos los fagos fueron capaces de infectar a todas las cepas en estudio, tanto *Leuc. mesenteroides* como *Leuc. pseudomesenteroides*, evidenciándose cuatro patrones de comportamiento distintos frente a los hospedadores, que coinciden con los 4 tipos de fragmentos variables de la proteína de unión al receptor (RBP). En cuanto a los parámetros de multiplicación fágica, se observaron períodos de latencia de entre 29 y 62 min, tiempos de *burst* de entre 54 y 96 min y *burst sizes* de entre 29 y 56 UFP/centro de infección (fagos LDG, CHB, CyC1, Ln-7, Ln-8 y Ln-9) y de 111 UFP/centro de infección para el fago CHA.

Las tasas de adsorción de los viriones a sus respectivas cepas indicadoras fueron superiores al 99 % luego de 5 min de incubación a 30 °C. La etapa de adsorción se completó aún en ausencia de calcio, así como a temperaturas que variaron entre 0 °C y 50 °C, y con valores de pH entre 4 y 9, a excepción de algunos fagos cuya adsorción disminuyó a partir de los 42 °C. Por otro lado, las células no viables fueron capaces de adsorber los viriones, concluyéndose que la adsorción fágica no requeriría de células en estado metabólico activo. La caracterización preliminar de los receptores fágicos sugiere que componentes de origen hidrocarbonado estarían involucrados en esta etapa del proceso infeccioso para todos los fagos investigados.

Se aisló un total de 43 mutantes fagorresistentes a partir de las 6 cepas indicadoras de *Leuconostoc*, utilizando 6 fagos, ya sea de manera individual o conjunta (cóctel). El nivel de fagorresistencia de las variantes obtenidas fue muy bueno, con valores de EOP (*efficiency of plaquing*) muy bajos ($<10^{-8}$) y elevada estabilidad de este fenotipo. Las tasas de adsorción de los fagos sobre las variantes exhibieron cierta diversidad, lo que sugiere la existencia de otros mecanismos de fagorresistencia asociados (que operarían en etapas posteriores) en aquellos mutantes con adsorciones fágicas elevadas.

In this Thesis, a molecular characterization (including DNA packaging mechanisms, genome sequencing and structural protein identification) of nine *Leuconostoc* phages was carried out. Based on similarity of nucleotide sequences, phages were classified in two notably different groups. Complete genomes of phages CHA, CHB, Ln-7, Ln-8 and Ln-9 showed sequence homology higher than 90 % with phages infecting various strains of *Leuconostoc mesenteroides*, while genome of phage LDG showed 90 % homology with phages infecting *Leuconostoc pseudomesenteroides* strains.

On the other hand, phage viability throughout storage at different pH and temperature was determined for these phages. To characterize the interaction between phages and their sensitive strains, the following aspects were studied: influence of divalent cations during the lytic cycle, host spectrum, one step growth curves, characterization of the adsorption step and phage receptors. Host range studies yielded surprising results, since all studied phages were able to infect both *Leuc. mesenteroides* and *Leuc. pseudomesenteroides* strains.

In addition, the behavior of phages subjected to thermal and chemical, used to diminish the frequency of phage infections, was studied. Also, the isolation of phage-resistant mutants with adequate technological properties was carried out.

Results obtained in this Thesis significantly contributed to improve the knowledge about phage infections on *Leuconostoc*, which would be useful if this bacterial species is used in the manufacture of cheese, sour cream, buttermilk and fermented milk.. On the other hand, this work demonstrated that the assayed methodologies are efficient for obtaining spontaneous phage-resistant mutants from *Leuconostoc* strains with adequate technological properties.

Contaminación acuática por glifosato: efecto sobre especies nativas y eficiencia de procesos de remediación

Ulises Reno

ulisesreno@hotmail.com

Directora: Dra. Ana María Gagneten

Co-Directora: Dra. Cristina Zalazar

Lugar de Realización: Laboratorio de Ecotoxicología. Facultad de Humanidades y Ciencias. Universidad Nacional del Litoral

Fecha de defensa: 16 de marzo de 2017.

