

Resúmenes Tesis: Doctor en Ciencias Biológicas

Aplicación de *Panax ginseng* como inmunomodulador intramamario durante el periodo de involución de la glándula mamaria bovina

Dra. Baravalle, Celina

cbaraval@fcv.unl.edu.ar

Director: Ortega, Hugo H.

Co-Director: Calvino, Luis F.

Lugar de realización: Laboratorio, Cátedra y/o Departamento: Laboratorio de Biología Celular y Molecular. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral
Fecha de la defensa: 15 de Marzo de 2011

Resumen

La glándula mamaria bovina es altamente susceptible a nuevas infecciones intramamarias (IIM) durante el periodo de involución; estando el control clásico de estas IIM basado en el uso de antibióticos intramamarios. En la actualidad y como alternativa al uso de estos compuestos que causan efectos perjudiciales tanto para la salud como para la industria láctea, se estudian sustancias inmunoestimulantes o modificadores de la respuesta biológica (MRB), agentes que modifican la respuesta inmune del huésped frente a organismos patógenos.

El objetivo del presente trabajo consistió en describir los efectos inmunomoduladores de una infusión intramamaria de un extracto de *Panax ginseng* (EPg) como MRB analizando parámetros de la inmunidad innata en glándula mamaria bovina al secado. Para ello, se utilizaron 6 vacas no preñadas al final de la lactancia. Ocho cuar-

tos mamarios (unidad experimental) fueron inoculados con 10 ml de EPg (3 mg/ml), 8 con 10 ml de placebo (vehículo solo) y 8 se mantuvieron libres de inoculación (controles). El ordeño fue interrumpido luego de las inoculaciones.

La proliferación celular, expresión de citoquinas (TNF- α , IL-1 α , IL-6) y cuantificación de monocitos-macrófagos en los distintos cuartos mamarios inoculados fueron evaluadas mediante Inmunohistoquímica (IHQ). Por otra parte, muestras de leche fueron colectadas de manera aséptica a distintos tiempos post-inoculación (PI) para la detección de ARNm de citoquinas mediante técnicas de RT-PCR y western blot.

No se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de proliferación de células epiteliales y estromales mamarias entre los tres grupos evaluados. El área inmunomarcada para TNF- α fue significativamente mayor en cuartos tratados con el EPg comparado a cuartos con placebo y cuartos controles. Los porcentajes de áreas inmunohistoquímicamente marcadas para las citoquinas IL-1 α e IL-6 en los diferentes tratamientos evaluados, no mostraron diferencias significativas, aunque si se observó un leve aumento de la expresión de estas citoquinas en cuartos inoculados con EPg comparado con los grupos placebo y controles. Paralelamente, el tratamiento con

EPg mostró un incremento significativo en el número de monocitos-macrófagos durante el periodo evaluado con respecto a cuartos tratados con placebo y a cuartos controles.

Además, se evaluó la producción de TNF- α en secreción mamaria y tejido mamario por western blot. Para el análisis en secreción mamaria, no se detectó la proteína en muestras de placebo. Sin embargo, en cuartos tratados con el EPg se encontraron dos bandas de 17 y 26 kDa a las 24 y 48 hs PI. Además, se observó un incremento significativo en los niveles de la proteína soluble de 17 kDa de TNF- α a las 24 y 48 hs PI en cuartos tratados con EPg comparado con los restantes periodos evaluados. En tejido mamario, se encontró una banda de 26 kDa (proteína de membrana) y una banda de 17 kDa (proteína soluble) en los tres grupos evaluados. Se observaron diferencias significativas en la banda de 26 kDa en cuartos tratados con el EPg comparado con los otros grupos evaluados. Por otra parte, para el análisis de la banda de 17 kDa, si bien, no se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos evaluados, hubo una tendencia en aumento de la expresión de TNF- α en tejido mamario en muestras tratadas con EPg.

Mediante RT-PCR se detectaron ARNm de IL-1 α , IL-1 β , IL-8 y TNF- α en células somáticas provenientes de leche de cuartos tratados con EPg y placebo, en contraste, no se detectaron los ARNm de IL-2, IL-4, IL-6 e INF- γ . Se observó un incremento significativo en la expresión de ARNm de IL-1 α , IL-1 β y TNF- α en cuartos tratados con EPg a las 48 hs PI comparado a cuartos tratados con placebo. Si bien, la dosis de EPg aplicada en el presente trabajo estimuló la expresión de ARNm de IL-8 en células extraídas de la leche a las 24 y 48 hs PI, no se observaron

diferencias significativas entre los dos grupos evaluados en todos los periodos estudiados.

Los resultados obtenidos permiten llegar a las siguientes conclusiones: la inoculación con el EPg en el secado se asoció con el incremento de células somáticas, con la estimulación del influjo y el reclutamiento de monocitos-macrófagos, con la presencia de la proteína TNF- α en leche y tejido mamario, y con la transcripción de ARNm de citoquinas proinflamatorias. Finalmente, se observó que el extracto aquí aplicado (*P. ginseng*) puede ejercer efectos inmunomodulatorios en glándula mamaria bovina y, por lo tanto, podría jugar un papel importante en la activación de las defensas intramamarias para el control de mastitis al momento del secado.

Como complemento a este trabajo de tesis, se desarrolló un método de conteo celular directo como herramienta para la identificación de células somáticas en leche bovina para generar una técnica alternativa a la citometría de flujo (CF). Se utilizaron muestras de leche con diferentes RCS a partir de las cuáles se realizaron extendidos celulares los que se sometieron a IHQ para la detección de diferentes tipos celulares y a CF. Los análisis de correlación entre ambas técnicas demostraron que la técnica de identificación por método directo podría ser útil como alternativa a la CF para muestras con bajos RCS.

Summary

"Application of Panax ginseng as intramammary immunomodulator during bovine mammary gland involution".

