

Resúmenes Tesis

Caracterización de la expresión de receptores hormonales y del balance proliferación/apoptosis en las diferentes estructuras ováricas en la enfermedad quística ovárica bovina

Dr. Salvetti, Natalia Raquel

Director: Dr. Hugo Héctor Ortega

Codirector: Dr. Eduardo Juan Gimeno

Lugar de realización: Facultad de Ciencias Veterinarias. UNL

Fecha de la defensa: 03 de marzo de 2010

Resumen

La enfermedad quística ovárica (cystic ovarian disease: COD) es uno de los trastornos reproductivos más comunes en vacas lecheras y afecta entre el 6 y el 19% de las hembras en producción. El impacto económico de esta enfermedad está en directa relación con el intervalo parto concepción y los costos asociados. El objetivo de la presente tesis fue validar un modelo experimental de COD en bovinos e identificar las posibles alteraciones presentes en los ovarios de estos animales relacionadas con el balance apoptosis/proliferación celular y la expresión de receptores hormonales esteroides. Se utilizaron bovinos de la raza Holando Argentino puros por cruza a los cuales se les realizó sincronización del ciclo estral y luego se los trató con ACTH sintética cada 12 horas durante 7 días. Se realizó el seguimiento de los animales mediante ultrasonografía y tacto rectal hasta encontrar estructuras ováricas compatibles con quistes foliculares. Se recolectó sangre para la determinación de los valores de hormo-

nas esteroideas y gonadotroficas. Posteriormente se realizó la extracción de los ovarios mediante ovariectomía. Las muestras obtenidas fueron procesadas de acuerdo a las distintas técnicas para estudiar el balance proliferación/apoptosis mediante inmunohistoquímica (expresión de ki-67, caspasa-3, bcl-2 y bax) y RT-PCR (ciclinas D1 y E; Bax y Bcl-2); y por medio de inmunohistoquímica e inmunoblot para estudiar la expresión proteica de los receptores de estrógenos (α y β) y de progesterona. Además se recolectaron muestras de ovarios compatibles con COD en playa de faena de los frigoríficos de la zona para poder realizar la comparación entre lo que ocurre de manera espontánea y el modelo experimental elegido. Mediante la ultrasonografía, tacto rectal y análisis de las hormonas en suero pudo determinarse que la inducción de los quistes fue exitosa. Los folículos quísticos, tanto inducidos como espontáneos presentaron niveles de proliferación y de apoptosis disminuidos con respecto a los folículos sanos de diferentes categorías para las tres capas foliculares. Además, se hallaron diferencias en la expresión proteica de receptores de estrógenos y de progesterona. Los receptores de estrógenos presentaron una relación alterada entre subtipos con respecto a los ovarios de los animales normales, siendo mayor la expresión

de RE α en los folículos terciarios de ambos grupos y quistes inducidos. Todas las categorías foliculares de los ovarios de animales con COD inducida presentaron niveles inferiores de RE β en relación a la misma categoría de los animales control excepto los quistes foliculares, los cuales presentaron niveles similares a los de los folículos terciarios. Sin embargo los niveles de este subtipo de receptor se mantuvieron similares a los de los folículos terciarios de los animales control. Se observaron diferencias en la expresión de las isoformas del RP, así como en su cuantificación total por inmunohistoquímica. Los quistes mostraron menores niveles de expresión de RP total. El RP-A2 se encontró aumentado en los folículos controles y se observó una tendencia a disminuir del RP-B en los quistes espontáneos. Existieron diferencias en cuanto a lo encontrado en animales provenientes de frigorífico. En estos se observó un aumento significativo de los niveles de RE α y una disminución de RE β en los quistes en relación a las otras categorías estudiadas.

Los resultados obtenidos en esta tesis y su discusión con los aportes de otros autores, nos permiten llegar a las siguientes conclusiones: 1- El balance proliferación/apoptosis se vio alterado en los ovarios de los animales afectados por la enfermedad, encontrándose baja proliferación en las capas celulares de los folículos terciarios y quísticos de esos animales; con un concomitante bajo índice de apoptosis. Esto indicaría que si bien estos folículos no siguen creciendo, tampoco están destinados a la atresia, por lo menos de manera temprana; 2- La expresión de RE mostró diferencias entre los folículos en crecimiento normales de los ovarios control con respecto a los mismos en los ovarios de animales con

COD. Esto indica cambios en la relación RE α /RE β en los ovarios de los animales con la enfermedad, y considerando que ambos receptores tienen distinta afinidad por el 17- β -estradiol, mediando diferentes respuestas, esta podría ser una de las causas de las alteraciones celulares observadas en los ovarios de los animales con la enfermedad; 3- Se evidencia un cambio en la relación de las isoformas del RP expresadas en los animales tratados, probablemente asociado con las alteraciones en la proliferación y diferenciación celular; 4- Las diferencias entre lo observado en los folículos quísticos obtenidos del modelo experimental y los provenientes de frigorífico tal vez se deban a la alta heterogeneidad en estas últimas y a la falta de datos sobre el estado reproductivo del animal, tratamientos previos, gestaciones, edad de los animales, etc. Estos hallazgos resaltan la importancia de trabajar con modelos experimentales en donde pueden controlarse algunas cuestiones tales como la edad de los animales, estado reproductivo y el tiempo de persistencia de los folículos, entre otras cosas.

Summary

Characterization of the expression of hormone receptors and the balance proliferation / apoptosis in different ovarian structures in bovine cystic ovarian disease

The objective of this thesis was to validate an experimental model of cystic ovarian disease (COD) in cattle and identify possible alterations in the ovaries of these animals related to the balance apoptosis / cell proliferation and steroid hormone receptor expression. We performed the induction of COD in cattle by administration of ACTH. Later the removal of the ovaries by ovariectomy. The samples were pro-

cessed according to different techniques to study the balance proliferation / apoptosis and expression of estrogen receptors (alpha and beta) and progesterone. Cystic follicles showed decreased levels of proliferation and apoptosis compared to healthy follicles of different categories. In addition, there were differences in the expression of estrogen and progesterone receptors. All follicular categories of ovaries from animals with induced COD showed lower levels

of REbeta compared to the same follicular category of control animals. There were differences in the expression of PR isoforms. These findings highlight the importance of working with experimental models where we can control some variables such as age of animals, reproductive status and length of persistence of the follicles. Moreover the results of this study provide data that can be used for the evaluation of new therapeutic measures for this disease.

Mecanismos que analizan a nivel hepático el destino de los ácidos grasos del plasma y su relación con la resistencia insulínica en dislipemia experimental. Estrategias de prevención y/o mejoramiento por dietas

Dr. Hein, Gustavo Juan

Directora: Yolanda Ana Rosa Bolzón
de Lombardo

Codirectora: Adriana Graciela Chicco

Lugar de realización: Laboratorio de Estudio de Enfermedades Metabólicas Relacionadas con la Nutrición. Cát. de Química Biológica. Dpto. Ciencias Biológicas. Fac. Bioquímica y Cs. Biológicas. UNL.

Fecha de la defensa: 4 de marzo de 2010

Resumen

Numerosos estudios epidemiológicos y experimentales sugieren que cambios en la composición de los macronutrientes de las dietas son un factor importante en la prevención o mejoramiento de numerosos desórdenes metabólicos incluidos en el llamado "Síndrome Plurimetabólico" o "Síndrome X", tales como: diabetes tipo 2, resistencia insulínica, dislipidemia, hipertensión y obesidad; todos ellos de alta prevalencia en nuestra población y a nivel mun-

dial. Al respecto un importante número de estudios a nivel experimental y humanos, incluidos de nuestro grupo, indican que los ácidos grasos polinosaturados (PUFAs) de origen marino: eicosapentaenoico 20:5 n-3 (EPA) y docosahexaenoico 22:6 n-3 (DHA) se encuentran involucrados en numerosos procesos biológicos, jugando un rol beneficioso contra los efectos adversos de este síndrome.

A nivel experimental existen numerosos modelos animales genéticos, farmacológicos y nutricionales de dislipidemia, diabetes tipo 2, resistencia insulínica y adiposidad visceral, que se utilizan para analizar las dismetabolías involucradas en este síndrome.

Entre los modelos nutricionales, en la presente tesis utilizamos el modelo experimental nutricional de dislipidemia, resistencia insulínica, anormal homeostasis de la glucosa y adiposidad visceral inducido por ingesta crónica (8 meses) de una dieta rica en sacarosa (DRS) y hemos analizado a

nivel hepático: I) Mecanismos relacionados con la lipogénesis y la oxidación de ácidos grasos. Expresión de la masa proteica de los receptores nucleares PPAR- α y LXR- α ; composición lipídica microsomal; II) Regulación del metabolismo de la glucosa: vías oxidativa y no oxidativa y vías de la cascada de señalización de la insulina; III) Efecto de la sustitución de la fuente grasa dietaria (aceite de maíz (AM) –rico en n-6, por aceite de hígado de bacalao (AHB) –rico en n-3), sobre los mecanismos que conducen a la reversión y/o mejoramiento de la dislipemia y el metabolismo de la glucosa a nivel enzimático y molecular.

Mediante la sustitución del AM por AHB, demostramos: 1) normalización en la actividad de enzimas lipogénicas y disminución de la masa proteica del LXR- α conjuntamente con una mayor oxidación de ácidos grasos (incremento de actividad FAO y CPT 1) y un incremento en la expresión de la masa proteica del PPAR- α . Esto indica una menor síntesis de novo de ácidos grasos y un incremento de las vías oxidativas que sumado a una menor disponibilidad hepática de ácidos grasos plasmáticos contribuirían a la reversión de la esteatosis hepática y dislipidemia; 2) la actividad y expresión de las desaturasas: SCD-1, $\Delta 6$ y $\Delta 5$ retornaron a los niveles del grupo control; 3) la normalización en el metabolismo lipídico condujo a una disminución de la secreción de VLDL-Tg y remoción plasmática de triglicéridos normalizando la dislipidemia; 4) la administración de AHB incrementó los n-3 y disminuyó los n-6 PUFAs en los lípidos hepáticos, sin alterar la relación 18:1 / 18:0; 5) las especies moleculares de los lípidos microsomales, mostraron un desplazamiento de n-6 por n-3 PUFAs a través de un mecanismo de competición directa. Estos

cambios pueden afectar la fluidez y estructura de las membranas celulares y favorecer la acción insulínica; 6) se revirtió la anormal homeostasis de la glucosa sin modificación de los niveles de insulina plasmática.

En lo que se refiere al análisis de las secuencias metabólicas de la glucosa e intermediarios claves, involucrados en la cascada de señales de la acción insulínica, demostramos: 7) normalización del contenido de glucógeno hepático y las actividades enzimáticas PEPCK, G-6-P-Pasa y la forma activa (PDHa) del complejo PDH; 8) el AHB fue capaz de mejorar las actividades GS y PK; 9) no se observaron modificaciones en la actividad GK y en la masa proteica del IRS-1 y de la subunidad $\alpha p85$ PI3K, cuyos valores permanecieron similares al lote DRS. Sin embargo, la reversión de la resistencia insulínica periférica global y el mejoramiento de la sensibilidad insulínica a nivel hepático, junto a la normalización de la secreción de insulina in vitro en estudios con islotes perifundidos aislados (previamente demostrado por nuestro grupo), conducirían al restablecimiento de la glucemia dentro de los niveles normales en los animales alimentados con AHB.

Estos resultados demuestran que el alto contenido de ácidos grasos polinsaturados n-3 y la baja relación n-6/n-3 PUFAs dietaria, promete ser un tratamiento natural para la reversión del síndrome dislipidémico y sus efectos fisiopatológicos presentes en la diabetes tipo 2.

Summary

Mechanisms that analyze at hepatic level the destiny of plasmatic free fatty acid with the insulin resistance in dyslipemic rats. Study of strategies for its prevention or improvement through dietary manipulation

The results show that chronic administration of a sucrose rich diet (SRD) induced in liver: increased protein mass of the nuclear receptor LXR alpha and decreased mass of PPAR alpha. This related to the activation of lipogenic enzymes and decreased activity of fatty acid oxidation enzymes, indicating a preferential destiny of them towards reesterification pathway and hepatic triglyceride synthesis. Furthermore, the dyslipidemic animals exhibited impaired insulin action in liver tissue associated with lower IRS 1 and alpha subunit p85 mass protein. This would explain the moderate hyperglycemia present in these animals.

The cod liver oil (CLO) produced: increased activity of fatty acid oxidation enzymes

and lipogenic enzyme normalization with increased PPAR alpha protein mass and decreased LXR alpha mass. This indicates: lower "de novo" fatty acids synthesis and increased oxidative pathways with reduced availability of plasma fatty acids to the liver, contribute to the reversal of hepatic steatosis and dyslipidemia. Furthermore, reduced expression of IRS 1 and alpha subunit p85 protein mass observed in animals with SRD failed to revert completely with CLO. The reversal of the global peripheral insulin resistance and improving insulin sensitivity in the liver, with normalization of insulin secretion in vitro in perfused isolated islets, would lead to restoration of glycemia within normal levels with CLO.

Estudio de genes involucrados en la biogénesis de complejos respiratorios en plantas

Dr. Attallah, Carolina Verónica

Director: Dr. Daniel González

Lugar de realización: Cátedra de Biología Celular y Molecular – FBCB

Fecha de la defensa: 12 de marzo de 2010

Resumen

En esta tesis, estudiamos genes de *Arabidopsis thaliana* que codifican proteínas que presentan homología con las proteínas Cox17p, Cox19p, Cox11p y Sco1p de levaduras, las que han sido involucradas en el transporte e inserción de cobre durante la biogénesis de la citocromo c oxidasa (COX), enzima terminal de la cadena respiratoria mitocondrial. Las respectivas proteínas de plantas parecen tener funciones más complejas, además de su participación en la biogénesis de COX, las cuales pueden

haberse desarrollado durante la evolución de las especies vegetales.