En el Capítulo I de esta tesis se explica el desarrollo de ensayos ecotoxicológicos que se realizaron para: 1) evaluar la posible toxicidad aguda y crónica de cuatro formulaciones con glifosato mediante respuestas en la tasa de crecimiento, el porcentaje de inhibición, la supervivencia y la reproducción de especies de diferente nivel trófico (microalgas: *Chlorella vulgaris* y microcrustáceos: *Daphnia magna* y *Ceriodaphnia dubia*; 2) conocer cómo influyen las diferentes sales utilizadas en las formulaciones en la toxicidad de las muestras tratadas con el proceso UV/H₂O₂; 3) establecer en qué condiciones del tratamiento con el proceso UV/H₂O₂ los efluentes dejan de ser tóxicos mediante la realización de bioensayos con *C. vulgaris* y con dos especies de crustáceos cladóceros: *D. magna* y *C. dubia*; 4) generar información relevante a partir de ensayos de recuperación con cladóceros.

Los resultados obtenidos a partir de las pruebas mostraron que la toxicidad de las presentaciones comerciales de agroquímicos varía según los componentes que lo conforman y la especie utilizada como organismo de prueba. Además, se destaca la importancia de realizar ensayos crónicos y especialmente de recuperación que permitan una evaluación ambiental donde se incluyen parámetros biológicos integradores con sentido ecológico.

En relación con la evaluación del proceso UV/H₂O₂, en el mayor tiempo de reacción (360 min), no se alcanzó el 50% de inhibición del crecimiento de *C. vulgaris* en ninguno de los formulados. Contrariamente la evaluación del proceso con microcrustáceos mostró que en el mismo tiempo de reacción, en dos de los formulados evaluados la especie más sensible y representativa de la región (*C. dubia*) alcanzó 60 y 80 % de mortalidad respectivamente.

La evaluación del proceso UV/H₂O₂ mostró la importancia de realizar ensayos de toxicidad con especies representativas de la región. En este sentido, la información aportada por este trabajo en cuanto a la toxicidad de las presentaciones comerciales de glifosato y la aplicación de nuevas tecnologías, podría contribuir a disminuir la brecha existente entre el uso masivo de plaguicidas y la falta de información sobre la toxicidad de la formulaciones en la región centro-este de Argentina.

Los datos generados a partir de la evaluación del proceso UV/H₂O₂ se utilizaron para realizar los ensayos del Capítulo II de la presente tesis. En este Capítulo se expone el uso de *C. vulgaris* como organismo para: 1) remover glifosato utilizando los mismos formulados de empleados en la aplicación del proceso UV/H₂O₂ y desarrollado en el Capítulo I; 2) la remoción de nutrientes presentes en efluentes provenientes de producción láctea y porcina y conocer la concentración de clorofila-a y el porcentaje de proteínas brutas en la biomasa algal obtenida en ambos efluentes; 3) evaluar bioquímicamente la calidad de la biomasa de *C. vulgaris* obtenida en cultivos a escala de fotobioreactores.

En cuanto a los resultados del Capítulo II, en lo que se refiere al % de remoción de glifosato, *C. vulgaris* removió más glifosato cuando fue expuesta durante 360 min al formulado Eskoba® (11,22 %).

Los resultados muestran que *C. vulgaris* tiene poca capacidad de remover glifosato de soluciones acuosas, por lo que en el caso de considerar complementar el proceso UV/H₂O₂ con un etapa de bioremediación, es recomendable utilizar otros microorganismos.

Por otro lado, los valores de remoción registrados cuando *C. vulgaris* fue cultivada con efluentes de tambo, fueron similares a los relevados en la bibliografía especializada, lo que muestra la capacidad y potencialidad de *C. vulgaris* para este uso.

Además, cuando *C. vulgaris* se cultivó en fotobioreactor sin efluentes, la biomasa obtenida presentó la siguiente composición bioquímica: 7,5; 3,28; 7,11; 44,43; 0,20 % de carbohidratos, lípidos, nitrógeno, proteínas brutas, fibra, respectivamente y 1,26 µg L⁻¹ de Clorofila-a. Estas características, convierten a la biomasa de *C. vulgaris* en un producto de interés para diferentes usos, tales como en la industria alimenticia o cosmética.

Aquatic contamination by glyphosate: effect on native species and efficiency of remediation processes

Chapter I of this thesis explains the development of ecotoxicological tests that were carried out to: 1) evaluate the possible acute and chronic toxicity of four formulations with glyphosate by the responses in growth rate, percent inhibition, survival; 2) to know how the different sales used in formulations affect the toxicity of the samples treated with the UV/H₂O₂ process; 3) to establish in what conditions of the treatment with the UV/H₂O₂ process the effluents cease to be toxic by conducting bioassays with *C. vulgaris* and two species of cladoceran; 4) generate relevant information from recovery trials with cladocerans.