The purpose of the study was to describe the immunomodulatory effects of a single intramammary infusion of *Panax ginseng*

as a biological response modifiers (BRM), analyzing parameters of innate immunity on bovine mammary glands at the end of lactation. Eight mammary quarters were infused with 10 ml of *Panax ginseng* extract (PgE), eight were treated with 10 mL of placebo and eight were maintained as uninoculated controls. Cellular proliferation, expression of cytokines (TNF- α , IL-1 α , IL-6) and quantification of monocytes-macrophages cells in mammary tissue were evaluated by immunohistochemistry (IHC). Milk samples were collected at different times for performing SCC (somatic cell count), detection of specific cytokines mRNA by RT-PCR. No significant differences were found in the proliferation percentage in mammary epithelial and

stromal cells among the groups. The immunostaining area for TNF- α and the number of monocytes-macrophages was significantly higher in PgE quarters. The immunohistochemical analysis for the cytokines IL-1 α and IL-6, showed no significant differences for the different treatments. IL-1 α , IL-1 β , IL-8 and TNF- α mRNA were detected in milk in PgE and placebo quarters, in contrast IL-2, IL-4, IL-6 and INF- γ mRNA were not found. A significant increase of IL-1 α , IL-1 β and TNF- α mRNA expression was observed in PgE-treated quarters at 48 h PI. Concluded that *P. ginseng* can exert immunomodulating effects in bovine mammary gland and could therefore play a role in mastitis control at drying off enhancing intramammary defenses.

Estudio comparativo del metabolismo del carbono en autótrofos y heterótrofos. Caracterización de enzimas de diatomeas y sus relaciones evolutivas con otros organismos

Dra. Bosco, María Belén

mbbosco@fbc.b.unl.edu.ar

Directora: Mabel Cristina Aleanzi.

Lugar de realización: Instituto de Agrobiotecnología del Litoral.

Laboratorio, Cátedra y/o Departamento:

Laboratorio de Enzimología Molecular, Cátedra de Bioquímica Básica de Macromoléculas.

Facultad: Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB). Universidad Nacional del Litoral.

Fecha de la defensa: 11 de abril de 2011.

Resumen

La fotosíntesis eucariota comienza con la captación endosimbiótica de una cianobacteria procariontes que realizan fotosíntesis

oxigénica) por parte de un eucariota unicelular heterotrófico. De esto derivan los llamados plástidos primarios (fotosintéticos) encontrados en algas verdes y rojas y en plantas. Las diatomeas son producto de lo que se conoce como endosimbiosis secundaria, en la que un eucariota no fotosintético captó por endocitosis a un eucariota fotosintético con un cloroplasto primario, lo que involucró una transferencia masiva de genes desde el núcleo de la célula fagocitada hacia el de la célula huésped. Esto hizo que en los diferentes organismos se encuentren enzimas que catalizan reacciones similares pero que están reguladas según el contexto metabólico particular al cual son funcionales, por lo que resulta

importante estudiar las relaciones de estructura proteica a función y regulación de estas proteínas. Sin embargo, son marcadamente escasos los trabajos de caracterización de enzimas de diatomeas, por lo que mayoritariamente las propiedades de las proteínas (y las rutas metabólicas en las que están involucradas) sólo han podido ser inferidas parcialmente a partir de comparaciones de secuencias por métodos informáticos.

Las diatomeas son un grupo de algas cromófitas capaces de crecer en agua salada y dulce, aún bajo condiciones extremas de temperatura y salinidad, en forma autótrofa, heterotrófica o mixta. Pese a la relevancia evolutiva, ecológica y productiva, los estudios sobre la biología de las diatomeas, a nivel molecular, están relativamente poco desarrollados. El modelo experimental dentro de las diatomeas es la especie *Phaeodactylum tricornutum*, la cual tiene un genoma relativamente pequeño, un tiempo de generación corto y es factible de ser transformada genéticamente.

Se clonó el gen que codifica para la enzima cloroplastídica fosfoglicerato quinasa-1 de *P. tricornutum* (*PtrPGKasa-1*). La proteína recombinante se obtuvo en forma soluble y activa y fue purificada y caracterizada estructural, cinética y regulatoriamente. Las propiedades estructurales y cinéticas resultaron similares a las obtenidas para PGKasas de otros organismos, mientras que las características regulatorias resultaron distintivas. En este aspecto, *PtrPGKasa-1* resultó regulada por el entorno redox, determinado por compuestos sintéticos y fisiológicos, siendo activa en su forma reducida. Mediante la realización de estudios cinéticos y químicos y la construcción de mutantes simples Cys → Ser, se logró

determinar el rol de cada una de las 6 Cys que presenta *PtrPGKasa-1* y el mecanismo de inhibición por oxidación sufrido por la enzima. Los resultados obtenidos sugieren que la regulación redox de la enzima de la *P. tricornutum* podría ocurrir *in vivo* y ser relevante para el funcionamiento del metabolismo fotosintético en diatomeas. Además, *PtrPGKasa-1* presentó actividad enzimática de chaperona, protegiendo a otras proteínas de desnaturalización.

Por otra parte, se realizaron medidas de actividad enzimática en extractos celulares y de niveles de transcriptos por PCR cuantitativa en tiempo real de la diatomea crecida en condiciones auto y mixotróficas. Al analizar comparativamente los metabolismos de hidratos de carbono operativos, se encontró que el cultivo mixotrófico presentaba un aumento en el flujo metabólico hacia el ciclo del ácido tricarbóxico mitocondrial y una disminución en los procesos cloroplastídicos de fotosíntesis y ciclo de Calvin, mejorando así el rendimiento energético. Además, se vieron aumentadas las reservas de energía en forma de crisolaminarén y lípidos.

Se ahondó en la caracterización de la vía de síntesis del polisacárido de reserva (crisolaminarén). Por un lado, se midió la actividad enzimática *in vivo* de la enzima crisolaminarén sintasa, hallándose que tiene especificidad por el sustrato glucosídico UDP-Glc. Por otro lado, se identificó una UDP-Glc pirofosforilasa funcional en *P. tricornutum*: la proteína de fusión UDP-Glc pirofosforilasa/fosfoglucomutasa (P. ID. 50444), lo que sugeriría que la síntesis de crisolaminarén ocurriría en el citoplasma y el almacenamiento del glucano sería en vacuolas.

Finalmente, se realizaron estudios comparativos de actividades enzimáticas y de nive-

les de transcritos de células de *P. tricornutum* crecidas bajo condiciones oxidantes y no oxidantes. En contacto con H_2O_2 se vieron disminuidos la fotosíntesis y el ciclo de Calvin, responsables de generar especies reactivas del oxígeno y consumir el poder reductor de la célula, respectivamente. Esto hizo que cobrara importancia el ciclo del ácido tricarbóxico en la mitocondria, generando el ATP y el NADPH necesarios para permitir la supervivencia celular y contrarrestar los efectos causados por las especies oxidantes.