En el Capítulo I describimos dos diferentes genes de *Arabidopsis* que codifican homólogos funcionales de la proteína Cox17p de levaduras. Estudiamos las regiones promotoras de ambos genes *AtCOX17*, las cuales incluyen un intrón en la región 5' no codificante. En el caso de ambos genes, *AtCOX17-1* y *AtCOX17-2*, la expresión se localiza principalmente en raíces jóvenes, anteras y vainas, pero las plantas transformadas con la región promotora de *AtCOX17-1* presentan mayores niveles de actividad GUS. Ambos promotores se inducen por condiciones de estrés biótico y abiótico, y la presencia de metales. Nuestros resultados indican que ambos genes *AtCOX17* poseen similares, pero no idénticas, características de expresión.

En el Capítulo II describimos dos genes casi idénticos que codifican proteínas que presentan una alta homología de secuencia con la proteína de unión a metales Cox19p de levaduras. Ambas isoformas de *AtCOX19* son importadas a mitocondrias en experimentos *in vitro* y se encuentran unidas a la membrana interna, de cara al espacio intermembrana. Sólo la isoforma más corta tiene la capacidad de restaurar la deficiencia respiratoria que presentan las levaduras mutantes en *cox19*. Estos resultados sugieren que los genes *AtCOX19* codifican homólogos funcionales de la proteína de levaduras Cox19p. Las plantas transformadas con la región promotora de *AtCOX19-1* presentan una alta actividad GUS en raíces jóvenes y anteras. En hojas, sólo se observa expresión al provocarles estrés biótico y abiótico, y en presencia de metales. Para el gen *AtCOX19-1*, así como para los genes *AtCOX17*, determinamos que el intrón cercano a la región 5' no codificante influencia positivamente la expresión. Además para los genes *AtCOX19* y *AtCOX17*, los motivos site II, presentes en la región proximal de cada promotor, son esenciales para la expresión, mientras que los elementos involucrados en la inducción por factores de estrés se hallan ubicados en porciones más distales de los respectivos promotores.

En el Capítulo III estudiamos un gen de *Arabidopsis* que codifica una proteína que presenta homología de secuencia con la proteína Cox11p de levaduras. *AtCOX11* se importa a mitocondrias *in vitro* y se localiza en la membrana interna, expuesta al espacio intermembrana. El gen correspondiente se expresa principalmente en raíces jóvenes, anteras y vainas y no es inducido ante situaciones de estrés.

En el último capítulo, caracterizamos dos genes de *Arabidopsis* (*AtSCO1* y *AtSCO2*)

que codifican proteínas que presentan homología de secuencia con las proteínas Sco involucradas en la biogénesis de COX en otros organismos. Las plantas heterocigotas para una inserción de T-DNA en el segundo exón de *AtSCO1* producen un 25 % de semillas anormales, las cuales contienen embriones defectuosos arrestados en la fase corazón o torpedo de la embriogénesis. En la progenie de dichas plantas heterocigotas no encontramos plantas mutantes homocigotas, lo cual sugiere que la función de *AtSCO1* es esencial durante las primeras etapas del desarrollo de las plantas. Los embriones presentes en las semillas anormales no presentan actividad COX, lo que indica que *AtSCO1* sería la encargada del ensamblado de esta enzima. Consistentemente con ello, al analizar la región promotora de *AtSCO1* determinamos que este gen se expresa en regiones meristemáticas, anteras y embriones en distintas etapas del desarrollo. Al complementar las plantas heterocigotas con una construcción que expresa el ADNC de *AtSCO1*, logramos obtener plantas mutantes homocigotas. Las plantas que sobreexpresan *AtSCO1* presentan una respuesta alterada frente a diferentes concentraciones de cobre, ya que se ve afectada la elongación de las raíces, presentan una proporción diferente de las isoformas de SOD y la actividad del promotor del miR398 se ve incrementada.

Las plantas que no expresan *AtSCO2* se desarrollan normalmente, pero muestran un retraso en el crecimiento en la fase reproductiva y alteraciones relacionadas con el metabolismo redox. A través del análisis de su región promotora, determinamos que *AtSCO2* se expresa sólo en raíces jóvenes y anteras inmaduras. Nuestros resultados sugieren que *AtSCO1* es la proteína involucrada en la biogénesis de COX y que ade-

más participa de la homeostasis de cobre en las células vegetales. AtSCO2, que no posee los residuos de cisteína y la histidina que han sido involucrados en la unión al cobre, podría participar del metabolismo redox mitocondrial.

Summary

Study of genes involved in the biogenesis of respiratory complexes in plants

In this thesis, we studied *Arabidopsis thaliana* genes that encode proteins showing similarity with yeast Cox17p, Cox19p, Cox11p and Sco1p, involved in the transport and insertion of copper ions during cytochrome c oxidase (COX) biogenesis, the terminal component of the mitochondrial respiratory chain. The respective plant proteins seem to have more complex functions, besides their role in COX assembly, which may have arisen during the evolution of plants.

In the first chapter we have studied two different *Arabidopsis* genes encoding functional homologues of yeast Cox17p. Sequences upstream from the translation start site of *AtCOX17* genes, which include an intron located in the 5' leader region, were introduced into plants in front of the *gus* gene. For both genes, *AtCOX17-1* and *AtCOX17-2*, expression is localized preferentially in young roots, anthers and siliques, but almost 10-fold higher GUS activity levels are observed in plants transformed with *AtCOX17-1* upstream regions. Both promoters are induced by metals and different biotic and abiotic stress factors. Our results indicate that both *AtCOX17* genes have similar, though not identical, expression characteristics.

In the second chapter, we have studied two nearly identical genes that encode proteins showing similarity with the yeast metal

chaperone Cox19p. Both *AtCOX19* isoforms are imported into mitochondria *in vitro* and are found attached to the inner membrane facing the intermembrane space. The smaller *AtCOX19-1* isoform, but not the larger one with an extra N-terminus, is able to restore growth on non-fermentable carbon sources when expressed in a yeast *cox19* null mutant. These results suggest that *AtCOX19* genes encode functional homologues of the yeast metal chaperone Cox19p. Young roots and anthers are highly stained in *AtCOX19-1::GUS* plants. Expression in leaves is only observed when they are in presence of metals and biotic and abiotic stress factors. As in the case of *AtCOX17* genes, we have demonstrated that the intron located near the 5' leader region of *AtCOX19-1* positively influences the expression of this gene. *AtCOX19* and *AtCOX17* genes also share site II motifs present in the proximal promoter region and they are essential for expression, while the elements involved in responses to stress are located in more distal portions of the respective promoters.

In the third chapter we have studied an *Arabidopsis* gene that encodes a protein showing similarity with the yeast metal chaperone Cox11p. *AtCOX11* is imported into mitochondria *in vitro* and is found in the inner membrane, facing the intermembrane space. *AtCOX11* expression is localized preferentially in young roots, anthers and siliques and is not induced by stress treatments.

In the last chapter we have studied two *Arabidopsis* genes (*AtSCO1* and *AtSCO2*) that encode proteins with homology to the Sco proteins involved in COX biogenesis in other organisms. Heterozygote plants with a T-DNA insertion in the second exon of *AtSCO1* produce 25 % abnormal seeds with defective embryos arrested at the heart or torpedo stage and no homozygote mutant

plants can be detected in the progeny, indicating that *AtSCO1* function is essential during early stages of plant development. Embryos from abnormal seeds lack COX activity, suggesting that *AtSCO1* participates in COX assembly. Expression of a reporter gene directed by the *AtSCO1* promoter is observed in meristematic tissues, anthers and embryos at different developmental stages. Homozygote mutant plants were obtained by inserting a construct that expresses the *AtSCO1* cDNA. Plants that overexpress *AtSCO1* have altered responses to copper, among them a different rate of root elongation, altered ratios of superoxide

dismutase isoenzymes and increased activity of the miR398 promoter.

Plants that lack *AtSCO2* expression develop normally but show retarded growth during the reproductive phase and alterations related with redox metabolism. Expression of the reporter gene directed by the *AtSCO2* promoter is localized in young roots and immature anthers. The results suggest that *AtSCO1* is the protein involved in COX biogenesis and that it also has a role in maintaining copper homeostasis in plant cells. *AtSCO2*, that lacks the cysteines and histidine putatively involved in copper binding, may participate in mitochondrial redox metabolism.

Desarrollo de nuevos compuestos Gemini con actividad antihelmíntica para aplicaciones veterinarias

Dr. Sánchez, Victoria Guadalupe

Directora: Dra. María Inés Cabrera

Codirector: Dr. Marcelo César Murguía

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

Resumen

En el presente trabajo, se presenta el diseño sintético para la preparación de nuevas moléculas anfipáticas de la familia gemini con potencial actividad antihelmíntica sobre nematodos gastrointestinales que afectan la sanidad de los animales de producción. Nuestro objetivo es contribuir en el desarrollo de nuevos productos, aportando una solución en materia de manejo de la resistencia antihelmíntica (rotación de principios activos) que representa una nueva problemática a resolver en favor de la producción pecuaria argentina.

El esquema de síntesis de las nuevas moléculas diméricas involucra no menos de tres etapas de síntesis, tal como se muestra en la Figura 1.

De la familia de compuesto sintetizados, sólo los compuestos gemini catiónicos *5a–f* pudieron ser ensayados en cuanto a sus propiedades activas de superficie y actividad biológica *in vitro* frente a *Heligmosomoides polygyrus bakeri*, dado que son los únicos solubles en agua.

Los valores obtenidos de CMC, C_{20} , γ_{CMC} , ρC_{20} , CMC/C_{20} , Γ y A , indican que los compuestos evaluados son buenos surfactantes, entre los que se destacan los gemini *5d* y *5f* que muestran valores de pC_{20} de 4,68 y 5,18 y valores de CMC de $5 \times 10^{-5} M$ y $1 \times 10^{-4} M$ respectivamente.

Para la evaluación biológica de las nuevas drogas potencialmente activas contra helmintos se desarrollo un método estan-

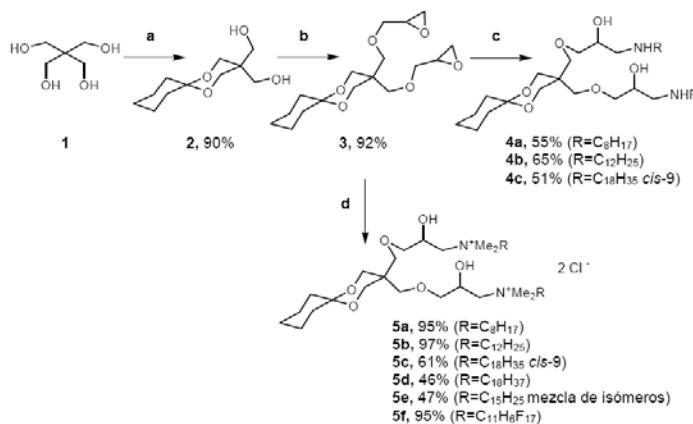


Figura 1. Vías de síntesis de los compuestos diméricos neutros y catiónicos. (a) Pentaeritritol (1), ciclohexanona, ácido *p*-toluensulfónico monohidrato, benceno/DMF (40:60), 115 °C, 48 h; (b) Diol (2), (±)-epiclorhidrina, NaOH, TBAB, 30 °C, 1,5 h; (c) Eter diglicidilico (3), alquilamina primaria, TBABr, etanol, 30 °C, 20 h; (d) 3, *N,N*-dimetilamina, TBABr, etanol, 30 °C, 20 h.

darizado de movilidad *in Vitro* utilizando un nematode gastrointestinal de ratón utilizado comúnmente como modelo experimental denominado *Heligmosomoides polygyrus bakeri*. Los resultados obtenidos con esta prueba mostraron ser confiables y reproducibles. De la serie de compuestos catiónicos ensayado, tres de ellos (5b, 5c y 5e) mostraron tener excelente actividad antihelmíntica *in vitro* a diferentes concentraciones. El compuesto gemini 5b es el que presenta el mejor desempeño como agente antihelmíntico, optimizándose su utilización a una concentración mínima de 50 ppm y 60 minutos de incubación. Las observaciones por microscopía electrónica de barrido sugieren que el mecanismo de acción de éstos compuesto no estaría dado a nivel de la cutícula del parásito, ya que no se observó daño en la superficie externa de la misma. Aparentemente, el compuesto ingresaría al interior del parásito por un mecanismo no determinado causando allí su efecto.

Finalmente, el compuesto denominado 5b es el que presenta las mayores ventajas a nivel tecnológico, ya que es un producto

económico, de fácil obtención (síntesis en pocos pasos) y con un elevado rendimiento (97%). Desde el punto de vista biológico, es el gemini con mayor potencial de la serie como agente antibacteriano, antifúngico y antihelmíntico *in vitro*.

Summary

Development of New Gemini Compounds with Anthelmintic Activity for Veterinary Applications

In this thesis work it is presented the synthetic design for the preparation of new amphipathic molecules called gemini with potential anthelmintic activity on gastrointestinal nematodes that affect the health of production animals. The purpose of the thesis is to contribute to the development of new products in order to solve the anthelmintic resistance, which is a new problem for livestock production in Argentina.

The scheme of synthesis of new dimeric molecules involves, at least, three stages of synthesis. Thus, by carefully choosing the starting materials it was possible to strategically direct the synthesis of surfactant with

two hydrophilic groups and two hydrophobic chains. The study of these compounds is an important area of research due to their excellent properties in aqueous solution.