The results obtained from these tests showed the importance of performing chronic tests, specially recovery ones considering integrative biological parameters that add information for an environmental assessment is highlighted.

Chapter II discusses the use of *C. vulgaris* as an organism to: 1) remove glyphosate using the same formulations used in the application of the UV/H₂O₂ process; 2) the removal of nutrients present in effluents from dairy and pig production; 3) to evaluate biochemically the quality of the biomass.

Chlorella vulgaris has little ability to remove glyphosate from aqueous solutions, so in the case of considering bioremediation as a complement of the UV/H₂O₂ process, is advisable to use other microorganisms

The values recorded after culturing *C. vulgaris* in dairy farm effluents, which shows the capacity and potential of *C. vulgaris* for this use.

The protein characteristics of *C. vulgaris* biomass make it a product of interest for industry.

Influencia de los patrones de expresión, la conservación y la divergencia de secuencias de los factores de transcripción HD-Zip I de *Arabidopsis thaliana* sobre su función biológica

Pamela Anahí Ribone

pamela.ribone@santafe-conicet.gov.ar

Directora: Dra. Raquel Lía Chan

Lugar de realización: Instituto de Agrobiotecnología del Litoral. Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral

Fecha de defensa: 16 de febrero de 2017

El control de la regulación de la expresión génica es fundamental para la supervivencia de todos los organismos vivos, ya que para desarrollarse correctamente necesitan una fina regulación de las proteínas y moléculas efectoras. En plantas, la necesidad de control sobre la expresión génica se hace más evidente ya que son organismos sésiles que no pueden utilizar el movimiento para adaptarse a las condiciones medioambientales y deben valerse únicamente de la modificación de su proteoma y metaboloma para responder a los distintos cambios que se presenten.

En todos los seres vivos, el control de la regulación génica se da en tres niveles diferentes: transcripcional (qué genes serán transcritos a ARN), post-transcripcional (qué ARNs serán traducidos) y post-traduccionales (qué proteínas serán activas). En plantas la regulación transcripcional es la más importante e involucra un tipo de proteínas especial denominadas factores de transcripción (FTs) que reconocen secuencias específicas de ADN y regulan la expresión génica de sus blancos. 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. Estos FTs se caracterizan por la combinación singular de un homeodominio (HD) que permite el reconocimiento del ADN asociado a un cierre de leucinas (LZ), que actúa como un dominio de dimerización, esencial para la unión al ADN. Esta familia se divide a su vez en cuatro subfamilias. Los miembros de la subfamilia I han sido relacionados principalmente con procesos moleculares vinculados al estrés.

En este trabajo de Tesis nos planteamos caracterizar funcionalmente dos FTs de la subfamilia HD-Zip I de *Arabidopsis thaliana*: AtHB13 y AtHB23. Los genes que los codifican son parálogos entre sí y ya se había informado que compartían un patrón de expresión similar. Nuestro interés era conocer las funciones naturales de estos genes y elucidar los mecanismos moleculares puestos en juego para cumplir dichas funciones. Además, nos inquietaba saber si en este par de parálogos existe una regulación cruzada similar a la observada para otros pares de parálogos de la subfamilia HD-Zip I de *Arabidopsis*.

Con este objetivo caracterizamos plantas silenciadas en ambos genes (*athb13-1*, *athb13-2* y *miARN23*) al igual que plantas doblemente silenciadas (*miARN13/23*) y pudimos observar dos fenotipos diferenciales en estas plantas: una elongación acelerada de la vara floral y silicuas más cortas comparadas con las de plantas salvajes. Estas herramientas nos permitieron descubrir que tanto AtHB13 como AtHB23 son necesarios para la correcta elongación de la vara floral, pero que sólo el primero es necesario para la germinación

del grano de polen, aunque AtHB23 pueda suplir su función cuando AtHB13 falta. Un análisis de secuenciación masiva de ARN, hecho en plantas *athb13-1* y salvajes, nos ayudó a dilucidar parte del mecanismo molecular involucrado en estas observaciones.