En base a los resultados obtenidos en la presente tesis, se presenta un escenario metabólico ocuriente en estos microorganismos. Tal panorama representa un aporte para plantear futuros estudios que permitan una mayor comprensión de las diatomeas a nivel metabólico y molecular.

Summary

Comparative Study of Carbon Metabolism in Autotrophs and Heterotrophs.

Characterization of Diatoms Enzymes and their Evolutive Relations with Other Organisms.

Diatoms are a group of cromophyte algae capable of growing autotrophically, heterotrophically and mixotrophically in sweet and salty water, even under extreme temperature and salinity conditions. *Phaeodactylum tricornutum* is the most widely used model system for studying diatoms because of its

small genome, short generation time and ease of genetic transformation. In this thesis, studies were made on functional, structural and regulatory characterization of *P. tricornutum* phosphoglycerate kinase-1, which resulted in distinctive features when comparing with other organisms enzymes. On the other hand, enzymatic activity of the enzyme responsible of chrysolaminaran synthesis – chrysolaminaran synthase – was measured in vivo, and its glycosyl donor was identified. These results contribute to the knowledge of the chrysolaminaran synthesis pathway, scarcely studied so far. Also, UDP glucose pyrophosphorylase from *P. tricornutum* cells was partially purified and the identification of its sequence was achieved, which allowed us to infer about the reserve polysaccharide synthesis localization. Finally, enzymatic activities of proteins involved in carbohydrates metabolism in diatoms grown under two different conditions were measured. Thus, we have presented an active metabolic scenery in these microorganisms and have identified the operating pathways in cells grown in presence of carbon and nitrogen sources or oxidizing agents. This backdrop represents a contribution for future studies that will allow a bigger comprehension of diatoms at the metabolic and molecular levels and the establishment of evolutionary relationships with other photosynthetic and/or heterotrophic organisms.

Caracterización estructural y funcional de factores de transcripción vegetales involucrados en la respuesta a distintos tipos de estrés abiótico

Dra. Cabello, Julieta V.

jcabello@fbcb.unl.edu.ar

Directora: Dra. Raquel L. Chan

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

Fecha de defensa: 29 de marzo de 2011

Resumen

HaHB1 es un factor de transcripción que pertenece a la familia HD-Zip I de girasol. Los miembros de esta familia, sólo encontrada en plantas, presentan la particularidad de tener un HD asociado a un LZ y los antecedentes bibliográficos indican que su expresión es regulada por efectores abióticos. El objetivo de este trabajo de Tesis fue realizar una caracterización funcional de este factor de transcripción, dilucidar su mecanismo de acción y determinar en qué vías de transducción de señales participa.

La expresión de *HaHB1* es regulada a nivel transcripcional por factores externos como la disponibilidad de agua, las temperaturas bajas y la salinidad del suelo.

Las plantas que lo expresan de forma ectópica y constitutiva presentaron una curva de crecimiento levemente diferente a la de las plantas sin transformar y hojas aserradas cuando fueron crecidas en condiciones normales. Además, fueron capaces de tolerar temperaturas por debajo de los 0 °C en mejor medida que las plantas WT. Con el objetivo de dilucidar el meca-

nismo mediante el cual estas plantas son capaces de tolerar esta condición adversa, se realizaron diferentes ensayos, de los cuales pudo determinarse que la tolerancia se debe, por un lado, a la mayor estabilización de sus membranas plasmáticas y por otro, a la capacidad de las proteínas presentes en el apoplasto de inhibir la re-cristalización de los cristales de hielo.

Un análisis transcriptómico permitió identificar algunos genes que codifican proteínas β -1,3-glucanasas, endo-quitinasas, modificadoras de pared celular y de tipo PR con niveles de expresión aumentados en las plantas transgénicas. Estas proteínas habían sido descritas como proteínas con actividad *antifreeze* en otras especies.

El promotor de *HaHB1* (*PrH1*) se aisló a partir de una biblioteca de origen comercial construida en BACs. Las plantas transformadas con la construcción *PrH1:GUS* permitieron caracterizar el patrón de expresión dirigido por este promotor y compararlo con los estudios de expresión hechos en girasol y las plantas que expresan *PrH1:HaHB1* permitieron caracterizar su fenotipo frente a diferentes condiciones y compararlo con el obtenido con las plantas que lo expresan de forma ectópica y constitutiva. Pudimos observar que estas plantas no presentan diferencias morfológicas cuando se comparan con plantas WT crecidas en condiciones normales. Además, cuando se realizan ensayos de *freezing*, estas plantas toleran mejor esta condición que sus pares WT.

Los resultados obtenidos con el ensayo de microarreglos sugerían que PR2, PR4 y la GLUCANASA podían funcionar como proteínas *antifreeze*. Para determinar si estos genes estaban involucrados en la tolerancia observada en las plantas que expresan *HaHB1*, obtuvimos plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobre-expresan *PR2*, *PR4* y *GLU*. Pudimos observar que estas plantas fueron capaces de tolerar temperaturas por debajo de los 0 °C mejor que sus pares sin transformar y que esta tolerancia podía explicarse por la mayor estabilidad de las membranas plasmáticas en las plantas transgénicas que en las WT.

Debido a que los resultados fueron obtenidos en un sistema heterólogo (gen de girasol en plantas de *Arabidopsis*), nos propusimos encontrar el homólogo de *HaHB1* en *Arabidopsis*. Mediante comparación de secuencias y bibliografía previa podíamos predecir a *AtHB13* como homólogo de *HaHB1*. Para corroborar esta hipótesis, se obtuvieron plantas transgénicas que sobre-expresaban *AtHB13*. El análisis fenotípico de estas plantas indicó que las mismas eran similares a las plantas WT en condiciones normales y que, en presencia de temperaturas bajas, las mismas eran capaces de tolerar esta condición mejor que sus pares sin transformar. A su vez, la expresión de los genes blanco *PR2*, *PR4* y *GLU* fue regulada positivamente en ambos genotipos. Estos resultados permitieron confirmar la hipótesis de que *AtHB13* es el homólogo de *HaHB1* en *Arabidopsis thaliana*.