Several techniques were analyzed, explored and studied. These techniques were proposed in the literature for the study of the biological activity of synthesized pure products against gastrointestinal nematodes of veterinary interest.

Finally, the more active gemini surfactants were selected from the results of biological activity *in vitro* against gastrointestinal nematodes. It is suggested that those selected surfactants should continue under toxicological studies, *in vivo* tests and biochemical-molecular studies to recommend the gemini with the better performance to be used in the treatment of ruminants.

Estrógenos ambientales y fertilidad: Efecto de xenoestrógenos sobre el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal

Dr. Monje, Lucas

Director: Dr. Jorge Guillermo Ramos

Codirectora: Dra. Jorgelina Varayoud

Lugar de realización: Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral.

Fecha de la defensa: 17 de marzo de 2010

Resumen

El sistema límbico está conformado por varias estructuras cerebrales interconectadas ubicadas alrededor del tálamo y debajo de la corteza cerebral. Entre las estructuras más importantes que conforman el sistema límbico se destacan el hipotálamo y el hipocampo. En los mamíferos este conjunto de estructuras es el encargado de gestionar respuestas fisiológicas adecuadas ante estímulos medioambientales específicos y de integrar la información ambiental a través del aprendizaje. El principio central de la diferenciación sexual del cerebro en numerosos mamíferos es que el mismo es "bipotencial" y se desarrolla de forma diferente en machos y hembras bajo la influencia de

hormonas esteroides sexuales durante el período perinatal. Los estrógenos llevan a cabo sus funciones biológicas a través de los receptores de estrógeno α y β (ER α y ER β), los cuales tienen alta expresión en estructuras límbicas e importantes diferencias en su acción biológica. El descubrimiento de sustancias químicas con actividad agonista/antagonista de hormonas endógenas presentes en el medioambiente (xenoestrógenos) ha despertado el interés en conocer su relación con patologías reproductivas y del desarrollo. El bisfenol A (BPA) constituye un notable ejemplo de perturbador endocrino debido a su masiva utilización en la manufactura de plásticos y su amplia distribución. Por otro lado, el dietilstilbestrol (DES) es un estrógeno sintético que fue ampliamente utilizado en mujeres embarazadas para evitar complicaciones en el embarazo. Estudios recientes han reportado una exposición significativa de fetos humanos a BPA debido a su presencia en sangre materna, tejido placentario y sangre del cordón umbilical. Recientemente el Programa Nacional de Toxicología de EE. UU. reportó que "existe cierta preocupación por

los efectos sobre el cerebro, la conducta y la próstata de fetos, infantes y niños a los niveles actuales de BPA a los que estamos expuestos los humanos”.

Por lo anteriormente expuesto, el objetivo general de este trabajo fue evaluar la influencia de la exposición neonatal temprana a xenoestrógenos sobre el desarrollo del sistema límbico en ratas. Para esto nos propusimos estudiar los efectos de dicha exposición sobre estructuras hipotalámicas implicadas en la diferenciación sexual del cerebro y sobre la neurogénesis hipocampal.

Nuestros resultados demostraron que la exposición neonatal temprana a los xenoestrógenos BPA y DES provoca alteraciones sobre la neurofisiología hipotalámica e hipocampal, las cuales están presentes desde el período posnatal temprano y se manifiestan hasta la etapa adulta. Además, los efectos de la exposición a BPA sobre el eje hipotalámico observados a lo largo de la vida de los animales demostraron ser dosis-dependientes y algunos de ellos fueron exclusivamente observados en las hembras expuestas a la dosis más baja utilizada en este estudio (50 μg BPA/kg). En ratas hembra adultas expuestas a BPA durante el período posnatal temprano, observamos alteraciones tanto en la respuesta estrógeno-dependiente de la red neuronal encargada de regular los picos preovulatorios de gonadotropinas y el ciclo estral, como así también en la sensibilidad hormonal normal de la red neural que gobierna la conducta sexual. Nuestros resultados sugieren que los efectos dosis dependientes del BPA podrían estar mediados por una cascada de mecanismos moleculares que involucran la expresión de cofactores de transcripción y el uso diferencial de los promotores génicos del ER α . Observamos también que las dosis altas y bajas de BPA perturban diferencial-

mente la expresión de cofactores transcripcionales específicos de la respuesta estrogénica (SRC-1, REA) en núcleos hipotalámicos. Estos cambios dosis-específicos del repertorio de cofactores transcripcionales podrían ser los responsables de la activación/silenciamiento de distintos promotores génicos, determinando de esta manera la respuesta transcripcional de las neuronas y alterando en última instancia la neurofisiología del animal. Por otra parte, demostramos que el xenoestrógeno DES afecta la proliferación y supervivencia de las células progenitoras neuronales en el giro dentado del hipocampo.

A pesar de que la EPA de EE. UU. y la Comisión Europea establecieron una dosis de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ como “dosis segura” e “ingesta diaria tolerable”, respectivamente; los resultados presentados en esta tesis indicarían la necesidad de replantear la discusión acerca de qué dosis deben ser consideradas seguras. Estos resultados son inquietantes en lo que respecta a la salud pública, ya que en el transcurso de esta tesis confirmamos que la exposición a dosis bajas de compuestos ambientales hormonalmente activos durante las etapas tempranas del desarrollo afectan la diferenciación del cerebro y podrían afectar el desempeño reproductivo durante la etapa adulta. Esto es particularmente importante ya que muchos de los efectos provocados por los perturbadores endocrinos permanecen silentes durante largos períodos de tiempo, activándose frente a estímulos endocrinos como la pubertad, la madurez sexual, la gestación. Por último, es necesario generar conciencia acerca de las consecuencias adversas de la exposición a perturbadores endocrinos sobre la población actual y las generaciones venideras.

Summary

Environmental estrogens and fertility: Xenostrogens effect on the hypothalamic–pituitary–gonadal axis

The limbic system is conformed by several interconnected brain structures, being hypothalamus and hippocampus the most important. The central tenet of sexual differentiation is that brain is bipotential but develops differently in males and females under the influence of sex steroid hormones during perinatal period. Estrogens elicit their biological effects through estrogen receptors α and β (ER α and ER β), which are highly expressed in limbic structures.

The discovery of chemical compounds present in the environment with endogenous hormones agonistic/antagonistic activity (xenoestrogens) has awakened the interest to know their relationship with reproductive pathologies and development. Bisphenol A (BPA) its a remarkable example of xenoestrogen due to its wide employment in plastics manufacture. In addition, diethyl-

stilbestrol (DES) it's a synthetic estrogen that was prescribed to pregnant women to prevent miscarriage. Recent studies reported a significant BPA exposure of human fetuses, due to BPA presence in maternal blood, placental tissue and umbilical cord blood.

The general objective of this work was to evaluate the influence of early neonatal xenoestrogen exposure on the development of the limbic system in rats. We proposed to study the effects of neonatal xenoestrogens exposure on hypothalamic structures involved in brain sexual differentiation and on hippocampal neurogenesis.

We showed that early neonatal exposure to BPA and DES provokes alterations on hypothalamic and hippocampal neurophysiology, which are present from the early postnatal period up to adulthood. Our results suggest that BPA dose-dependent effects could be mediated by molecular mechanisms involving expression of transcriptional cofactors and differential usage of ER α promoters.

Intercambio de carga entre nanoestructuras (átomos, moléculas, puntos cuánticos) y superficies sólidas, en situaciones en y fuera del equilibrio

Dr. Romero, Marcelo Ariel

Directora: Edith Catalina Goldberg
 Codirector: Pablo Guillermo Bolcatto
 Lugar de realización: Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral (FBCB–UNL)
 Fecha de la defensa: 19 de marzo de 2010

Resumen

En este trabajo presentamos una descripción del sistema compuesto por átomos interactuando con superficies, basada en el modelo de Anderson conjuntamente con el uso de operadores de proyección. El uso de estos operadores nos permite proyectar el Hamiltoniano sobre el sub-espacio de las configuraciones electrónicas más probables en el átomo. Su resolución se realiza a tra-

vés de funciones de Green–Keldysh calculadas usando el método de Ecuaciones de Movimiento. Un criterio de segundo orden estricto en el término de acoplamiento con la banda es usado para cerrar la cadena infinita de ecuaciones que se genera. Analizamos dos situaciones dependiendo de la magnitud de la repulsión electrónica en el átomo: (i) el límite de repulsión infinita que nos permite estudiar el efecto de la fluctuación de spin en procesos donde los más probables son dos estados de carga que difieren en un electrón (o un hueco); (ii) repulsión electrónica grande comparada con el acoplamiento con la banda, pero finita, de forma tal que en el caso de orbital tipo s en el átomo, habilita las configuraciones con cero, uno y dos electrones en el átomo.

Se calcularon magnitudes físicas de interés como la densidad de estados proyectada en el átomo y la ocupación en el caso de procesos estacionarios en equilibrio; la corriente y conductancia en fenómenos de transporte a través de átomos; y las fracciones de carga de átomos dispersados por superficies. Nuestros resultados se compararon con cálculos exactos, con otras aproximaciones existentes y también con resultados experimentales.

Summary

Charge exchange between nanostructures (atoms, molecules, quantum dots) and solid surfaces, in situations in and out of equilibrium

We present in this work a description of the atom–surface interacting system based on the Anderson model written in a projection operator language. In this form we project the Hamiltonian over the most probable electronic configurations of the atom. The Green–Keldysh functions appropriate for solving the interacting system are calculated by using the Equations of Motion method (EOM) with a criterion of a strict second order in the coupling term. Two different situations related with the magnitude of the electronic repulsion U are analyzed: (i) the infinite U limit that means spin fluctuation effects only; (ii) a great compared with the coupling term, but finite U , that makes possible zero, one and two electrons in the s -type orbital in the atom.

The physical magnitudes of interest are calculated: the projected density of states and the atom state occupation in the adsorption process (stationary in equilibrium); the current and conductance in the electronic transport through atoms (stationary out of equilibrium); and the charge fractions of atoms scattered by surfaces (dynamical processes). Our results are compared with exact calculations, other existing approximations, and also with experimental results.

Diversidad de anfibios (Amphibia: Anura) en cultivos de soja de la República Argentina: implicaciones en el control biológico de plagas

Dr. Attademo, Andrés Maximiliano

Director: Dr. Lajmanovich Rafael C.

Codirector: Dr. Sánchez–Hernández Juan Carlos.

Lugar de realización: Cátedra de Ecotoxicología, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral.

Fecha de la defensa: 25 de marzo de 2010

Resumen

El objetivo de la presente tesis doctoral fue evaluar la diversidad de anfibios anuros en cultivos de soja de la ecorregión del Espinal, el control biológico de artrópodos perjudiciales y el posible efecto de la aplicación de agroquímicos sobre estos vertebrados. Los estudios se realizaron durante los años 2005–2009 en las provincias de Santa Fe, Córdoba y Entre Ríos. La metodología de muestreo consistió en la utilización de trampas de caída y búsqueda activa. Se analizaron los contenidos gastrointestinales de las especies más abundantes, asimismo, se caracterizó y comparó la actividad enzimática de la butirilcolinesterasa (BChE) y carboxilesterasa (CbE) en plasma de ejemplares machos de *Rhinella schneideri*, *R. fernandezae*, *R. arenarum* y *Leptodactylus chaquensis* en áreas exentas de la aplicación de agroquímicos (sitios controles) y en los sistemas agrícolas. Se registraron un total de 16 especies correspondientes a las familias Bufonidae, Leiuperidae, Leptodactylidae, Cycloramphidae, Ceratophryidae y Microhylidae. Los resultados del análisis trófico demuestran que los anuros consumen artrópodos perjudiciales

(e.g.: *Nezara viridula*, *Anticarsia gemmatalis*, entre otros). En lo que respecta al análisis de las B–esterasas, solo se encontró inhibición en la actividad de la BChE para *R. schneideri*, *R. fernandezae* y *L. chaquensis* con respecto al sitio control. En conclusión, este estudio demostró que los cultivos de soja sustentan importantes poblaciones de anuros y estas especies actúan como controladores naturales de plagas. Además, los resultados obtenidos demuestran que los plaguicidas anticolinesterásicos utilizados en estos sistemas agrícolas, producen inhibición de las B–esterasas.

Summary

Amphibians diversity (Amphibia: Anura) in soybeans cultivations of Republica Argentina: biological control implications of harmful herbivores
The general aims of this doctoral thesis was evaluated anuran amphibian diversity in soybean fields in the Espinal ecoregion, anuran's biological control of harmful arthropods, and the possible effect of agrochemical application on these vertebrates via biochemical parameters. The studies were carried out between the years 2005–2009 in Santa Fe, Córdoba and Entre Ríos Provinces. Animals were captured with wet pitfall traps and active search. The gastrointestinal content of the most representative species was analyzed. Moreover, the enzymatic activity of plasma butyrylcholinesterase (BChE) and carboxylesterase (CbE) from males of *Rhinella schneideri*, *R. fernandezae*, *R.*

arenarum, and *Leptodactylus chaquensis* captured in areas free of agrochemical application (control sites) and agricultural systems under intensive pesticide use was determined and compared. A total of 16 species were recorded comprises Bufonidae, Leiuperidae, Leptodactylidae, Cycloramphidae, Ceratophryidae and Microhylidae Families. The analysis of B-esterases in the agrosystems revealed

inhibition of BChE activity for *R. schneideri*, *R. fernandezae*, and *L. chaquensis* compared with the control site. In summary, the present study demonstrated that soybean fields support important anuran populations and that they can therefore act as efficient natural control agents. Moreover, the results also showed that anticholinesterase pesticides used in agricultural systems produce inhibition of B-esterases.