En segundo término nos preguntamos cuál era la función del marco de lectura abierto presente en la región 5' no codificante de *AtHB1*, otro miembro de la subfamilia HD-Zip I. La presencia de este marco de lectura corriente arriba (uORF, del inglés *upstream Open Reading Frame*) ya había sido descrita, pero se desconocía tanto su función como su mecanismo de acción. En esta Tesis mostramos que la secuencia aminoacídica, y no tanto la nucleotídica, de este uORF está altamente conservada entre especies. Probamos además que el uORF es capaz de reprimir la traducción de cualquier secuencia codificante que se encuentre corriente abajo, mediante un mecanismo de acción en *cis* que involucra probablemente el trabado de ribosomas. La acción de esta pequeña secuencia es tejido-específica y sólo se observa en la parte aérea de las plantas, lo que sugiere que existe un mecanismo capaz de regular su accionar. Cuando se transformaron plantas de *Arabidopsis* con construcciones que poseen el promotor de *AtHB1* mutado en el uORF y dirigiendo la expresión de *AtHB1* se obtuvieron plantas con severas aberraciones, lo que da un contexto funcional a la represión de la traducción ejercida por el uORF.

En base a lo expuesto, pudimos concluir que tanto AtHB13 como AtHB23 cumplen funciones similares en el desarrollo normal de las plantas, algunas divergentes y otras redundantes, y que existe una fina regulación entre ellos que evita la formación de granos de polen deficientes cuando AtHB13 no es funcional. Por otro lado se demostró que JUB1 es uno de los FTs involucrados en la cascada génica responsable de la tolerancia a sequía cuando *AtHB13* es sobreexpresado. Finalmente, los estudios mostrados en esta Tesis permitieron describir un mecanismo novedoso de regulación de la expresión de los FTs HD-Zip I; en este caso, la represión de la traducción de *AtHB1* mediada por el uORF presente en su región 5'UTR.

Influence of expression patterns, conservation and divergence of *Arabidopsis thaliana* HD-Zip I transcription factors sequences in its biological function

Homeodomain-leucine zipper (HD-Zip) transcription factors (TF) are unique to plants and have been classified into four subfamilies. Subfamily I members were mainly associated to abiotic stress responses. In this Thesis, functional characterization of two members of this subfamily, AtHB13 and AtHB23, was carried out. These TFs are encoded by paralogous genes expressed in the apical meristem and flowers of mature plants. Although they have similar expression patterns, their functions are different. While AtHB13 is essential for a proper pollen hydration, AtHB23 only replace it when AtHB13 is not present. In contrast, both are necessary for a correct inflorescence stem elongation. This suggests a finely coordinated regulation of the two TFs that depends on the tissue and developmental stage. In another chapter, the expression of AtHB1, another HD-Zip I TF, was investigated. AtHB1 is known to promote hypocotyl elongation acting downstream of PIF1. The gene encoding this TF has a

conserved uORF in its 5'untranslated region that is able to repress the translation of the mORF through a ribosome stalling mechanism. This post-transcriptional regulation acts in cis, independently of the downstream mORF. Moreover, such regulation is tissue-specific and depends on illumination conditions. The repression exerted by the uORF is absolutely necessary to avoid the deleterious effects produced when AtHB1 is over-expressed: an aberrant phenotype with sterile flowers.

Caracterización del metabolismo antioxidante y de reparación del daño oxidativo en *Leptospira spp.* Estudio de la relevancia de la homeostasis redox en la viabilidad de las bacterias

Natalia Sasoni

sasoni.natalia@gmail.com

Director: Dr. Diego Arias

Co-Director: Dr. Sergio Adrián Guerrero

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

Fecha de defensa: 20 de marzo de 2017

Esta Tesis se centra en el estudio de componentes antioxidantes que le permiten a *Leptospira interrogans* evadir el estrés generado durante el proceso infeccioso, así como también la implicancia de los mismos en mecanismos regulatorios y de señalización celular. En primer lugar, se presenta una caracterización cinética y estructural de la catalasa (enzima del periplasma) y el sistema tiorredoxina (enzimas citosólicas). Estas enzimas contribuyen a la detoxificación *in vivo* de H₂O₂ y *t*-BuOOH y por lo tanto juegan un papel clave en la virulencia. Además, se describe una interacción de estas proteínas con otros componentes de la bioquímica redox de la bacteria, tales como la metionina sulfóxido reductasa (Msr). Las dos isoformas de MsrA y la MsrB presentes en *L. interrogans*, mostraron capacidad de reducir a metionina, el isómero *S* y el *R* de MetSO, respectivamente. La localización periplasmática de la MsrB podría contribuir a reversión parcial de la inactivación oxidativa de la catalasa. Se evidenció la presencia de glutatión en esta bacteria y se comenzó la caracterización cinética de la gamma-glutamyl cisteína sintasa, la primera enzima implicada en la síntesis de este tiol de baja masa molecular. Finalmente, se caracterizan funcionalmente dos glutarredoxinas (Grx) presentes en la bacteria: una monotiólica, y una ditiólica. La Grx ditiólica fue capaz de ceder electrones a las Msrs, mientras que la monotiólica fue capaz de unir centros hierro-azufre. Ambas proteínas se asociaron con procesos de-glutationilación y *trans*-glutationilación de otras proteínas. Los resultados aquí presentados aportan al conocimiento sobre la biología redox en esta bacteria.