Finalmente podemos concluir que *HaHB1* participa en el mecanismo de tolerancia a *freezing* mediado por la inducción

de genes que codifican proteínas *antifreeze* que actúan inhibiendo la re-cristalización y estabilizando las membranas plasmáticas, previniendo de esta forma la muerte celular inducida por temperaturas bajo cero.

Summary

Structural and functional characterization of plant transcription factors involved in different abiotic stress responses

Plants deal with cold temperatures via different signal transduction pathways. The HD-Zip I homologous transcription factors *HaHB1* from sunflower and *AtHB13* from *Arabidopsis* were identified as playing a key role in such cold response. The expression patterns of both genes were analyzed indicating an up-regulation by low temperatures. When these genes were constitutively expressed in *Arabidopsis*, the transgenic plants showed similar phenotypes including cell membrane stabilization under freezing treatments and cold tolerance. An exploratory transcriptome analysis of *HaHB1* transgenic plants indicated that several transcripts encoding glucanases and chitinases were induced. Moreover, under freezing conditions some proteins accumulated in *HaHB1* plants apoplasts and these extracts exerted antifreeze activity *in vitro*. Three genes encoding two glucanases and a chitinase were overexpressed in *Arabidopsis* and these plants were able to tolerate freezing temperatures. We propose that *HaHB1* and *AtHB13* are involved in plant cold tolerance via the induction of proteins able to stabilize cell membranes and inhibit ice growth.

Utilización de quimiometría para mejorar el rendimiento de la cromatografía líquida de alta resolución. Aplicación a la determinación de analitos de interés biológica en muestras de composición compleja

Dra. De Zan, María Mercedes

mmdezan@fbc.unl.edu.ar

Director: Dr. Goicoechea, Héctor Casimiro

Lugar de realización: Laboratorio de Desarrollo Analítico y Quimiometría (LADAQ), Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos (LCCM), Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB), Universidad Nacional del Litoral (UNL)

Fecha de la defensa: 26 de agosto de 2011

Resumen

La determinación de sustancias de interés biológico, tales como fármacos, agroquímicos, aditivos alimentarios, compuestos endógenos o metabolitos, que se encuentran presentes en bajas concentraciones en muestras de composición compleja, es un gran desafío para la química analítica moderna. Con el avance de la instrumentación y la informática aplicada, hoy es posible la generación de nuevos métodos de análisis, confiables y seguros, para la determinación de estos compuestos con cada vez mayor selectividad, sensibilidad y rapidez. En este contexto, la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) es una de las técnicas analíticas que está produciendo continuos avances tendientes a mejorar su rendimiento en este tipo de aplicaciones, siendo particularmente su interacción con la quimiometría, una estrategia muy poderosa y promisoría para resolver problemas analíticos de alta complejidad.

En esta tesis se utilizaron diversas herramientas quimiométricas, aplicadas en distintas instancias del proceso analítico, destinadas a alcanzar mejoras significativas en el rendimiento de la cromatografía líquida acoplada a detectores de arreglo de diodo y de fluorescencia.

En el Capítulo 1 se comentan los últimos avances de la CLAR y se describen los métodos y algoritmos quimiométricos capaces de interactuar con ella y contribuir a una mejora de su rendimiento.

En el Capítulo 2 se presenta el desarrollo de un método cromatográfico "indicativo de estabilidad" destinado al control de calidad de cremas dérmicas conteniendo nitrato de miconazol. Para la comprobación de la selectividad de este método se utilizaron metodologías de evaluación de pureza de pico y se aplicaron además, estrictas estrategias de validación basadas en pruebas estadísticas, para demostrar el rendimiento del método según normas internacionales.

En el Capítulo 3 se demuestra la utilidad del diseño experimental para el desarrollo y optimización de los sistemas cromatográficos complejos mediante la realización de un reducido número de experimentos. Se presentan los resultados de la optimización y la validación, logrando excelentes parámetros de rendimiento y cortos tiempos de análisis, en un método para la determinación simultánea de los dos componentes de nicarbazina en premezclas anticocci-

diostáticas utilizadas en la cría de aves de corral. El método cromatográfico utiliza un reactivo de apareamiento iónico para conseguir buenos parámetros de retención del analito 2-hidroxi-4,6-dimetilpirimidina, compuesto de carácter fuertemente básico y polar; y un sistema de gradiente para lograr una rápida elución del analito dintrocarbanilida, de carácter no polar.

En el Capítulo 4 se presenta la aplicación de un algoritmo de calibración de segundo orden: la resolución multivariada de curvas mediante cuadrados mínimos alternantes (MCR-ALS) para resolver problemas de selectividad en la separación cromatográfica, mediante la utilización de la ventaja de segundo orden que permite aislar matemáticamente la señal analítica de los compuestos de interés. Utilizando estrategias diferentes para la aplicación de este algoritmo se logró solucionar distintos inconvenientes, tales como solapamientos de los picos de los analitos, coelución de compuestos desconocidos, identidad espectral entre los compuestos de interés y efecto matriz. El método desarrollado permite determinar con muy alta sensibilidad, mediante la utilización de un detector de fluorescencia, cinco pteridinas presentes en orina en un período muy corto de análisis, por lo que se presenta como una alternativa muy útil en el seguimiento de estos biomarcadores del cáncer.

En el Capítulo 5 se abordó la resolución de un problema analítico muy complejo, tal como la determinación de bajas concentraciones de tetraciclinas como contaminantes en aguas residuales, mediante la utilización de técnicas analíticas sencillas y económicas. Se comprobó la enorme utilidad de los algoritmos de pretratamiento de señales, para realizar, por ejemplo, transferencia de

calibración que permite realizar una calibración sencilla evitando la etapa de preconcentración de los patrones. Por otro lado, la corrección de línea de base fue indispensable en la simplificación de los datos analíticos para eliminar señal de fondo y permitir un buen rendimiento de los algoritmos de calibración. Finalmente se aplicó por primera vez a datos cromatográficos un nuevo algoritmo de calibración de segundo orden mediante la aplicación del método de los cuadrados mínimos parciales seguidos de bilinearización residual (U-PLS/RBL), obteniendo con el mismo un rendimiento comparable al de MCR-ALS.