Desarrollo de un inóculo de bacterias lácticas indígenas para mejorar el estado sanitario de los terneros lactantes criados artificialmente

Dr. Frizzo, Laureano Sebastián

Director: Marcelo Raúl Rosmini

Codirectora: Gabriela del Valle Perdígón

Lugar de realización: Departamento de Salud Pública, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral

Fecha de la defensa: 31 de marzo de 2010

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un inóculo de bacterias ácido lácticas indígenas con capacidad probiótica que sea capaz de mejorar el estado sanitario de los terneros criados en forma artificial y les brinde protección frente a las bacterias productoras de diarrea. Para ello se evaluó la capacidad de un inóculo de bacterias ácido lácticas integrado por 3 cepas bovinas: *Lactobacillus casei* DSPV 318T, *Lactobacillus salivarius* DSPV 315T y *Pediacoccus acidilactici* DSPV 006T para mejorar la performance de crecimiento durante la etapa de crianza artificial. Además, se evaluó el potencial del inóculo junto a suero de queso y lactosa para disminuir la inciden-

cia de diarreas, o paliar sus efectos adversos. También se estudió la capacidad del inóculo para brindar protección frente a *Salmonella dublin* DSPV 595T. El inóculo utilizado fue capaz de superar las barreras biológicas del tracto gastrointestinal, alojarse y permanecer en el intestino de los terneros sin translocar a los órganos del medio interno. La administración del inóculo no produjo efectos adversos sobre el estado de salud general de los animales. El inóculo estudiado favoreció el consumo precoz de alimento concentrado e, indirectamente, podría permitir un destete anticipado de los animales. Aunque el probiótico no interferiría en el mecanismo de ingreso del patógeno al medio interno, el porcentaje de lesiones presentes en los animales fue siempre menor en los grupos tratados. Todo esto demuestra que el inóculo puede ser incorporado en la dieta de los terneros como un inóculo probiótico multiespecie para mejorar condiciones productivas y sanitarias.

Summary

Development of an inoculum of indigenous lactic acid bacteria to improve the health status of calves artificially reared

The purpose of this study was to develop an inoculum of indigenous lactic acid bacteria with probiotic capacity that is capable of improving the health status of calves bred artificially and provide them with protection against pathogenic bacteria producing diarrhea. The ability of an inoculum composed by 3 LAB strains of bovine origin, *Lactobacillus casei* DSPV 318T, *Lactobacillus salivarius* DSPV 315T and *Pediococcus acidilactici* DSPV 006T, to improve growth performance during intensive rearing were assessed. In addition, the lactic acid bacteria inoculum with whey and lactose to reduce the incidence of diarrhea, or mitigate its adverse effects in animals at the stage of artificial rearing were evaluated. Moreover, the ability of the inoculum to provide protection against *Salmonella dublin* DSPV

595T were studied. The inoculum used was able to overcome the biological barriers of the gastrointestinal tract, stay and remain in the intestine of calves without translocate to internal organs. The administration of the inoculum did not produce adverse effects on general health status of the animals. The inoculum studied favored early starter intake and, indirectly, may stimulate the ruminant growth, allowing an early weaning of the animals. Although the probiotic inoculum does not interfere in the mechanism of pathogen entry to the internal environment, the percentage of lesions present throughout the full range of necropsies has always been lower in the treated groups. All this shows that the inoculum can be incorporated into the diet of calves as a multispecies probiotic inoculum to improve performance and sanitary conditions.

Elección de un método de conservación que asegure la viabilidad de bacterias indígenas probióticas y mejore la efectividad de administración a terneros lactantes criados a campo

Dra. Soto, Lorena Paola

Director: Dr. Marcelo Raúl Rosmini

Codirector: Dr. Osvaldo Luis Rosetti

Lugar de realización: Departamento de Salud Pública. Facultad de Ciencias Veterinarias.

UNL

Fecha de la defensa: 31 de marzo de 2010

Resumen

El objetivo de este trabajo fue determinar las mejores condiciones de conservación de un inóculo, conformado por bacterias ácido lácticas con capacidades probióticas, para que al ser administrado en el campo a terneros lactantes criados en condiciones artificiales les brinde protección frente a las bacterias patógenas productoras de diarrea.

En primer lugar se realizó un aislamiento de lactobacilos a partir de la mucosa de ciego y yeyuno de terneros y posteriormente la identificación por la metodología de ARDRA y secuenciación del gen 16S ARNr. Las cepas pertenecían a las especies *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Weissella paramesenteroides*, *L. salivarius*, *L. ruminis*, *L. curvatus*, *L. farciminis*, *L. mucosae* y *Enterococcus hirae*.

Las cepas fueron evaluadas en cuanto a sus propiedades probióticas realizando las pruebas de agregación, coagregación con patógenos, producción de sustancias inhibitorias, resistencia a las condiciones gástricas y a la bilis. *L. plantarum* DSPV 354T fue seleccionado por ser considerada la cepa con mas chances de llegar al sitio de acción para ejercer su efecto probiótico.

Por otro lado se evaluó la suplementación de leche con hidrolizados proteicos como medio de crecimiento de un inóculo probiótico compuesto por *L. casei* DSPV 318T, *P. acidilactici* DSPV 006T y *L. salivarius* DSPV 315T. Para ello se evaluó el grado de hidrólisis de diferentes fuentes proteicas: caseína, gluten y plasma por medio de la utilización de distintas proteasas (alcalasa, neutrasa y acidasa). Se obtuvieron 13 hidrolizados con diferentes grados de hidrólisis y cada uno tuvo un efecto diferente sobre la estimulación del crecimiento bacteriano. Se seleccionó un hidrolizado de caseína con un grado de hidrólisis del 54% para mejorar el desarrollo de la biomasa del inóculo en estudio.

Además se estudiaron diferentes metodologías de conservación. Por un lado se evaluó la viabilidad del inóculo en matriz láctea almacenados en condiciones de refrigeración y congelación. La conservación de este inóculo en la leche, fue posible durante

84 días en refrigeración y 360 días en congelación. Otra metodología de conservación evaluada fue la encapsulación cuyo objetivo fue desarrollar una metodología de producción de cápsulas grandes, del tamaño del balanceado suministrado a los terneros, con el fin de poder adicionar el probiótico en el alimento seco. Se evaluaron diferentes medios de propagación de la biomasa, distintas formulaciones para la conformación de la matriz de la cápsula, crecimiento de la biomasa dentro de la cápsula por incubación de la misma en un medio de cultivo y viabilidad de las células en perlas recubiertas con un policatión y no recubiertas, secas y húmedas y almacenadas en diferentes temperaturas. De estos estudios se obtuvo un protocolo de producción de macrocápsulas de un volumen de 2 ml compuestas de alginato de calcio y almidón y poseen un recubrimiento de quitosano. Estas perlas pueden ser conservadas secas a temperatura de refrigeración durante un periodo 2 meses.

Se realizaron 2 estudios *in vivo* en terneros para la evaluación de las propiedades probióticas de las bacterias lácticas conservadas en matriz láctea en congelación. En el primer estudio se estudió el efecto de la suplementación del inóculos probióticos (*L. casei* DSPV 318T, *P. acidilactici* DSPV 006T y *L. salivarius* DSPV 315T) y lactosa, frente a un desafío con *Salmonella dublin* DSPV 595T. En el segundo ensayo se evaluó el efecto sobre la performance de los terneros del inóculo anteriormente descrito y de la cepa *L. plantarum* DSPV 354T. La metodología de conservación por congelación en matriz láctea, resultó ser adecuada para administrar el inóculo en las condiciones de campo de ambos inóculos debido a que mantuvieron la viabilidad celular, lo

cual se evidenció en las altas cargas de los microorganismos probióticos encontrados en la materia fecal de los terneros.

En el primer ensayo, aunque el inóculo probiótico no fue capaz de disminuir la translocación del patógeno y el consecuente desarrollo de la enfermedad y muerte de los animales, el mismo ejerció un profundo efecto sobre la microbiota intestinal el cual tuvo consecuencias sobre la respuesta inmune específica de los animales. Estos resultados, hacen suponer la posibilidad de que la administración del inóculo probiótico sea efectiva como herramienta profiláctica en el control de los patógenos.

En el segundo ensayo se evaluó el efecto sobre la performance de los terneros del inóculo anteriormente descrito y de la cepa *L. plantarum* DSPV 354T. Se determinó que la alimentación de los animales con leche suplementada con ambos inóculos probióticos estimulaba el consumo tanto de alimento líquido como seco, lo cual facilitaría un rápido desarrollo ruminal y permitiría un destete anticipado de los animales. La cepa *L. plantarum* DSPV 354T demostró su efecto probiótico mejorando la performance de los terneros. Esta cepa podría ser adicionada al inóculo conformado por *L. casei* DSPV 318T, *L. salivarius* DSPV 315T y *P. acidilactici* DSPV 006T para potenciar los efectos probióticos en un inóculo multicepa.

Summary

Election of a conservation method that insure the viability of probiotic indigenous bacteria and improves the administration effectiveness to feeding milk calves at farm

The general aim of this study was to determine the best conditions of conservation of

an inoculum, consisting of indigenous lactic acid bacteria with probiotic capabilities, so that when administered in the field of nursing calves reared in artificial conditions to protect them against pathogenic bacteria producing diarrhea. First, we performed isolation of lactobacilli from calves and selected the strain *Lactobacillus plantarum* DSPV354T after evaluation of *in vitro* probiotic properties and identification by ARDRA and 16S RNA gen sequencing. We evaluated three conservation techniques for probiotic bacteria selected: refrigeration, freezing and encapsulation. From these studies was obtained a protocol for the production of macrocapsules formed with calcium alginate, starch and chitosan. Two studies were conducted in calves with bacteria preserved by freezing. In the first study we evaluated the effect of supplementation with *L. casei* DSPV318T, *P. acidilactici* DSPV006T and *L. salivarius* DSPV315T, against a challenge with *Salmonella dublin* DSPV595T. The inoculum exerted an effect on the intestinal microbiota, which had an impact on the specific immune response. In the second trial we evaluated the effect of *L. plantarum* DSPV354T on performance of calves. It was determined that feeding with milk supplemented with probiotics stimulated the demand for food both liquid and dry, which would facilitate rapid rumen development and allow early weaning of animals. This strain could be added to the inoculum comprising *L. casei* DSPV318T, *L. salivarius* DSPV315T and *P. acidilactici* DSPV006T to improve probiotic effects of the multicepa inoculums.

Propiedades moleculares, cinéticas y espectroscópicas de proteínas mononucleares de molibdeno: nitrato reductasas de *Sinorhizobium meliloti* 2011 y aldehído oxidorreductasa de *Desulfovibrio gigas*

Dr. Ferroni, Felix Martín

Director: Dr. Carlos Dante Brondino

Codirector: Dr. Alberto Claudio Rizzi

Lugar de realización: Departamento de Física-FBCB

Fecha de la defensa: 31 de marzo de 2010

Resumen

El molibdeno es un elemento químico de vital importancia en muchos sistemas biológicos y es necesario para la constitución de enzimas que catalizan diversas reacciones clave en los ciclos biogeoquímicos del carbono, azufre y nitrógeno. El metal por sí sólo es biológicamente inactivo a menos que esté complejoado por un cofactor especial. Con excepción de las nitrogenasas bacterianas donde el Mo forma parte del cofactor *FeMOCO* (*Fe-Mo cofactor*), el Mo se encuentra en las proteínas unido a un derivado pterina. El cofactor molibdopterina (MPT) es el sitio activo de todas las enzimas mononucleares de Mo. En esta tesis reportamos el estudio de dos tipos de enzimas mononucleares de Mo: nitrato reductasas derivadas de *Sinorhizobium meliloti* 2011 y aldehído oxidorreductasa de *Desulfovibrio gigas* (DgAOR).

Se caracterizó bioquímicamente una nitrato reductasa de membrana (NR_m) involucrada en el metabolismo respiratorio de nitratos, y una enzima con actividad dual nitrato-nitrito reductasa (NR-NiR). Se reportan las condiciones óptimas para el

crecimiento celular y la producción de las enzimas. El crecimiento en medios con molibdato y/o tungstato indica que el Mo es esencial para la actividad NR, lo que está en línea con los estudios cinéticos de las enzimas y sugiere que la inhibición ocurre por reemplazo del Mo por W. Las enzimas aisladas catalizan la reducción de nitratos siguiendo un mecanismo de Michaelis-Menten y son inhibidas por tungstato, azida, clorato y cianuro, mientras que el amonio no tiene efecto inhibitorio. La actividad NiR de NR-NiR muestra una cinética tipo Michaelis-Menten, es inhibida por dietilditiocarbamato y cianuro e insensible a amonio. Los estudios con inhibidores sobre las enzimas aisladas sugieren un perfil fisiológico de vías desasimilativas.

Se caracterizó la cinética de inhibición de la enzima DgAOR con los inhibidores cianuro, etilenglicol, glicerol y arsenito, junto con estudios cristalográficos y de resonancia paramagnética electrónica (RPE) de la enzima después de la reacción con los dos alcoholes. Al contrario de lo que se ha observado en otros miembros de la familia de la xantina oxidasa (XO), cianuro, etilenglicol y glicerol son inhibidores reversibles de DgAOR. Los datos cinéticos de muestras nativas obtenidas por disolución de cristales, como de aquellas tratadas con cianuro, confirman que DgAOR no necesita de un ligando azufre coordinado al átomo de Mo para la catálisis, lo que constituye una diferencia fundamental con la enzima

xantina oxidasa (XO), y confirma la ausencia del ligando en la esfera de coordinación del átomo de molibdeno en la enzima activa. Estudios cristalográficos de muestras inhibidas con los polialcoholes confirma la evidencia de una interacción directa Mo–C, lo que constituye la primera evidencia experimental para tal tipo de enlace en sistemas biológicos. Se discute la implicancia de este resultado en el mecanismo catalítico de *DgAOR*.