Characterization of antioxidant metabolism and metabolism of repair the oxidative damage in *Leptospira spp.* Study of the relevance of the viability of the bacteria in redox homeostasis

This thesis focuses on the study of antioxidant components that allow *Leptospira interrogans* to avoid the stress generated during the infective process, as well as the implication of them in regulatory mechanisms and cellular signaling. Firstly, a kinetic and structural characterization of the catalase (periplasm enzyme) and the thioredoxin system (cytosolic enzymes) are presented. These enzymes contribute to the *in vivo* detoxification of H₂O₂ and *t*-BuOOH and thus play a key role in virulence. In addition, an interaction of these proteins with other components of the bacterial redox biochemistry, such as methionine sulfoxide reductase (Msr), is described. The two MsrA and MsrB isoforms present in *L. interrogans*, showed ability to reduce to methionine, the S-isomer and R of MetSO, respectively. The periplasmic localization of MsrB could contribute to partial reversal of oxidative inactivation of catalase. The presence of glutathione was evidenced in this bacterium and the kinetic characterization of gamma-glutamyl cysteine synthase, the first enzyme involved in the synthesis of this low molecular mass thiol, was started. Finally, two glutaredoxins (Grx) are present in the bacterium: a monothiol and a dithiol Grx. The dithiol Grx was able to give electrons to the Msrs, whereas the monothiol Grx was able to join iron-sulfur centers. Both proteins were associated with processes of de-glutathionylation and trans-glutathionylation of other proteins. The results presented here contribute to the knowledge about redox biology in this bacterium.

Ensamblajes de macrófitas en ambientes de la llanura aluvial del Río Paraná Medio: factores que inciden a distintas escalas

Berenice Schneider

bereschneider@gmail.com

Directora: Dra. Sidinei Magela Thomaz

Co-Directora: Dra. Mercedes Marchese.

Lugar de realización: Instituto Nacional de Limnología (INALI – CONICET – UNL). Laboratorio de Vegetación.

Fecha de defensa: 29 de marzo de 2017.

Las macrófitas constituyen unos de los componentes más importantes de los sistemas de ríos con llanura aluvial debido a que intervienen en el ciclado de nutrientes, dinámica de sedimentos e incrementan la complejidad estructural de los hábitats elevando la biodiversidad. Una variedad de factores abióticos afectan los ensamblajes de macrófitas a diferentes escalas locales o regionales, y en consecuencia intervienen sobre la dinámica de los ecosistemas. En esta Tesis se analizó en veintiocho ambientes de la llanura aluvial del río Paraná Medio, si la riqueza taxonómica y la composición de macrófitas varían entre los ambientes con diferente grado de conectividad y cuáles son los factores determinantes de tales diferencias; se determinó la influencia de las variables ambientales sobre la biomasa de los grupos funcionales de macrófitas y la importancia de las variables abióticas locales, hidrogeomorfológicas y espaciales sobre la diversidad-beta. Por