Summary

Using chemometrics to improve the performance of high resolution liquid chromatography. Application to the determination of substances of biological interest in samples of complex composition

This thesis used a variety of chemometric tools to achieve significant improvements in performance liquid chromatography coupled with diode array and fluorescence detectors.

First, the latest advances in liquid chromatography are discussed and the methods and chemometric algorithms capable of interacting with it are described.

Several developments applied to solve specific problems in industry, medicine and environmental science are then presented.

The peak purity assessment and various validation strategies were used to demonstrate the performance of a new method for the quality control of dermal creams containing miconazole nitrate, that allows evaluate the stability of active ingredients.

The usefulness of experimental design in the development and optimization of complex chromatographic systems was demonstrated in the determination of the components of nicarbazin in anticoccidial premixes.

The application of multivariate curve resolution using alternating least squares (MCR-ALS) was also presented to solve problems of selectivity in the chromatographic separation of five pteridines present in urine in a very short period of analysis, dealing

with different drawbacks: overlapping peaks of the analytes, coelution of unknown compounds, spectral identity between the compounds of interest and matrix effect.

Finally, low concentrations of tetracyclines were determined as contaminants in wastewater using signals pretreatment: calibration transference and baseline correction, to implementing a new second order calibration algorithm: unfolded partial least squares followed by residual bilinearization (U-PLS/RBL).

Patrones de diversidad de aves en Santa Fe y efectividad de las áreas protegidas en su conservación

Dr. Fandiño, Blas

blasfand@hotmail.com

Director: Giraudo, Alejandro

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

Laboratorio, Cátedra y/o Departamento: Facultad de Bioquímica y Ciencias

Biológicas. Universidad Nacional del Litoral

Fecha de la defensa: 10 de Junio 2011.

Resumen

La pérdida de biodiversidad es actualmente uno de los mayores problemas ambientales. La designación de áreas protegidas (AP) ha sido una de las principales acciones de conservación para abordarla, aunque la falta de criterios científicos para su selección ha sesgado su efectividad. Se analizaron patrones de riqueza y biogeográficos de las aves de Santa Fe para priorizar áreas para su conservación y evaluar si las reservas existentes se corresponden con ellas. Se revisó el inventario de aves

de Santa Fe basados en 190167 registros, 88.192 son propios (incluyendo 468 puntos de conteo, 289 en AP y 179 en el resto del territorio provincial y listas no sistemáticas), 517 son ejemplares revisados en museos y el resto obtenidos de la literatura científica. Se evaluaron los registros siguiendo a la Comisión Brasileña de Registros Ornitológicos categorizándolos en: (1) Lista primaria: especies con evidencia documental que permite una determinación confiable (ejemplares, fotografías, grabaciones de voces o videos); (2) Lista secundaria: especies con ocurrencia probable, con registros publicados, aunque sin evidencia documental; (3) Lista terciaria: especies con registros publicados con evidencia documental inválida, o presencia improbable y sin evidencia documental. Se consideró como lista consolidada de Santa Fe a la lista primaria más la lista secundaria. Se dividió Santa Fe en 53 celdas de 0.5 lat-long, para comparar su riqueza total (RE), de especies raras (ER),

amenazadas a nivel global (EAG) y nacional (EAN). Se calculó el valor total de conservación de cada celda usando el método de Rapoport. Se evaluaron áreas de endemismos mediante un análisis de simplicidad de endemismos (PAE) y de complementariedad entre celdas y AP para detectar la mínima cantidad de celdas necesarias para conservar los grupos analizados (RE, ER, EAG, EAN). La lista consolidada de aves de Santa Fe incluye 431 especies (368 de la lista primaria y 63 de la secundaria). Adicionalmente, 17 especies fueron incluidas en la lista terciaria y excluidas de la avifauna santafesina. La curva de acumulación de especies ajustó mejor al modelo Exponencial con una estimación de riqueza total de 439 especies en Santa Fe (IC 95%: 438-460). La riqueza media en las celdas fue de 129 especies (± 54.5 , rango 263-50). La RE en las celdas se correlacionó positivamente con la temperatura, precipitación media, y negativamente con la latitud y longitud. La riqueza de ER, EAG y EAN en las celdas se correlacionó positivamente con la RE. El PAE mostró tres áreas de endemismos, con especies exclusivas, que coinciden con una o dos ecorregiones: (1) Nordeste con 18 celdas, (2) Noroeste con 3 celdas, y (3) Sur con 12 celdas. Se necesitan proteger 16 celdas (30%) para incluir la RE y las ER, 4 para las EAG y 8 para las EAN. Se registraron 240 especies en las AP y las estimaciones indican una riqueza entre 245 (ICE) y 293 (Jack 2) especies. Algunas AP mostraron diferencias significativas en la riqueza media, las 3 AP del Valle del Paraná mostraron la mayor riqueza respecto a la Pampeana, que presentó la menor, mien-

tras que las 2 AP chaqueñas no mostraron diferencias respecto a la Pampeana. Dos de las AP Paranaenses tuvieron mayor riqueza respecto a las AP chaqueñas. Las curvas de rarefacción muestran una significativa menor riqueza en el AP Pampeana, sin diferencias entre el resto de las AP. Ninguna celda que contiene un AP se ubica entre las más ricas en especies detectadas y todas las celdas con AP se ubican en áreas menos ricas en ER. El sistema de AP (SAP) contiene el 55.7% de la avifauna de Santa Fe. Las ER, EAG y EAN estuvieron poco representadas en el SAP con un 6.6%, 21.1% y 16.7% de sus especies, respectivamente. El SAP no se encuentra adecuadamente distribuido en las áreas de endemismo. El área Nordeste contiene 5 AP, la Sur una y la Noroeste ninguna. Respecto a las 16 áreas complementarias para la conservación de aves de Santa Fe, el SAP posee 2 AP en 2 de las 16 celdas, con un orden de prioridad 3 y 9. Las cuadrículas con mayor valor de conservación no poseen AP. Las celdas C6 (Chaco Húmedo y Valle del Paraná), C7 o C13 (Chaco Seco), C38 o C41 (Espinal) y C50 o C52 (Pampeana) son prioritarias para designar AP, sobre la base de los análisis de riqueza, complementariedad y vacíos del SAP, para todos los grupos de especies estudiados. La superficie de áreas protegidas es insuficiente y no están adecuadamente distribuidas en relación con los patrones de diversidad de aves debido a la falta de criterios científicos para su selección. Este problema, sumado a deficiencias de implementación, hace poco efectivo el sistema de reservas de Santa Fe para proteger a su avifauna.