Summary

Molecular, Kinetic and spectroscopic properties of molybdenum–mononuclear proteins: nitrate reductases from Sinorhizobium meliloti 2011 and aldehyde oxidoreductase from Desulfovibrio gigas

Molybdenum is of essential importance in many biological systems as it is required by enzymes catalyzing diverse key reactions in the global carbon, sulfur and nitrogen metabolism. The metal itself is biologically inactive unless it is complexed by a special cofactor. With the exception of bacterial nitrogenase, where Mo is a constituent of the FeMo–cofactor, Mo is bound to a pterin

molecule forming the molybdenum cofactor (MOCO) which is the active compound at the catalytic site of all other Mo– mononuclear enzymes. In this work we report the study of two kinds of mononuclear Mo enzymes: nitrate reductases from *Sinorhizobium meliloti* 2011 and aldehyde oxidoreductase from *Desulfovibrio gigas* (*DgAOR*). We characterized biochemically the respiratory membrane–bound nitrate reductase (NRm) and the cytoplasmic nitrate–nitrite reductase (NR–NiR) from *S. meliloti* 2011. We also performed steady–state kinetic studies of *DgAOR* with the inhibitors cyanide, ethylene glycol, glycerol, and arsenite, together with crystallographic and EPR studies of the enzyme after reaction with the two alcohols. In contrast to what has been observed in other members of the XO family, cyanide, ethylene glycol, and glycerol are reversible inhibitors of *DgAOR*. Kinetic data with both cyanide and samples prepared from single crystals confirm that *DgAOR* does not need a sulphur ligand for catalysis and confirm the absence of this ligand in the coordination sphere of the molybdenum atom in the active enzyme.

Condiciones hidráulicas e invertebrados bentónicos en cauces fluviales con fondo arenoso. Influencia de la hidrodinámica y morfología de dunas y meandros

Dr. Blettler, Martín César María

Director: Ing. Mario Luis Amsler (FICH – INALI)
Codirectora: Prof. Inés Delia Ezcurra de Drago (INALI).

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

Fecha de la defensa: 09 de abril de 2010

Resumen

La presente tesis se enmarca dentro de la subdisciplina ecohidráulica, la cual a su vez se desprende de la disciplina científica eco–hidrología, siendo considerada la primera como el vínculo interdisciplinario entre la ciencia hidráulica, geomorfológica y ecológica. Estudios eco–hidráulicos (de cual-

quier índole) en grandes ríos han sido escasamente desarrollados. Uno de los motivos de esto podría ser las dificultades metodológicas propias de realizar mediciones hidráulicas sobre este tipo de ambientes. En este sentido, fue necesario aquí diseñar nuevas metodologías de posicionamiento sobre los distintos sectores morfológicos de dunas y meandros basada en la combinación de tecnologías acústicas y satelitales. Las dunas y los meandros son estructuras morfo–dinámicas comúnmente presentes en cauces aluviales que influyen significativamente sobre la estructura del flujo y, en consecuencia, ejercen un fuerte control sobre el transporte y deposición de sedimentos. En general estas estructuras ha sido objeto de numerosas investigaciones llevadas a cabo por medio de experimentos en laboratorio, simulaciones numéricas basadas en diversos enfoques teóricos, o mediciones en pequeñas corrientes. Sin embargo, en grandes ríos no se ha logrado aun una clara comprensión de las interacciones entre éstas y su entorno hidráulico. Respecto al conocimiento de la incidencia de factores morfo–hidrodinámicos sobre la distribución de la fauna de macro–invertebrados bentónicos, éste es completamente inexistente en grandes ríos y escasamente desarrollado en corrientes pequeñas. Esta tesis se realizó sobre una selección de diferentes ríos del hidrosistema del río Paraná, haciendo especial énfasis en el río Paraná Medio y Paraguay Inferior. Por otro lado, se consideró también el estudio de un río europeo de bajo orden, con el objetivo de iniciar la interpretación de los efectos de escala espacial sobre la distribución de los organismos bentónicos considerando las características hidráulicas propias de ríos tan diversos. Adicionalmente, se plantea el dilema evolutivo acerca de cómo los inver-

tebrados bentónicos enfrentan (o evitan) las fuertes corrientes fluviales donde habitan. Finalmente, con toda la información cualitativa recopilada se logró establecer el grado de incidencia de los parámetros hidráulicos del escurrimiento y morfológicos en la distribución espacial de especies de macro–invertebrados bentónicos.

Summary

Hydraulic conditions and benthic invertebrates in sandy bed rivers. Influence of hydrodynamic and morphology of dunes and meander bends

This thesis can be considered into of the eco–hydraulics scientific discipline. The eco–hydraulics has been considered the interdisciplinary link between hydraulics, geomorphology and ecology science. Eco–hydraulic studies are poorly developed in large rivers. One reason for that could be the methodological problems associated with to make hydraulic measurements in this type of environment. The dunes and meanders are morpho–dynamic structures commonly found in alluvial channels which influence the flow structure, transport and sediment deposition. In general these structures have been the subject of numerous investigations carried out in laboratories, trough numerical simulations, or direct measurements in small streams. However, in large rivers has not been achieved yet a clear understanding of the interactions between hydraulic and dunes or meanders. The knowledge of the incidence of morpho–hydrodynamic factors on the distribution of the benthic fauna is almost null in large rivers and poorly developed in small streams. This thesis was performed on different rivers in the Paraná River hydro–system, focusing on the Middle Paraná and Lower Paraguay rivers. Otherwise, in order to initiating the interpretation

of the effects of spatial scale on the benthic organisms distribution, it was also studied a European small river. Additionally, an evolutionary question arises herein: how do benthic invertebrates cope (or avoid) with the strong flows prevailing in large riv-

ers? Finally, with all information collected in this study was possible to establish the incidence level of the hydraulic and morphological characteristics on the spatial distribution of benthic macro-invertebrates species.

El enfoque histórico contextualizado como facilitador de la enseñanza de los mecanismos evolutivos

La utilidad de un enfoque histórico integrado a un encuadre CTS en la enseñanza de los mecanismos micro y macroevolutivos

Dr. Torreblanca, Marcela

Directora: Dra. Graciela Merino. Universidad Nacional de La Plata

Codirectora: Ana Lía De Longhi. Universidad Nacional de Córdoba

Programa: Maestría en Didáctica de las Ciencias Experimentales

Fecha de defensa: 6 de agosto 2010.

Resumen

La explicación del origen de las diversas formas de vida como resultado de cambios en su acervo genético constituye la base del pensamiento biológico moderno. Como revelara Theodosius Dobzhansky "Nada en la biología tiene sentido, si no se considera a la luz de la evolución".

En diferentes países se ha constatado la similitud de las ideas previas de los alumnos sobre los mecanismos y procesos evolutivos. A partir de algunas de estas investigaciones se les dio el atributo de *lamarckianas* a un grupo de ideas y preconcepciones recurrentes que se presentan en las respuestas de los alumnos enfrentados

a situaciones problemáticas de adaptación. Partiendo del supuesto que estas ideas constituyen obstáculos para la enseñanza aprendizaje de los conceptos aceptados por la comunidad científica actual, se realizó una secuencia didáctica basada en un enfoque histórico-epistemológico y se diseñó una investigación, comparando su alcance con otra secuencia basada en la resolución de problemáticas. Se implementó en dos cursos de tercero de enseñanza polimodal o secundaria superior pertenecientes a la unidad académica de la Escuela Normal de Junín, provincia de Buenos Aires.

Los objetivos del trabajo de investigación fueron: Indagar los fundamentos epistemológicos y didácticos para contribuir a un marco teórico que sustente esta modalidad de enseñanza basada en un enfoque histórico, integrado a un encuadre CTS. Diseñar y probar una innovación didáctica basada en el enfoque de la enseñanza de los mecanismos evolutivos dentro de un encuadre histórico y problematizador, como propuesta alternativa que ayude a superar los obstáculos de aprendizaje propios de estos contenidos.

Siguiendo las ideas de Bachelard, se consideró obstáculo de aprendizaje a aquellos conceptos que entorpecen la construcción de nuevo conocimiento.

El diseño de la investigación se encuadró dentro de un paradigma naturalista. Las cuestiones estudiadas se refirieron a ejemplos específicos sobre resistencia a los herbicidas, cultivos transgénicos, mimetismo de las mariposas y la adaptación de los insectos, entre otros.

Se analizaron las ideas sobre mecanismos evolutivos y la representación icónica de la evolución a través del tiempo (mediante la figura de la escalera: lineal o la del árbol: antecesor común-ramificación).

Al analizar los resultados de las pruebas realizadas (pre y pos test), las producciones escritas de los alumnos e interpretar las observaciones de las clases, se pudo extraer algunas conclusiones: Las ideas o representaciones previas de los alumnos de ambos cursos con respecto a los mecanismos evolutivos fueron similares entre sí y concordaron con los resultados de estudios anteriores realizados en distintos países. El concepto de selección natural fue el que presentó mayor cantidad de obstáculos. Cuando se utilizaron situaciones problemáticas específicas para dar un concepto, ese concepto se construyó con esa situación y no todos los alumnos pudieron trasladarlo a otra situación equivalente. Cuando se cambió de ejemplos o de contexto, las respuestas alternativas tendieron a reaparecer. Los alumnos del curso que no se practicó el enfoque histórico y se trabajó con situaciones problemáticas tuvieron mayores dificultades para aplicar los conceptos a nuevas situaciones. También manifestaron una mayor variedad de respuestas alternativas intermedias. En este caso, el enfoque his-

tórico favoreció la argumentación y la construcción del discurso compartido de los alumnos y el docente porque proveyó recursos, testimonios, pruebas, contraargumentos, que permitieron el diálogo y el debate. La dificultad que presentaron ambos cursos, fue considerar la formación de nuevas especies por hibridación o macromutaciones. Estos obstáculos se corresponden con los presentados durante el inicio del desarrollo de la teoría evolutiva, antes que fuera aceptada la selección natural como principal mecanismo en la síntesis moderna.

El aprendizaje de la evolución en la educación secundaria es fundamental, puesto que es el contenido eje de la biología actual. Su enseñanza posee algunas dificultades en la comprensión de las representaciones y los mecanismos implicados en la estructura teórica aceptada por la comunidad científica actual, de allí el interés de estudiar esta problemática. Que no se consuma aquí. Es el punto de partida para seguir profundizando y obtener mayor conocimiento aplicable en la didáctica de la biología.

Summary

Contextualized historical approach to facilitate the teaching of evolutionary mechanisms

The students' previous conceptions about the mechanisms of evolution are similar in different countries. From that onwards the "Lamarckians" attribute is given to a group of recurrent preconceptions which appear in the students' answers, those who face the understanding of the mechanism of evolution presented in the resolutions of problematic situations of adaptation when that requires an explanation of the implied mechanism of evolution. These "Lamarckians" ideas are not well denominated because it implies

the consideration of the evolution like a progressive lineal process and the mechanism of acquisition of structures by means of the use and disuse and the inheritance of the acquired characters.

Admitting that these ideas constitute obstacles for the teaching learning of the mechanism of evolution, a didactic unit was designed based on a historical–epistemological approach, in the context of these problems to get over these obstacles. This comparative study to examine two courses with 3^o year Natural Sciences orientation at High School is carried out to detect previously categorized conceptions.

The “lamarckians” and “darwinians” answers were analyzed in quantitative and qualitative research work and there was a close participant observation of classes to

evaluate the conceptualization process and the construction of the individual and group speech in each of the courses. The natural selection concept was the one that presented more obstacles.

In conclusion the historical focus favors the argument and the construction of the shared speech of the students and the educational one because it provides resources, testimonies, tests, counter–arguments that allow the dialogue and the debate to happen.

The outcome of this thesis was not only the corroboration of erroneous previous ideas but also contributed to the construction of a didactic innovation including prescriptions with proposals of strategies that may help to overcome the aforementioned obstacles.

Estructura y función de dominios Lipídicos en Biomembranas

Dr. Rodi, Pablo M.

Directora: Ana María Gennaro

Lugar de Realización: Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (UNL) e INTEC (CONICET)

Fecha de Defensa: lunes 3 de mayo de 2010

Resumen

Hace algunos años se propuso que en las biomembranas existen microdominios segregados lateralmente denominados rafts (balsas) con una composición lipídica y proteica diferente a la del resto de la membrana. Se cree que estos microdominios están enriquecidos en esfingolípidos y colesterol y que presentan un mayor orde-

namiento lipídico que la membrana que los rodea. A pesar de los numerosos esfuerzos dirigidos a dilucidar la naturaleza y función de los rafts, aún existe un intenso debate acerca de sus propiedades y características, y todavía no resulta totalmente claro qué papel cumplen los lípidos de la bicapa y cuál las proteínas. En este trabajo nos planteamos dos estrategias diferentes para abordar el estudio de los rafts.