otro lado, se evaluó a escala de mesocosmos, el efecto del área de islas de macrófitas flotantes y de la distancia de estas islas a una fuente de invertebrados, sobre la abundancia y riqueza de invertebrados asociados. La riqueza taxonómica no presentó diferencias significativas en relación al grado de conectividad de los ambientes, mientras que en la composición se encontraron diferencias significativas entre las lagunas desconectadas y las conectadas, y entre las lagunas desconectadas y los cauces. La riqueza de especies fue explicada por una combinación de variables morfométricas, nutrientes y disponibilidad de luz; la composición de los ensamblajes fue determinada por la conectividad y la morfometría de los ambientes, mientras que la altura de la vegetación fue determinada por los nutrientes. El grado de conectividad fue el determinante más importante de la composición de la biomasa y de la biomasa de los grupos funcionales individuales de macrófitas, pero ninguna de las variables respuesta consideradas se asoció con el período hidrológico. Entre cuatro alternativas consideradas para explicar la estructura espacial, la distancia entre lagunas por cursos de agua fue la que mejor describió la organización espacial de la diversidad beta, indicando que los límites a la dispersión deben ser interpretados en relación a distancias por vías hídricas. La contribución del recambio espacial fue más fuerte que la del anidamiento probablemente asociado a la heterogeneidad ambiental de la llanura estudiada. Los resultados sugieren que las comunidades de macrófitas se organizan en base a la influencia tanto de procesos neutrales mediados por limitaciones a la dispersión como de procesos de selección de especies conducidos por variables hidrogeomorfológicas asociadas al disturbio ocasionado por el pulso hidrológico. La abundancia y riqueza total de invertebrados así como la abundancia de Chironomidae se relacionaron positivamente con el área de las islas de macrófitas pero no con la distancia a la fuente de invertebrados. Los resultados de esta experiencia sugieren que los parches de macrófitas flotantes constituyen un medio de dispersión de invertebrados y que, el área de los parches puede ser un factor importante en la distribución y mantenimiento de la diversidad de invertebrados en ambientes de llanuras aluviales subtropicales. Los resultados obtenidos en esta Tesis permiten concluir que las variables locales más importantes determinantes de los ensamblajes de macrófitas acuáticas en el sector estudiado de la llanura aluvial del río Paraná Medio son aquellas que representan la disponibilidad de nutrientes (conductividad, nitrato y amonio), y variables morfométricas que representan la diversidad de micro-hábitats (profundidad, distancia a la línea de costa). A escala regional, las variables más importantes son aquellas que regulan el disturbio ocasionado por el pulso hidrológico: conectividad, nivel hidrométrico, altitud, distancia al cauce principal y distancia entre ambientes por los cursos de agua. Así, cualquier macrofactor que altere los patrones de conectividad y de hidrografía como, por ejemplo, alteraciones en la precipitación pluviométrica causada por cambios globales, o cambios en el flujo del agua por la construcción de represas, ciertamente ocasionará impactos sobre varios atributos de la diversidad y composición de los ensamblajes de macrófitas.

Macrophyte assemblages in the Middle Paraná River floodplain: influence of factors at different scales

Macrophytes are one of the most important components of river–floodplain systems but are affected by a variety of abiotic factors at different local or regional scales. In this thesis, we studied twenty–eight waterbodies of the Middle Paraná river–floodplain, and evaluated the main determinants of taxonomic richness, composition, biomass of functional groups and beta–diversity of macrophyte assemblages; and we studied the effect of area of floating macrophyte stands and its distance to an invertebrate source, on the abundance and richness of associated invertebrates. Macrophyte species richness was explained by a combination of morphometric variables, nutrient and light availability; assemblage’s composition was determined by the morphometry and connectivity of the waterbodies. The biomass of individual functional groups and of functional groups composition was mainly determined by connectivity. Turnover was mainly explained by hydrogeomorphological variables, and was more important than nestedness, which was exclusively explained by the distance between lakes by watercourses. Results suggested that neutral processes mediated by dispersal limitations and species–selection processes driven by hydrogeomorphological variables structure macrophyte assemblages. Invertebrates abundance and richness were positively related only to macrophyte stands area, suggesting that area may affect the distribution and diversity of invertebrates in subtropical floodplains. In conclusion, the most important drivers of macrophyte assemblages at local scale are those related to nutrient availability (e.g. conductivity, nitrate) and morphometric variables that represent microhabitats diversity (depth, distance to shore). At regional scale, are those variables that regulate the pulse disturbance (e.g. connectivity, hydrometric–level, altitude, distance to the mail channel).

Desarrollo de estrategias analíticas basadas en técnicas cromatográficas y modelado quimiométrico para la determinación de ácido retinoico y principios activos de uso veterinario en muestras de interés biológico

Carla Mariela Teglia

carlategla@gmail.com

Directora: Dra. María Julia Culzoni

Codirector: Héctor Goicoechea

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

Fecha de defensa: 04 de diciembre de 2017

En la presente tesis doctoral, el capítulo 1 contiene el desarrollo de métodos para la determinación de ácido retinoico en plasma. El desarrollo experimental se dividió en dos secciones. En la primera se describe el desarrollo analítico para realizar la separación cromatográfica ácido retinoico y sus isómeros. Posteriormente, el método se validó en forma completa. Luego del análisis se concluyó la falta de efecto matriz en el rango de trabajo y la bondad del método en términos de precisión y recuperación. Como punto clave se analizó la factibilidad del cálculo de los límites de detección y cuantificación utilizando diferentes técnicas. Con este