Summary

Diversity patterns of birds from Santa Fe and the effectiveness of the protected areas in its conservation.

The designation of protected areas (AP) is one of the conservation actions to address the biodiversity loss, but the lack of scientific criteria for selection has skewed its effectiveness. In order to address this problem in Santa Fe were analyzed richness and biogeographic patterns of birds to prioritize conservation areas and assess their correspondence with the AP. Santa Fe was divided in 53 grids of 0.5 lat-long (53C). We sampled birds in the 53C and AP, obtained 190167 records. The total richness species (RE), rare species (ER), globally (EAG) and nationally threatened species (EAN) and the total value of conservation, were compared between the 53C. Areas of endemism were

detected by a simplicity analysis of endemism (PAE), and complementarily between the grids and AP evaluating the minimum number of grids that preserve the groups analyzed. The PAE yielded three areas of endemism (Northeast, Northwest and South) and the AP are inadequately distributed in them. In order to protect the RE and ER are required 16 grids, 4 for EAG and 8 for EAN. Only 2 AP are located between the complementary areas for conservation. The grids with the highest conservation value have not AP. The grids C6 (Humid Chaco and Paraná Valley), C7, C13 (Dry Chaco), C38, C41 (Espinal), C50 and C52 (Pampas) are priority for establishing new AP. The small size of the AP and the inadequate distribution of them in relation to patterns of bird diversity make ineffective the system of protected areas for bird conservation in Santa Fe.

Análisis de los mecanismos de expresión de genes que codifican subunidades de la citocromoc oxidasa de plantas

Dr. Mufarrege, Eduardo Federico

mufarrege@fbc.unl.edu.ar

Director: Dr. González, Daniel Héctor / Co-

Director: Dra. Curi, Graciela Cristina

Lugar de realización: Laboratorio, Cátedra y/o Departamento: Laboratorio de Biología Celular y Molecular - Instituto de Agrobiotecnología del Litoral.

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral

Fecha de la defensa: 1 de abril de 2011.

Resumen

En este trabajo de Tesis hemos intentado profundizar en el conocimiento que se posee acerca de los mecanismos de regulación de la expresión génica que gobierna la biogénesis del complejo IV de la cadena de transporte de electrones mitocondrial de plantas. Este complejo está constituido por subunidades proteicas codificadas en los genomas mitocondrial y nuclear. En plantas, las subunidades codificadas en el genoma

nuclear que han sido identificadas hasta el momento son: Vb, Vc, VIa y VIb.

En el presente trabajo realizamos un análisis en profundidad de las regiones promotoras de los genes que codifican las subunidades AtCox6a y AtCox6b, en *Arabidopsis thaliana*.

Los estudios indicaron que el gen AtCOX6a se expresa únicamente en granos de polen, mientras que los tres genes AtCOX6b poseen un patrón de expresión muy similar, principalmente en las regiones meristemáticas del hipocotilo y de la raíz de plántulas de hasta 20 días de desarrollo. En plantas adultas, la expresión se hizo evidente en las venas de la hoja, en la raíz, en los granos de polen y en el receptáculo y el estigma de la vaina.

Una observación minuciosa de las cuatro regiones promotoras puso de manifiesto la presencia de un motivo común entre ellas, previamente reportado en la bibliografía como elemento site II. Este sitio, posee la secuencia 5'-TGGGCC/T-3'. Por medio de un estudio que incluye metodologías de mutagénesis sitio dirigida de estos elementos, ensayos de detección y cuantificación del gen reportero gus y técnicas de electroforesis en geles de retardo (Band Shift), pudimos concluir que estos sitios se encuentran involucrados en la regulación de la expresión de los genes de interés.

Pudimos demostrar, además, que los cuatro genes analizados responden a la etiolación y a la presencia de sacarosa. Adicionalmente, observamos una respuesta de los genes AtCOX6b-1 y AtCOX6b-3 cuando las plantas eran incubadas en presencia de giberelinas (GA3) o citoquininas (6-bencilaminopurina), respectivamente. A partir

de los resultados obtenidos de las distintas experiencias realizadas en este trabajo, resulta evidente el rol de los elementos site II en la expresión de los genes AtCOX6b. La presencia de estos elementos en numerosos genes que componen los complejos involucrados en la respiración aeróbica constituye una fuerte evidencia de la existencia de un control, al menos a nivel transcripcional, que permite una expresión coordinada de aquellas proteínas implicadas en el desarrollo de una función celular común.

Una segunda parte de este trabajo consistió en estudiar el mecanismo mediante el cual ciertos intrones son capaces de participar en el aumento de la expresión génica.

Por este motivo, comenzamos a estudiar algunas proteínas pertenecientes a un complejo conocido como el complejo de la unión entre exones (EJC, por sus siglas en inglés: Exon Junction Complex), caracterizado previamente en mamíferos y *Drosophila*, e involucrado en forma directa con el aumento de la expresión génica mediada por intrones (también conocido como "I.M.E.", por sus siglas en inglés Intron Mediated Enhancement).

Este complejo contiene más de 20 proteínas distintas, de las cuales eIF4A-III, Y14, Mago y MLN51 forman el núcleo tetramérico (core).

En este trabajo se intentó determinar de qué manera se produce la biogénesis del EJC, estudiando en profundidad tres de sus proteínas en *Arabidopsis thaliana*: AtMago, AtY14 y AtPym.

Comenzamos el análisis caracterizando las regiones promotoras de los tres genes de interés, e identificamos la presencia de copias del elemento site II en todos ellos.

Adicionalmente, en el caso del gen AtPYM detectamos la presencia de un intrón ubicado en su región 5'UTR.

La presencia de los elementos site II en varios genes del EJC y su importancia demostrada en este trabajo en tres de ellos, sugiere la existencia de un mecanismo coordinado de expresión génica que permitiría optimizar la biogénesis del complejo.

Por otra parte, algunos de estos genes (entre ellos AtPYM) presentan intrones líderes potencialmente funcionales, lo que sugiere que los mismos posiblemente también estarían involucrados en su expresión y por lo tanto aportarían un mecanismo adicional en su regulación, notoriamente a través del EJC.