Por una parte utilizamos un sistema biológico sencillo (la membrana eritrocitaria) para investigar las propiedades de los rafts mediante la obtención de DRMs (Membranas Resistentes al Detergente) con detergentes no–iónicos en frío. Analizamos la influencia de la composición lipídica y del

ordenamiento de la membrana en la capacidad del detergente de extraer material a partir de la membrana. Observamos una fuerte dependencia de la susceptibilidad a la solubilización con detergente tanto con la composición lipídica original de la membrana, principalmente los contenidos relativos de esfingomiélin y colesterol, como con el ordenamiento lipídico de la misma. Encontramos que las DRMs están enriquecidas en esfingomiélin y colesterol, y presentan un mayor ordenamiento lipídico que la membrana original. También detectamos fuertes vinculaciones entre el citoesqueleto y las vesículas de lípidos insolubles

Por otro lado llevamos a cabo un estudio de las interacciones de la proteína GAP-43 (reportada como perteneciente a rafts de neuronas e involucrada en el crecimiento neuronal) con sistemas modelo de membrana. Aquí estudiamos la relevancia de las interacciones proteína-lípido. Mediante ensayos de interacción de GAP-43 con sistemas modelo de membrana encontramos que la interacción de la proteína con la bicapa lipídica depende tanto de interacciones hidrofóbicas como electrostáticas y detectamos una mayor afinidad de GAP-43 por los sistemas lipídicos ordenados en comparación con los sistemas fluidos.

Summary

Structure and Function of Lipid Domains in Biomembranes

A few years ago it was suggested that laterally segregated microdomains, called rafts, exist at biomembranes, with a lipid and protein composition different from the rest of the membrane. It is believed that these microdomains are enriched in sphingolipids and cholesterol, and have a higher lipid order than the membrane surrounding

them. Despite numerous efforts to elucidate the nature and function of rafts, there is still much debate about their properties and characteristics, and it is not yet entirely clear which is the role of the lipids and proteins. In this work we propose two different strategies to address the study of rafts.

On the one hand we use a simple biological system (the erythrocyte membrane) to investigate the properties of rafts by obtaining DRMs (Detergent Resistant Membranes) with cold non-ionic detergent. We analyze the influence of lipid composition and membrane ordering on the ability of detergent to extract material from the membrane. We observed a strong dependence of the susceptibility to detergent solubilization with both the lipid composition of the original membrane, mainly the relative contents of sphingomyelin and cholesterol, and with the membrane lipid ordering. We found that DRMs are enriched in sphingomyelin and cholesterol, and their lipid order is larger than that of the original membrane. Also we found strong linkages between the cytoskeleton and the insoluble lipid vesicles.

In addition we conducted a study of interactions of the protein GAP-43 (reported as belonging to neuron rafts and involved in neuronal growth) with model membrane systems. Here we studied the relevance of protein-lipid interactions. By testing the interaction of GAP-43 with model membrane systems we found that the protein interaction with the lipid bilayer depends on both hydrophobic and electrostatic interactions, and we detected a greater affinity of GAP-43 by ordered lipid systems compared to fluid ones.

Diseño, modelado y optimización de un proceso integrado de producción de un doble insecticida biológico viral–bacteriano

Dr. Micheloud, Gabriela A.

Director: Dr. Juan Claus

Codirector: Dr. Gustavo Pérez

Lugar de realización: Laboratorio de Virología – FBCB – UNL

Fecha de la defensa: 28 de Mayo de 2010

Resumen

Anticarsia gemmatalis Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), una de las principales plagas de los cultivos de soja, puede ser eficientemente controlada mediante la utilización de insecticidas de origen biológico. Dos de los bioinsecticidas utilizados con ese propósito son el virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV) y las entomotoxinas producidas por la bacteria *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk). A pesar de sus innegables ventajas ambientales, su aceptación, y la expansión de su aplicación, están condicionadas principalmente porque sus propiedades insecticidas son menos notables que las que caracterizan a los productos químicos y, por otro lado, exhiben una relación actividad/precio menos ventajosa. Con el objetivo de contribuir a superar estas limitaciones, se propuso estudiar, mediante una estrategia experimental en cuatro etapas, la factibilidad de desarrollar un proceso fermentativo combinado para obtener un coproducto constituido por ambos bioinsecticidas.

En primer término se estableció un sistema experimental consistente en cultivos en suspensión de la línea celular saUFL–

AG–286 en el medio libre de suero UNL–10, mantenidos en un agitador orbital con temperatura regulada. En este sistema se estudió la influencia de la velocidad de agitación y el volumen de llenado de las botellas, mediante la utilización de un diseño experimental de tipo factorial completo. Además, se pudo determinar la combinación de condiciones operativas que alcanzan un valor óptimo de la velocidad específica de proliferación celular. Esta misma combinación, permitió también obtener los rendimientos más elevados de cuerpos de oclusión en cultivos de la línea celular saUFL–AG–286 infectados con el virus AgMNPV.

Una vez establecido, el sistema de cultivo en suspensión en frascos con agitación orbital fue aplicado a estudiar, utilizando dos series experimentales con diseño factorial completo con punto central, la influencia de dos parámetros de infección, la densidad celular al momento de la inoculación viral y la multiplicidad de infección, sobre la producción de poliedros en cultivos infectados. El análisis de los resultados demostró que la capacidad celular específica de producción de cuerpos de oclusión, como así también su rendimiento final, se correlacionaron con la densidad celular máxima alcanzada en cada cultivo infectado, y que ésta última, a su vez, depende de la selección de la densidad celular al momento de la inoculación viral y la multiplicidad de infección. A partir de los análisis de regresión de los resultados obtenidos en ambas series experimentales se pudo derivar un modelo empírico,

el cual permitió establecer la combinación de los parámetros de infección que producen el rendimiento máximo de poliedros.

El cultivo de células saUFL-AG-286 en el medio UNL-10 se escaló en dos bio-reactores de diferente configuración, un tanque con agitación mecánica y un reactor *airlift* concéntrico, demostrando que estas células pueden adaptarse a las condiciones imperantes en procesos fermentativos característicos de la industria productora de agro-biológicos. El reactor *airlift* mostró una aptitud superior que el reactor con agitación mecánica para el cultivo de esta línea celular, aptitud demostrada a través de una mayor velocidad celular específica de proliferación, una densidad celular máxima más elevada, la ausencia de fase *lag*, una viabilidad superior, un más eficiente uso de la glucosa y una menor producción de amonio.

Los cultivos de células saUFL-AG-286 infectados con AgMNPV en ambos reactores produjeron elevados rendimientos volumétricos de poliedros, si bien resultaron 30% inferiores a los previstos de acuerdo al modelo empírico desarrollado en cultivos infectados a escala de frascos agitados. En el reactor *airlift*, la reducción del rendimiento volumétrico parece ser la consecuencia de una mayor eficiencia en la infección inicial, que limitó la proliferación celular, y por lo tanto el número de células productoras de poliedros, mientras que la capacidad específica de cada célula fue similar a la obtenida en cultivos en frascos agitados que alcanzaron la misma densidad celular máxima. Por otro lado, la disminución del rendimiento volumétrico de poliedros en cultivos infectados en el reactor de tipo tanque agitado parece ser consecuencia de una reducción en la capacidad celular específica de producción de cuerpos de oclusión.

Por último, los resultados obtenidos en esta tesis demostraron la factibilidad de producir esporos y cristales entomotóxicos de Btk sobre cultivos de células saUFL-AG-286 previamente infectados con AgMNPV. La propagación del bacilo, y su esporulación, no alteraron la actividad biológica de los poliedros producidos en la primera etapa del proceso de coproducción, ni tampoco parecieron afectar la integridad de la poliedrina viral. El proceso de coproducción de ambos insecticidas biológicos se escaló en un reactor de tipo tanque agitado, en el cual se obtuvo como productos finales una mezcla en suspensión de poliedros de AgMNPV y esporos y cristales de Btk. La evaluación de la actividad biológica de la mezcla insecticida sobre larvas neonatas de *Anticarsia gemmatalis* mostró que existe interacción entre ambos.

En nuestro conocimiento, esta es la primera descripción de un proceso que permite producir dos bio-insecticidas en una misma fermentación, y es también la primera descripción de un proceso que combina, en un mismo reactor, la multiplicación de un virus y la propagación y esporulación de una bacteria. Estos resultados pueden constituir un aporte al desarrollo de procesos fermentativos económicamente factibles de producción de agentes biológicos de control de plagas.

Summary

Design, model and optimisation of an integrated process to obtain a dual bionsecticide

Anticarsia gemmatalis Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), a major pest of soybean crops, can be controlled by using insecticides of biological origin. Two of the bio-insecticides used for this purpose are the

Anticarsia gemmatalis multicapsid nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) and the entomotoxins produced by the bacterium *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk). Despite its undeniable environmental advantages, acceptance of these pesticides, and the expansion of its application are conditioned by two main factors: its insecticidal properties are less remarkable than those that characterize the chemical pesticides and, moreover, exhibit a less advantageous activity/price relationship. In order to help overcome these limitations, it was proposed to study the feasibility of developing a combined process to obtain a co-product consisting of two bio-insecticides, AgMNPV and Btk. To this end, a four steps experimental strategy was developed: establishment of a suspension culture system for the cell line

saUFL-AG-286 in flasks with orbital shaking; study of the influence of the conditions of infection, modelling and optimization of AgMNPV production in suspension cultures of saUFL-AG-286 cells; scaling-up of viral production in standard bio-reactors; and evaluation of the feasibility to obtain the viral-bacterial co-product.

To our knowledge, this is the first description of a process that can produce two biological insecticides in the same fermentation, and is also the first description of a process that combines, in the same reactor, the multiplication of a virus in cultures of a eukaryotic cell line and the propagation of a bacterium. These results can make a contribution to the development of economically feasible processes for production of bioinsecticide agents.

Mecanismos moleculares que determinan la arquitectura de las raíces de las leguminosas

Dr. Federico, Damián Ariel

Directora: Dra. Raquel Chan

Lugar de trabajo: Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (CONICET/UNL), Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL.

Fecha de defensa: 22 de octubre de 2010

Resumen

Contrariamente a lo que sucede en los animales, la plasticidad del desarrollo de las plantas les permite adaptar su arquitectura y el patrón de crecimiento en respuesta a los factores externos que modulan los niveles y la señalización de las hormonas. La. A partir de los meristemas apicales del tallo y de la raíz se forman nuevos órganos una vez superada la embriogénesis. La arqui-

tectura de las raíces constituye un modelo adecuado para estudiar cómo la plasticidad del desarrollo responde a las condiciones de estrés.

La familia de las leguminosas incluye a varios de los cultivos más importantes del mundo. Sus miembros pueden generar otros meristemas *de novo* en sus raíces, llamados nódulos, a partir de la interacción simbiótica con las bacterias del suelo. Los nódulos les permiten a las plantas fijar nitrógeno atmosférico y crecer en suelos poco fértiles. Sin embargo, tanto la formación de las raíces laterales como la de los nódulos, son muy sensibles a la falta de agua y al estrés salino, condiciones que se reflejan en el detrimento de la productividad.

La plasticidad del desarrollo de las raíces depende de la formación de las raíces laterales que emergen de la raíz principal. En la planta modelo de leguminosas *Medicago truncatula*, el factor de transcripción (FT) MthB1 de la familia HD-Zip I se induce a nivel transcripcional por estrés salino y ABA. Con el fin de dilucidar el rol de MthB1 en la formación de las raíces, se las transformó con *Agrobacterium rhizogenes*, obteniendo así plantas quiméricas con una parte aérea salvaje y raíces transgénicas. El análisis de la actividad de su región promotora dirigiendo la expresión del gen reportero *GUS* demostró que *MthB1* se transcribe en los meristemas de la raíz principal y de las raíces laterales. La expresión constitutiva de *MthB1* disminuye la densidad de las raíces laterales emergentes. A su vez, las plantas mutantes *mthb1* sufren un incremento en el porcentaje de emergencia de sus raíces laterales, aunque la iniciación de las mismas no se ve alterada. Mediante ensayos de retardo en geles, mutagénesis dirigida de las secuencias promotoras e inmunoprecipitación de la cromatina seguida de PCR, se determinó que MthB1 reconoce en forma directa el promotor del gen de tipo LOB (del inglés, LATERAL ORGAN BOUNARIES) *MtLBD1*. Este gen está regulado a nivel transcripcional por las auxinas, hormonas encargadas de promover la formación de las raíces laterales. La expresión de ambos genes en respuesta a ABA y auxinas y sus comportamientos en las plantas *mthb1* indicaron que existe una represión directa de *MtLBD1* por parte de MthB1 durante la emergencia de las raíces laterales. *MthB1* regula una respuesta adaptativa del desarrollo de *M. truncatula* con el fin de minimizar la superficie de contacto de las raíces con el medio estresante.

Las fitohormonas citoquininas controlan diversos procesos del desarrollo. El receptor MtCRE1 (del inglés, CYTOKININ RESPONSE 1) es crucial para la interacción simbiótica de las leguminosas con las bacterias fijadoras de nitrógeno. Los receptores de citoquininas activan un sistema de fosforilación que regula postraduccionalmente a los FTs de la familia de los Response Regulators (RRs) de Tipo B, y la expresión de genes de respuesta primaria. En nuestro trabajo hemos identificado genes inducidos por las citoquininas en las raíces de *M. truncatula*, a partir de un ensayo de microarreglos. Por otro lado, hemos determinado una secuencia consenso de 12 pb reconocida *in vitro* por el FT MtRR1, llevando a cabo una estrategia de SELEX. El gen de respuesta primaria *MtRR4* presenta varias Cajas del tipo RR en su región promotora. Pudimos demostrar mediante ensayos de mutagénesis y ensayos de retardo en geles con extractos nucleares de raíces tratadas con citoquininas que estos elementos *cis* son indispensables para una respuesta normal a las citoquininas *in planta*.