método se analizaron muestras de plasma de *Leptodactylus chaquensis*, provenientes de dos zonas, una zona de referencia y un campo de arroz. Como conclusión, las diferencias en las concentraciones de ácido retinoico y 13-*cis*-ácido retinoico, y la falta de diferencias entre los valores de retinol, permitió suponer la exposición de los anfibios a agentes que afectan la vía del ácido retinoico en un paso posterior a la conversión a retinol. Estas diferencias hacen necesario el monitoreo constante de las poblaciones, con el fin de estudiar el mecanismo por el cual los contaminantes influyen en la vía de señalización de los retinoides. En la segunda sección se utilizó el algoritmo Resolución Multivariada de Curvas mediante Cuadrados Mínimos Alternantes (MCR-ALS) con el objetivo de determinar retinoides a partir de datos en los que existían separaciones parciales entre los componentes. Para el análisis, a partir de matrices individuales, se construyó la matriz aumentada en modo temporal correspondiente al corte en tiempos 2.8 y 4.6 minutos y longitudes de onda 240 y 442 nm, pudiéndose determinar los compuestos 9,13-di-*cis*-ácido retinoico, 13-*cis*-ácido retinoico, 9-*cis*-ácido retinoico y ácido retinoico. Luego de la validación del método se calcularon las concentraciones de estos retinoides en pacientes en tratamiento con Isotretinoína, medicamento empleado para el control del acné severo. Los resultados obtenidos resultan de suma importancia en el monitoreo de los retinoides en pacientes con el fin de realizar tratamientos específicos, ajustando las concentraciones administradas, y logrando de este modo disminuir sus problemas teratogénicos. Al final del presente capítulo se realizó una comparación entre los métodos. Como conclusión, las herramientas quimiométricas permiten determinar en forma simultánea los componentes de la matriz y los analitos de interés, cuantificando en forma simultánea retinol y 9-*cis*-ácido retinoico. El capítulo 2 muestra el desarrollo de métodos para la determinación de principios activos de uso veterinario presentes en matrices complejas como huevo y cama de pollo. En el capítulo se describe un aumento de la complejidad del análisis, desde el estudio fisicoquímico de los analitos de interés, a la optimización de métodos de extracción y al desarrollo de un sistema cromatográfico para la determinación de multianalitos, con posterior utilización de herramientas quimiométricas. En la primera sección, se analizó la factibilidad del uso de dos estrategias para determinar valores de pK_a : la construcción de curvas de movilidad electroforética versus pH y el análisis de matrices UV-Vis mediante MCR-ALS. Las dos metodologías resultaron acordes para la obtención de valores de pK_a aparente, concluyendo que MCR-ALS brinda la ventaja de obtener las diferentes especies presentes durante el análisis. En la segunda sección se presenta el desarrollo de dos estrategias de microextracción con el objetivo de analizar seis analitos en huevo. Para poder llevar a cabo la extracción, se analizaron diferentes diseños de experimentos, optimizándose los volúmenes de los solventes necesarios para la extracción y resuspensión. Para completar el estudio, se analizó la influencia que ejercen el sistema de extracción y la matriz de la muestra. Mediante los resultados obtenidos fue posible concluir que las diferencias fisicoquímicas de los analitos determinan la factibilidad del uso de un método de extracción sobre el otro. Además, el uso rutinario de estos métodos permite reducir los volúmenes de solventes involucrados en el proceso. Por último, en la tercera sección se realizó el desarrollo completo del sistema cromatográfico para la determinación de 21 analitos, con el objetivo de obtener un método cromatográfico que posea la mayor resolución entre los principios activos. Por su parte, mediante

el uso de diseño de experimentos se optimizó el método de extracción, tanto en los porcentajes de solvente necesario como en el tiempo total de extracción. La validación se realizó en matriz adicionada utilizando herramientas quimiométricas para la obtención de los resultados. Por lo tanto, primero se realizó una corrección de línea de base, con la posterior separación de las matrices en regiones, para finalizar el análisis mediante MCR-ALS. Durante la validación del método se obtuvieron buenos rangos lineales, excelentes recuperaciones y precisiones. El método se aplicó con éxito a la determinación de principios activos en muestras de diferentes granjas comerciales. Durante el análisis de estas muestras se confirmó la presencia de una variedad de principios activos, observándose la necesidad de realizar un monitoreo constante en las granjas aviares, con el fin de mantener la inocuidad de los sistemas aledaños.