Finalmente, las modificaciones post-traduccionales (entre ellas la fosforilación) proveerían de una tercera vía de regulación de algunos componentes del EJC. Este hecho pone de manifiesto la importancia de contar con varias maneras de regular la estructura y función de este complejo, y consecuentemente la expresión de aquellos genes que dependen del mismo.

Summary

Analysis of the mechanisms of expression of genes encoding subunits of cytochrome c oxidase in plants

In this Thesis we tried to deepen the existing knowledge about the regulatory mechanisms of gene expression that governs the biogenesis of complex IV belonging to the electron transport chain of plant mitochondria,

in particular of genes encoding subunits AtCox6a and AtCox6b in *Arabidopsis thaliana*.

Through several techniques, we conclude that a common motif, previously reported in the literature as site II is involved in regulating the expression of the genes of interest.

We could also demonstrate that the four analyzed genes respond to etiolation and to the presence of sucrose. Additionally, we observed a response of AtCOX6b-1 and -3 genes when plants were incubated in the presence of gibberellin (GA3) and cytokinin (6-benzylaminopurine), respectively.

A second part of this work was to study the mechanism by which certain introns are able to participate in increasing gene expression.

For this reason, we began to study some proteins belonging to a complex known as the Exon Junction Complex (EJC): AtMago, AtY14 and AtPym in *Arabidopsis thaliana*.

The presence of site II elements in several genes of the EJC and its importance demonstrated in this work in three of them, suggesting the existence of a coordinated mechanism of gene expression that would allow the complex biogenesis.

Finally, post-translational modifications (including phosphorylation) would provide an additional way of regulation of some components of the EJC. This highlights the importance of several ways to regulate the structure and function of this complex, and consequently the expression of those genes that depend on it.

Intervenciones nutricionales en un modelo experimental de dislipemia y resistencia insulínica. Aplicación de la proteína de soja como estrategia terapéutica

Dra. Oliva, María Eugenia

meoliva@fcb.unl.edu.ar

Director: Dra. Yolanda B. de Lombardo

Co-Director: Dra. Adriana Chicco

Lugar de realización: Laboratorio de Estudios de Enfermedades Metabólicas relacionadas con la Nutrición. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral.

Fecha de la defensa: 28 de marzo de 2011.

Resumen

El Síndrome metabólico, integrado por una constelación de anormalidades tales como diabetes tipo 2, hipertensión, dislipemia, insulino resistencia y obesidad, tiene gran incidencia en la comunidad. Experimentalmente es posible lograr un modelo similar por manipulación dietaria a través de la administración de una dieta rica en sacarina (DRS). Existen pocos trabajos focalizados en el cambio de la fuente proteica de la dieta (de origen animal caseína, por proteínas de origen vegetal: soja), sobre las alteraciones bioquímicas-metabólicas inducidas por la ingesta crónica de una DRS.

Los *objetivos* del presente trabajo de tesis fueron: **1)** Determinar en forma secuencial si una vez alcanzada la dislipemia y resistencia insulínica estable (4 meses de ingesta con una DRS) el cambio del tipo de proteína de la dieta puede mejorar o revertir la dislipemia y la moderada hiper glucemia. Una vez determinado el tiempo más adecuado, se analizaron los siguien-

tes aspectos bioquímicos-metabólicos: **I)**

En tejido hepático se evaluó el contenido de triglicéridos y colesterol; in vivo la velocidad de secreción de triglicéridos hepáticos y remoción plasmática de triglicéridos; enzimas involucradas en la lipogénesis y la expresión de la masa proteica de la proteína de unión al elemento regulador de esteroides (SREBP-1); enzimas involucradas en la oxidación de ácidos grasos y la expresión de la masa proteica del receptor activador de la proliferación peroxisomal-alfa (PPAR- α).

II) En músculo esquelético se analizó en condiciones basales y bajo el estímulo de la insulina (clamp euglucémica hiperinsulinémica): 1) la expresión de la masa proteica del transportador de glucosa GLUT-4, 2) la fosforilación de la glucosa estimada por la actividad de la enzima hexoquinasa y 3) las vías metabólicas no oxidativas y oxidativas de la glucosa.

Los *resultados* del análisis secuencial demostraron que luego de 4 meses de sustitución de caseína por proteína de soja como fuente proteica en la DRS, se logró la normalización de los niveles de triglicéridos, colesterol y glucosa plasmáticos. Además, en tejido hepático se normalizó el contenido de triglicéridos. A partir de estos resultados consideramos que 4 meses, era el tiempo adecuado para analizar algunos mecanismos que subyacen en el mejoramiento o reversión de la dislipemia y homeostasis de la glucosa.

La velocidad de secreción de VLDL-Tg y el contenido hepático de Tg y colesterol fue-

ron completamente normalizados. Además, la adición de proteína de soja aislada disminuyó la excesiva disponibilidad de AGNE plasmáticos presentes en la DRS. La reversión de la dislipemia sugiere que la principal acción de la proteína de soja en el metabolismo lipídico hepático está relacionado con un cambio en el destino metabólico: síntesis y almacenamiento de lípidos a oxidación, y que ambos mecanismos junto con la normalización de la remoción de Tg plasmáticos, contribuyen al efecto hipolipemiante de la proteína de soja. Los resultados obtenidos avalan esta sugerencia, ya que la administración de proteína de soja a la DRS fue capaz de disminuir no solo las incrementadas actividades de las enzimas lipogénicas: acetil CoA carboxilasa (ACC), sintasa de ácidos grasos (FAS), enzima málica (EM) y glucosa-6-fosfato dehidrogenasa (G-6-P DH), sino también la expresión de la masa proteica del SREBP-1. Esto se acompañó de un incremento en la expresión de la masa proteica del PPAR- α y las actividades de las enzimas carnitina palmitoil transferasa-1 (CPT-1) y oxidasa de ácidos grasos (FAO) favoreciendo, a nivel hepático, la oxidación mitocondrial y peroxisomal de ácidos grasos.