El ensayo de microarreglos nos permitió identificar nuevos genes regulados por las citoquininas en raíces, en cuyos promotores existen secuencias relacionadas a las Cajas del tipo RR. Varios de estos transcritos correspondientes son regulados por citoquininas de manera independiente a la formación de proteínas *de novo*, o resultaron ser dependientes de la vía de señalización de MtCRE1. Entre los nuevos genes probablemente regulados por los RRs de Tipo B identificamos a *MtNSP2*, que codifica un FT involucrado en las etapas tempranas de la nodulación. Pudimos demostrar que las Cajas de tipo RR presentes en su región promotora son esenciales para la activación

por citoquininas y la expresión de *MtNSP2* durante la nodulación. Proponemos entonces que la activación del sistema de fosforilación a través de los RRs de Tipo B es necesaria para la regulación de *MtNSP2* por las citoquininas durante la organogénesis de los nódulos simbióticos.

Summary

Molecular mechanisms controlling legume root architecture

Root developmental plasticity depends on the formation of lateral roots (LRs) emerging from primary roots. In the model legume *Medicago truncatula*, the HD-Zip transcription factor (TF) MtHB1 is expressed in root meristems and induced by salt stress. Constitutive expression of *MtHB1* in *M. truncatula* roots alters their architecture, whereas *mthb1* mutants show increased LR emergence. EMSA, promoter mutagenesis and ChIP-PCR assays revealed that MtHB1 directly recognizes a *cis*-element present in the promoter of a LOB-like (LATERAL ORGAN BOUNDARIES) gene, *MtLBD1*, transcriptionally regulated by auxin during LR formation. Molecular behavior of both genes revealed an MtHB1-mediated repression of *MtLBD1* acting during LR emer-

gence. *M. truncatula* *MtHB1* regulates an adaptive developmental response to minimize the root surface exposed to adverse environmental stresses.

Cytokinins control many aspects of plant development and the MtCRE1 (CYTOKININ RESPONSE 1) receptor is crucial for the symbiotic interaction in legumes. This pathway activates Type-B Response Regulator (RR) TFs, which control the expression of primary response genes. We characterized a 12 bp-consensus sequence bound *in vitro* by the *M. truncatula* MtRR1 TF, the so-called RR Binding Site (RRBS). Several RRBS are found in the *MtRR4* cytokinin primary response gene and required for its activation *in planta*. A transcriptomic approach revealed new cytokinins-responsive genes in roots containing RRBS in their promoters. Among them, we identified the MtNSP2 TF involved in legume-specific nodulation. *MtNSP2*'s RRBS are essential for cytokinin and symbiotic transcriptional regulation. Thus, direct activation through specific RRs is required for cytokinin regulation of this critical nodulation signaling gene.

Administración de fármacos por vía transdérmica

Dr. Mengatto, Luciano Nicolás

Director: Dr. Julio Luna

Codirectora: Dra. María Inés Cabrera

Lugar de realización: Laboratorio de Química Fina – Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química – CCT – CONICET – Santa Fe

Fecha de la defensa: 24 de noviembre de 2010

Resumen

El estudio de los procesos de absorción – liberación de 17 β -estradiol a través de fragmentos de epidermis humana y a través de membranas de quitosán, fue la base para el desarrollo de un sistema de administración transdermal de estradiol. Para realizar los estudios de estos procesos se trabajó con la celda vertical de Franz y un equipo

para ensayos de disolución conforme a normas USP/NF y FDA.

Se caracterizaron los 2 reactivos claves para el desarrollo de esta tesis. Quitosan: Se identificó el polímero mediante el uso de espectroscopia de infrarrojo. Se determinó su grado de desacetilación mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear y su masa molecular viscosimétrica a través de la ecuación de Mark-Houwink utilizando el valor de viscosidad intrínseca. 17β -estradiol: Se identificó la droga mediante el uso de espectroscopia de infrarrojo y determinación del punto de fusión y comparación con un estándar. Se desarrolló un método de cuantificación mediante cromatografía líquida de alta resolución.

Se obtuvieron fragmentos de epidermis humana a partir de piel completa mediante tratamiento con solución de tripsina, siendo los mismos aptos para estudios de difusión. Los ensayos de absorción en celda de Franz y de liberación – absorción en el equipo para ensayos de disolución, permitieron la determinación de los valores de flujo de 17β -estradiol en los fragmentos de epidermis.

Se construyeron diseños experimentales Factoriales Fraccionados con el objetivo de realizar experiencias de una manera eficiente y programada. Con ellos se estudió el efecto de variables que afectan el flujo de 17β -estradiol a través de membranas de quitosan. Mediante el uso de la metodología de superficie de respuesta, a través de la construcción de Diseños Central Compuesto, se determinaron las condiciones experimentales óptimas donde el sistema genera los resultados esperables: una membrana con propiedades de permeabilidad similares a epidermis humana.

Las membranas de quitosan utilizadas fueron caracterizadas mediante ensayos

de: absorción de 17β -estradiol, evaluación del contenido de agua, espectroscopias de absorción atómica, infrarrojo y de resonancia magnética nuclear pulsada, y observación por microscopía electrónica de barrido. Se obtuvo información sobre la interacción quitosan – 17β -estradiol con el objeto de comprender el o los mecanismos de transporte de la droga a través o desde membranas del polímero. En las membranas con distintos tiempos de entrecruzamiento se identificaron dos tipos de microporos, hidrofílicos e hidrofóbicos.

Se prepararon films de quitosan como prototipos de sistemas de administración transdermal. Se realizaron ensayos de liberación con estos sistemas, solos y junto con la membrana que simula epidermis humana, presentando una equivalencia con un parche comercial (Trial Sat® de Laboratorios BETA S.A., Argentina). En cuanto al prototipo de parche desarrollado para liberación controlada de estradiol, éste presentó varios de los requisitos que debe cumplir un buen sistema transportador de droga. No tóxico ni irritante, a priori se sabe que el quitosan es un polímero biocompatible, y además ampliamente utilizado en la manufactura de sistemas de liberación. La formulación utilizada en esta tesis fue evaluada *in vivo* por otros autores siendo la respuesta inflamatoria mínima. Es estable, una pérdida de peso del 5.0 % indicó una elevada estabilidad luego de la inmersión en la solución receptora toda la noche. Cosméticamente aceptable, el film es traslúcido y transparente y de una leve tonalidad amarilla. Farmacológicamente inerte, de la composición del mismo (quitosan, estradiol, poloxamer y glicerol) el único ingrediente activo es el estradiol.

Summary

Transdermal Drug Delivery

The study of 17 β -estradiol absorption – release processes through human skin epidermis and chitosan membranes, was the basis for the development of an estradiol transdermal delivery system. Experiments were conducted using vertical Franz diffusion cell and dissolution test equipment.

The most important reagents were characterized. Chitosan: the polymer was identified by using infrared spectroscopy. Deacetylation degree was evaluated by nuclear magnetic resonance spectroscopy. The intrinsic viscosity was evaluated and average molecular weight was determined based on the Mark–Houwink equation. 17 β -estradiol: the drug was identified by using infrared spectroscopy and comparison with a standard. Melting point was also evaluated. A high performance liquid chromatography method was developed for the determination of 17 β -estradiol.

Full skin was immersed in a solution containing trypsin, then, the intact epidermis was easily separated from the dermis. Diffusion studies with epidermis allowed to the 17 β -estradiol flux determination.

Fractional factorial designs were performed in order to identify active formulation variables influencing estradiol flux through chitosan membranes. Central composite design was carried out in order to find out the combination of independent factors that allowed the preparation of the optimized membrane: a chitosan membrane as a mimic of human epidermis.

Chitosan membranes were characterized. Hydrophilic and hydrophobic micropores were identified in cross-linked membranes prepared with different cross-linking times.

Chitosan films were prepared as a prototype of transdermal delivery system. These films were tested alone and attached to the optimized chitosan membrane. Results were comparable to that obtained with a commercial patch.

Control biológico de hongos toxicogénicos presentes en forrajes conservados empleando cepas de *Streptomyces*

Dr. Amigot, Susana Lucrecia

Director: Dr. Juan Carlos Basílico

Codirectora: Dra. Cecilia L. Fulgueira

Lugar de realización: Cat Microbiología, Fac Ing Química. UNL y CEREMIC. Fac Cs Bioq y Farm. UNR.

Fecha de la defensa: 10 de diciembre de 2010.

Resumen

La República Argentina es un país que se ha caracterizado a lo largo del tiempo por su importante producción agrícola-ganadera.

Los sistemas de producción de ganado se basan en el pastoreo directo de los recursos forrajeros suplementado con granos, subproductos de las cosechas, forrajes almacenados por deshidratación (heno) o por fermentación (ensilaje y henolaje) con distintos sistemas de conservación.

La calidad del forraje se refiere a cómo los animales consumen un alimento y a cómo los alimentos se convierten eficientemente en productos animales. Los parámetros que brindan al productor información sobre la calidad de un forraje pueden agruparse en: organolépticos, parámetros que permiten evaluar la composición química, el procesamiento y conservación, la digestión y el contenido de energía del mismo. Los principales parámetros que permiten evaluar tal calidad son: proteína bruta, fibra detergente neutra, fibra detergente ácida, materia seca, pH, nitrógeno amoniacal y nitrógeno insoluble en detergente ácido y en detergente neutro.

El éxito de los procesos de conservación de alimentos depende los microorganismos (benéficos o perjudiciales) que se hallan presentes.

La flora benéfica, constituida principalmente por las bacterias ácido lácticas, asegura un valor apropiado de pH limitando el desarrollo de la flora microbiana no benéfica (*Clostridium*, *E.coli*, otros Bacilos Gram negativos, hongos levaduriformes y/o filamentosos). Algunos géneros fúngicos como *Aspergillus*, *Fusarium*, etc., contaminantes tanto de la materia prima como de los alimentos destinados al consumo animal, cobran especial interés por su capacidad patógena y/o toxigénica.

El estudio de la calidad químico-fermentativa de alimentos (forrajes de maíz, sorgo y alfalfa) destinados al consumo animal de la cuenca lechera de la provincia de Santa Fe, permitió calificar a las muestras de sorgo y maíz mayoritariamente como regulares y a las de alfalfa como regulares o malas. Además, se observó que el sistema puente no era recomendable para el almacenamiento de los forrajes de sorgo.

Teniendo en cuenta el recuento total de hongos, los ensilados de maíz fueron los más contaminados seguidos por los de alfalfa. Los hongos levaduriformes fueron los de mayor aparición en todos los forrajes. Entre los hongos filamentosos los posibles toxigénicos fueron los más aislados. Dentro de ellos el género *Aspergillus* fue el que se presentó mayoritariamente en los 3 sustratos siendo *Aspergillus* sección *flavi* los más frecuentes. Cuando se evaluó *in vitro* la toxigenicidad de los aislados se comprobó la capacidad productora de aflatoxinas (AF) por 2 cepas de *Aspergillus* y de fumonisinas por 2 cepas del género *Fusarium*.

En los ensilados de alfalfa y maíz se observó la mayor incidencia de AF y deoxinivalenol (DON) con valores no aceptables para el consumo animal, presentándose mayoritariamente en forma conjunta las dos toxinas. Los valores más altos de DON se presentaron en forrajes de maíz y alfalfa. En los ensilados de sorgo se encontraron las concentraciones más altas de AF.

En base a la evaluación conjunta de las todas las variables estudiadas se pudo concluir que en muchos casos los parámetros químico-fermentativos o toxico-micológicos *per se* resultaron insuficientes para obtener la calificación final de los forrajes. Se diseñó un protocolo de análisis empleando variables indicadoras que permitió evaluar en forma sencilla y confiable la aceptabilidad final de los forrajes.

Teniendo en cuenta el análisis de los parámetros químico-fermentativos y tóxico-micológicos o de sus variables indicadoras la mayoría de las muestras de alfalfa y maíz no resultaron aceptables para el consumo de ganado vacuno, mientras que casi la mitad de los forrajes de sorgo resultaron también riesgosos.

La prevención del deterioro de la calidad debe ser una parte importante de todo programa de conservación de alimentos. El control biológico es una herramienta que permitiría regular la densidad de microorganismos patógenos y/o sus efectos en forma más inocua que el control químico. En la búsqueda de potenciales biocontroladores de hongos toxigénicos fueron seleccionadas una cepa de *Streptomyces* sp., C/33–6 y *Lactobacillus buchneri*, BAL/7.

Fueron diseñados silos experimentales, reproduciendo las condiciones a campo, en los que se inocularon los microorganismos seleccionados como potenciales biocontroladores y una cepa toxigénica de *A. parasiticus*, 5M43.

Las condiciones experimentales no permitieron obtener silos de Buena calidad químico–fermentativa. En buenas condiciones de conservación los ME resultaron de calidad Regular. Las malas condiciones produjeron silos de calidad químico–fermentativa Mala a excepción de aquellos en los que fue inoculado BAL/7, calificados como Regulares. Todos los ME Regulares fueron aceptables en su evaluación final.

La aceptabilidad final de los ME obtenida a partir del análisis conjunto de todas los parámetros coincidió con la resultante del empleo de las variables indicadoras.

En las condiciones ensayadas *Lactobacillus buchneri* BAL/7 resultó un agente de biocontrol más promisorio que *Streptomyces* sp C/33–6.

Summary

Biological control of toxigenic molds present in silages using strains of Streptomyces

Cattle rearing production systems are based upon the direct grazing of forage stored as hay or as silage and haylage, etc.

The factors that provide information on forage quality can be grouped as chemicof–fermentative parameters.

The study on the chemicof–fermentative quality of maize, sorghum and lucerne forages within the province of Santa Fe was possible to classify the samples as mostly fair. The bunker system was considered not to be recommended for storing sorghum forages. According to the total fungi count the maize silages presented the highest contamination levels. Yeast–like fungi and potential toxigenic fungi (*Aspergillus* section Flavi) had the highest prevalence rate in every forage.