Development of analytical strategies based on chromatographic techniques and chemometric modeling for the determination of retinoic acid and active principles of veterinary use in samples of biological interest

The Chapter one includes the development of methods to determine retinoic acid in plasma of *Leptodactylus chaquensis* and dermatological patients under treatment with Isotretinoin Roaccutan. The use of design of experiments and chemometric tools, with the subsequent validation, allowed obtaining reliable results in the systems under study. The samples of *L. chaquensis* were collected in two zones, one reference and one rice field. In conclusion, the differences in the concentrations of retinoic acid and 13-*cis*-retinoic acid, but the lack of differences in retinol between the zones, suggest that the contaminants affect a part of the retinoic acid pathway following the conversion to retinol.

The Chapter two emphasizes the developed of methods for the determination of veterinary active ingredients, with the aim of their implementation in complex matrix such as egg and poultry litter. The chapter describes, firstly the study of the physicochemical characteristic of the analytes, secondly the development of the extraction method and finally the development of a chromatographic method for the multi analytes determination, using the advantages of the chemometric tools. The modeling of the data by the algorithm Multivariate Resolution of Curves by Alternating Minimum Squares provided satisfactory results, which supported its application in the systems under study. During the analysis of samples of poultry litter, the presence of a variety of active ingredients was confirmed, observing the need for a constant monitoring in avian productive systems.

Biogeografía evolutiva de pseudocangrejos de agua dulce de la familia Aeglidae (Crustacea: Anomura)

Georgina Tumini

georginatumini@hotmail.com

Director: Dr. Juan José Morrone

Co-Director: Dr. Pablo Agustín Collins

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

Fecha de defensa: 14 de marzo de 2017.

Los pseudocangrejos de agua dulce de la familia Aeglidae son los únicos anomuros dulceacuícolas, con todas sus especies agrupadas en un género exclusivo existente en la actualidad, *Aegla*. Las mismas se distribuyen en ambientes continentales de Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay. Por lo general, se encuentran en cuerpos de agua superficiales, aunque algunas especies son subterráneas. Usualmente presentan áreas de distribución relativamente pequeñas, restringidas a una única o unas pocas cuencas de drenaje adyacentes mostrando altos niveles de endemismo y algunas de sus especies presentan requerimientos de hábitat específicos. Sin embargo, algunos taxones tienen rangos distribucionales más amplios y sus diferentes poblaciones pueden formar grupos no monofiléticos. Por lo tanto, representan un excelente grupo para estudios de biogeografía, conservación y taxonomía. En el desarrollo de la presente Tesis Doctoral se combinaron datos de muestreos a campo, revisión de colecciones de museos e intensa búsqueda de información bibliográfica. En base a estas fuentes, se delinearon las áreas de distribución de todas las especies actuales y se establecieron patrones biogeográficos. Asimismo, se realizaron análisis filogenéticos, se definió el estado de conservación de las especies de Argentina y el nivel taxonómico de ciertas poblaciones citadas aquí por primera vez. La información obtenida provee una base para futuros trabajos sobre biogeografía y conservación de *Aegla* y contribuye en la expansión del conocimiento de la historia biogeográfica de los sistemas dulceacuícolas del sur de América del Sur. Estudios como estos son centrales en cuestiones fundamentales de macroecología y biología de la conservación.

Evolutionary biogeography of freshwater pseudocrabs of the family Aeglidae (Crustacea: Anomura)

Pseudocrabs of the family Aeglidae are the only Anomura restricted to fresh waters, with all their species grouped in a unique living genus, *Aegla*. They are distributed in continental waters of Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay and Uruguay. They generally inhabit surface environments but some species are found in groundwater. Generally, areas inhabited by species of *Aegla* are relatively small and restricted to one drainage basin or a few adjacent basins, showing high levels of endemism. Moreover, some species have specific habitat requirements. However, some taxa have wider distributional ranges and their different populations can form non-monophyletic groups. Thus, this genus represents an excellent group for biogeographical, conservational and taxonomic studies. In this PhD Thesis, the occurrence of all the current species of pseudocrabs of the family Aeglidae was obtained from fieldwork, supplemented using the information from museum collections and by a thorough literature review. On the basis of this information, the distributional areas of all the current species of the pseudocrabs of the family Aeglidae were delineated and biogeographic patterns have been established. Moreover, phylogenetic analysis has been done; the states of conservation of the Argentinean species and the taxonomic level of some populations cited here for the first time have been evaluated. The

information obtained provides a framework for future work on biogeography and conservation of Aegla and contribute to expand the cognition of the biogeographical history of the southern South American freshwater systems. Studies like this are central to many fundamental questions in macroecology and conservation biology.