The highest incidence of Aflatoxins and Deoxynivalenol was found in lucerne and maize silages with levels that were not fit for animal consumption with maxims of Deoxynivalenol in maize and lucerne and of Aflatoxins in sorghum.

It could be concluded that in many cases, chemicof–fermentative or toxic–mycological parameters per se were not comprehensive enough to evaluate forages. An analysis protocol was designed including indication variables to ensure a simple and reliable assessment of forage final acceptability.

The acid lactic bacteria, exerts an appropriate pH level limiting the development of non–beneficial microbial flora. *Streptomyces* strains showed antifungal activity in vitro. *Streptomyces* sp–C/33–6, and *Lactobacillus buchneri*, LAB/7, were respectively selected as potential biocontrol agents which were inoculated together with *A. parasiticus* 5M43 (toxigenic strain) in experimental micro–silages.

Under these conditions, *Lactobacillus buchneri* LAB/7, turned out to be more promising than *Streptomyces* sp. C/33–6, as a biocontrol agent.

Mecanismos moleculares de expresión de componentes de los complejos respiratorios de plantas

Dr. Comelli, Raúl N.

Director: Dr. Daniel H. González

Lugar de realización: Laboratorio de investigación de la Cátedra de Biología Celular y Molecular (FBCB – UNL).

Fecha de la defensa: 13 de diciembre de 2010.

Resumen

La biogénesis de la maquinaria respiratoria mitocondrial de plantas requiere la síntesis y el ensamblado en forma coordinada de los productos de genes localizados en el núcleo y dentro de la organela. Uno de los factores que regula la expresión de los genes nucleares en la disponibilidad de carbohidratos y la regulación de este proceso opera a nivel de la transcripción a través de elementos presentes en las regiones promotoras de los genes. La citocromo c oxidasa (COX), enzima terminal de la cadena respiratoria mitocondrial, está compuesta por al menos diez polipéptidos diferentes, tres de ellos codificados en el genoma mitocondrial y los restantes en el genoma nuclear. Entonces, es lógico asumir que el correcto ensamblado de COX requiere la expresión coordinada de los genes codificantes para las diferentes subunidades de la mencionada enzima, o al menos de la mayoría de ellos. En este Trabajo de Tesis se ha caracterizado la expresión de los dos genes nucleares de *Arabidopsis* codificantes para la subunidad 5b de la citocromo c oxidasa (*COX5b-1* y *COX5b-2*), la subunidad de codificación nuclear más conservada. Las regiones promotoras de los genes mencio-

nados se estudiaron mediante la utilización de plantas transformadas en forma estable con fragmentos mutados de promotor fusionados al gen reportero *gus*. La expresión del promotor de *COX5b-1* (At3g15640) es absolutamente dependiente de un elemento G-box (CACGTG) situado en el nucleótido -228 desde el sitio de inicio de la traducción. Una región localizada por encima de este elemento (-333/-259) contiene secuencias con el núcleo ATCATT y secuencias similares al elemento *distalB* (CCACTTG), las cuales son requeridas para la expresión del gen en tejidos vegetativos. Estas secuencias son capaces de unir diferentes proteínas presentes en extractos nucleares y participan en la inducción por sacarosa y otros carbohidratos (secuencias ATCATT) o potencian la respuesta a la hormona ABA (secuencias similares al elemento *distalB*). Además, un elemento reportado como sitio de unión al factor de transcripción PHR1 (GTATATGC), presente en la misma región que las secuencias mencionadas con anterioridad, actúa como elemento regulador negativo de la expresión del gen principalmente en raíces. Un fragmento de 1000 pb del promotor de *COX5b-2* (At1g80230) dirigió la expresión del gen reportero en meristema apical del vástago, meristema de raíz, ápice de cotiledones y hojas y en anteras. Se identificó un elemento G-box regulatorio localizado entre -660 y -620 desde el ATG inicial que al ser mutado en forma puntual incrementa la expresión de *COX5b-2* en cotiledones y en la lámina de las hojas y, además, anula completamente la inducción

del gen por luz UV, estímulo que probablemente opera removiendo el factor de transcripción inhibitorio capaz de unir el elemento G-box. Los elementos regulatorios positivos identificados incluyen un elemento *site //* típico (TGGGCC), un elemento de secuencia TGGGTC similar al *site //* y cuatro elementos *Iniciadores* (YTCANTYY, Y = C o T). La mutación de estos elementos en forma conjunta anuló completamente la expresión del gen *COX5b-2*. Los elementos *site //* también se encuentran involucrados en la respuesta a sacarosa. Por otro lado, mediante ensayos de simple híbrido en levaduras se identificaron varios factores de transcripción capaces de interactuar con algunos de los elementos regulatorios presentes en los promotores de *COX5b-1* y *-2*. Los elementos G-box influyen la transcripción de los genes estudiados mediante caminos diferentes, ninguno de ellos relacionado con la respuesta a carbohidratos. Consecuentemente, estos elementos mostraron diferentes preferencias de unión por factores de transcripción pertenecientes a las familias ABF (ABRE-binding factor) y GBF (G-box binding factor) de factores con dominios de unión al ADN de tipo bZIP. En *COX5b-1*, las secuencias con el núcleo ATCATT fueron reconocidas por factores de transcripción pertenecientes a las familias HD-ZIP I y GT, mientras que las secuencias similares al elemento *distalB* fueron unidas por una proteína perteneciente a la familia AP2/ERF de factores de transcripción. Finalmente, se analizó la presencia en el genoma de *Arabidopsis* de los dos genes estudiados en función de las hipótesis planteadas por el modelo DDC de duplicación de genes. Los genes *COX5b-1* y *-2* mostraron diferentes patrones de expresión y respuesta a varios compuestos, pero compartieron

la inducción por sacarosa y otros carbohidratos. Los resultados obtenidos implican que *COX5b-2* retuvo las características de expresión presentes en la mayoría de los genes codificantes para componentes de la cadena respiratoria mitocondrial, pero estos mecanismos de expresión han divergido respecto a los observados en *COX5b-1*. Se propone que el promotor de este último habría adquirido nuevos mecanismos regulatorios durante la evolución posterior al evento de duplicación. Estos nuevos mecanismos habrían permitido la diversificación de los patrones de expresión, pero también la conservación de algunas respuestas que, como la inducción por sacarosa, son compartidas por *COX5b-1* y numerosos genes codificantes para componentes de la maquinaria respiratoria mitocondrial. La conservación de estas respuestas podría ser un requisito previo para la exitosa incorporación de elementos regulatorios nuevos en esta clase de genes.

Summary

Molecular mechanisms of expression of components of the plant respiratory complexes

Cytochrome c oxidase (COX), the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, is composed of different polypeptides encoded either in the mitochondrial genome or the nuclear genome. It is logical to assume that correct COX assembly requires the coordinated expression of the genes that encode its different subunits. In this thesis we have characterized the expression of the two *Arabidopsis* nuclear genes encoding COX5b subunit, the most conserved nuclear-encoded subunit. Expression of the *COX5b-1* gene (At3g15640) is absolutely dependent on a G-box element.

Elements with the core sequence ATCATT and *distalB*-like sequences (CCACTTG) are required for expression in vegetative tissues and participate in induction by sucrose and abscisic acid. A PIBS element acts as a negative regulatory element, mainly in roots. A 1000-bp promoter fragment of the *COX5b-2* gene (At1g80230) produced expression in root and shoot meristems, leaf and cotyledon tips, and anthers. Mutation of a G-box element increases expression of *COX5b-2* in cotyledon and leaf lamina and abolishes induction by UV light. Identified positive regulatory elements include

a *site II* element (TGGGCC), a related element (TGGGTC) and four *Initiator* elements (YTCANTYY) that completely abolish expression when mutated in combination. *Site II* elements are also involved in the response to sucrose. Transcription factors able to interact with regulatory sequences present in the *COX5b-1* and *COX5b-2* promoter regions were identified using yeast one-hybrid assays. Finally, we analyzed if the presence in the Arabidopsis genome of the two *COX5b* genes could be explained by the DDC model for gene duplication.

Cultivos probióticos para productos lácteos. Respuesta a nuevos desafíos tecnológicos y estrategias para mejorar cepas

Dr. Burns, Patricia Graciela

Director: Dr. Jorge Reinheimer

Codirector: Dr. Gabriel Vinderola

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

Fecha de defensa: 15 de diciembre de 2010

Resumen

El trabajo de tesis doctoral recoge la mirada de la innovación tanto de la matriz alimentaria como de las cepas empleadas. Por un lado se evaluó el potencial aplicativo del tratamiento de homogeneización de alta presión (HPH, high pressure homogenization) de la leche para la elaboración de queso Crescenza y yogur adicionados de bacterias probióticas comerciales. La homogeneización de alta presión es una de las alternativas más promisorias a los tratamientos térmicos tradicionales, aplicados a la leche, para la preservación de los aspectos

nutricionales y para la diversificación de productos lácteos.

Se elaboraron 4 variedades de quesos Crescenza y 4 tipos de yogures, siendo las variables el tratamiento tradicional de la leche con calor (pasteurización) o mediante HPH y el agregado o no de cultivos probióticos empleados en productos lácteos.

De acuerdo a los resultados obtenidos, no se observaron diferencias significativas entre los quesos en cuanto a composición y pH. El tratamiento HPH de la leche incrementó significativamente el rendimiento quesero (1%) y afectó positivamente la viabilidad de las bacterias probióticas durante el almacenamiento a 4°C. Tanto el tratamiento HPH de la leche como la adición de bacterias probióticas afectaron los patrones proteolíticos y lipolíticos de los quesos.

Respecto a los yogures, el tratamiento HPH de la leche no modificó la viabilidad

de los cultivos probióticos pero sí protegió la viabilidad de los cultivos starters. El coágulo de los yogures HPH resultó significativamente más compacto (mayor firmeza) que el coágulo de los yogures elaborados con leche tratada térmicamente. En el análisis sensorial, todas las muestras recibieron puntajes elevados. Estos resultados permitieron concluir que el tratamiento HPH de la leche podría diversificar el mercado de las leches fermentadas adicionadas de bacterias probióticas, innovando especialmente en relación a los parámetros de textura.

En el segundo eje temático se abordó la adaptación progresiva de lactobacilos de origen no intestinal a concentraciones fisiológicas de sales biliares. A partir de 24 cepas sensibles a bilis, pertenecientes a las especies *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. helveticus* y una cepa de *L. acidophilus*, se lograron obtener 6 derivados (5 cepas de *L. delbrueckii* subsp. *lactis* y una de *L. acidophilus*) capaces de crecer en presencia de 0,5% (p/v) de bilis. Para una cepa en particular, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 y su derivado resistente a bilis *L. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+, se realizaron, además, estudios de proteómica, morfológicos, fisiológicos y de funcionalidad. La comparación de los patrones de proteínas de las cepas crecidas en presencia o ausencia de bilis permitió identificar 9 proteínas cuya producción estuvo regulada por la presencia de bilis en ambas cepas (respuesta) y 17 proteínas que mostraron diferencias en sus niveles de expresión entre la cepa original y el derivado resistente a bilis (adaptación). Para *L. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+, desarrollado en presencia de bilis, se observaron cambios morfológicos en el tamaño y forma de

la membrana celular y disminución de la hidrofobicidad, capacidad autoagregante, capacidad de adhesión a la línea celular intestinal HT29-MTX y persistencia en el intestino. Por otro lado, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+ fue capaz de crecer en presencia de los ácidos biliares taurodesoxicólico, tauroquenodesoxicólico y glicocólico pero no fue capaz de deconjugarlos. Asimismo, este derivado presentó mayor sobrevivencia en fluido intestinal de ratón. Los estudios *in vivo* revelaron que la capacidad de activar la respuesta inmune de la mucosa intestinal también fue afectada, necesitando más tiempo que la cepa original para inducir la misma magnitud del parámetro funcional evaluado (aumento del número de células productoras de IgA en intestino delgado). De esta manera, el proceso de adaptación a bilis de *L. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 indujo cambios deseables y no deseables en la cepa, siendo los estudios *in vivo* los que más aportaron al conocimiento de la capacidad funcional de la cepa, ratificándose su importancia para un conocimiento íntegro y definitivo de los efectos de la adaptación a sales biliares observados *in vitro*.

Summary

Probiotic cultures for dairy products. Response to new technological challenges and strategies to improve strains

In this work both the innovation of the food matrix and the strains used were studied. Firstly, the potential of milk treated by HPH for the production of Crescenza cheese and fermented milk added of commercial probiotic bacteria was evaluated. According to the results obtained, no significant differences among the cheeses were obser-

ved for gross composition and pH. The HPH treatment of milk significantly increased the cheese yield (1%) and positively affected the viability of probiotic bacteria. In relation to fermented milks, the application of HPH to milk did not modify the viability of the probiotic cultures but protected the viability of the starter cultures. The coagula from HPH treated milk resulted significantly more compacted. In relation to the sensory analysis, all the samples received high scores and were considered of high quality.

In the second axis of this Thesis, the progressive adaptation to bile of non-intestinal lactobacilli was studied. Six bile-salts resistant derivatives (5 from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* and 1 from *Lb. acidophilus*), able to grow in the presence of 0.5% (w/v) bile salts, were obtained from 24 bile-sensitive strains. For a strain in particular, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 and its bile-resistant derivative *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+, proteomic, morphological, physiological and functional studies were carried out. The *in vivo* studies were the ones that provided a better knowledge of the functional capacity of the strain, underlying their importance for an integral and definitive understanding of the effects of adaptation to bile salts observed *in vitro*.