Además, la proteína de soja dietaria fue capaz de normalizar la glucemia basal sin cambios en la insulinemia junto con un sustancial mejoramiento de la sensibilidad insulínica periférica global. En el músculo esquelético la proteína de soja dietaria: 1) revirtió la alterada oxidación de glucosa y normalizó el contenido intramuscular de triglicéridos en condiciones basales y frente al estímulo de la insulina. El contenido de glucógeno y glucosa-6-fosfato mostraron un comportamiento similar al de los animales controles

a nivel basal o frente al estímulo de la hormona. 2) Mejoró significativamente la fosforilación de la glucosa (incrementó la actividad de la enzima hexoquinasa). 3) Los niveles basales de la expresión de la masa proteica del Glut-4 fueron similares en todos los grupos experimentales y en presencia de insulina se estimuló la translocación del Glut-4 hacia la membrana plasmática solamente en el grupo control y cuando la fuente proteica en la DRS fue la proteína de soja. Por último, la administración de proteína de soja aislada dietaria previno el incremento de peso corporal asociado a una menor ingesta calórica, mejorando la adiposidad visceral.

En conclusión, la proteína de soja aislada dietaria fue capaz de revertir la dislipemia y la esteatosis hepática y mejorar la sensibilidad insulínica periférica global, mejorando el metabolismo de glucosa en el músculo esquelético. Esto podría ser consecuencia de algunos de los mecanismos analizados en este trabajo. Sin embargo, no podemos descartar que la reducción de la ingesta calórica en los animales alimentados con proteína de soja aislada, podría contribuir en sí misma sobre algunos de los efectos beneficiosos del consumo de esta proteína mencionados anteriormente.

Summary

Nutritional interventions in an experimental model of dyslipemia and insulin resistance. Use of the soy bean protein as therapeutic strategy

Metabolic syndrome, consisting of a constellation of abnormalities such as type 2 diabetes, hypertension, dyslipidemia, insulin resistance and obesity, has a large impact in the community. Experimentally it is possible to achieve a similar model, in biochemical-

metabolic aspects, to this syndrome by dietary manipulation, for example, through the administration of a sucrose-rich diet (SRD).

The results showed that the substitution of casein with soy protein as protein source in SRD, was achieved normalization of the dyslipemia and steatosis hepatic. The soy protein was able to reduce not only the increased activities of lipogenic enzymes but also the protein mass expression of SREBP-1. This was accompanied by a increase of protein mass expression of the transcription factor PPAR- α and the activities of the enzymes CPT-1 and FAO favoring the oxidation of fatty acids. Dietary soy protein was capable of normalizing the basal

glucose with no change in insulinemia. The results show a substantial improvement of the whole-body peripheral insulin sensitivity and improving glucose metabolism in skeletal muscle.

In conclusion, dietary soy protein isolate was able to reverse the dyslipemia and steatosis hepatic and improve whole-body peripheral insulin sensitivity, improving glucose metabolism in skeletal muscle. This could be due to some of the mechanisms discussed in this work. However, we can not exclude that the reduction in energy intake in animals fed soy protein isolate, could help itself in some of the beneficial effects of this protein consumption above.

Alteraciones de la dinámica y biología reproductiva de anuros (Amphibia, Anura) producidos por el avance de la frontera agrícola en ambientes naturales del delta superior del río Paraná

Dra. Sánchez, Laura Cecilia

lauraceciliasanchez@yahoo.com.ar

Director: Dra. Manzano, Adriana Silvina /

Co-Director: Dra. Peltzer, Paola Mariela

Lugar de realización: Centro de Investigaciones Científicas y Transferencia de Tecnología a la Producción (CICYTTP-CONICET), Diamante, Entre Ríos, y Laboratorio de Ecotoxicología, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral (FBCB-UNL), Santa Fe.

Fecha de la defensa: 24 de febrero de 2011.

Resumen

La presente tesis tuvo como objetivos generales: **a)** Estudiar la composición y diversidad de anfibios anuros en áreas cul-

tivadas con soja (agroecosistema) aledañas al Parque Nacional Pre-Delta, así como en dos ambientes del parque, la zona continental (área de transición) y la isleña (área prístina). **b)** Describir aspectos de la ecología relacionados con la reproducción de las especies que componen las comunidades de anuros. **c)** Estudiar las alteraciones en la dinámica y biología reproductiva de anuros producidos por el avance de la frontera agrícola en ambientes naturales del Delta Superior del Río Paraná.

El área de estudio se localizó en el Sudoeste de la provincia de Entre Ríos. Se seleccionaron tres sitios de acuerdo a la proximidad a tierras agrícolas: un campo sembrado con soja (AG: agroecosistema);

un ambiente de bosques nativos sin agricultura pero adyacente a monocultivos, localizado dentro del Parque Nacional Pre-Delta (PNPD) (AT: área transicional); y un sector isleño del PNPD con dominancia de vegetación arbórea y herbácea, preservado del impacto antrópico (AP: área prístina). Los muestreos se realizaron con frecuencia semanal entre la siembra y la cosecha de soja, durante los años 2006-2008. Se utilizaron tres métodos estandarizados para registrar anfibios: trampas de caída, inspecciones nocturnas, y muestreo de larvas. Se consideraron tres variables a escala de paisaje: nivel del río, temperatura del aire y precipitación acumulada.

Se calculó la riqueza, diversidad y equitatividad de anuros en cada sitio. Se evaluó la amplitud del microhábitat en cuanto a tipo de sustrato usado para vocalizar y se analizaron diferencias entre los ambientes en la actividad de canto mensual. Asimismo, se examinó la correlación entre el número de taxones vocalizando por mes y las variables a escala de paisaje. Se estudió la actividad reproductiva de los anuros en el tiempo (meses de estudio) y en el espacio (similitud entre las comunidades reproductivas). Por otra parte, machos adultos de *Rhinella fernandezae* y *Dendropsophus sanborni* fueron recolectados. Se analizaron sus volúmenes testiculares, y luego de procesar histológicamente los testículos, se midió el área testicular, el número de túbulos seminíferos y el área de los mismos. Se contabilizaron los números de cistos hallados para cada estadio espermatogénico. Finalmente, se procedió a la búsqueda de testículos con anomalías, ya sea en su morfología externa o histológica.

Un total de 23 especies de anuros fueron registradas. AG presentó la menor riqueza, junto a los mayores valores de diversidad y equitatividad. AG exhibió la menor cantidad de especies observadas con evidencias de reproducción. Los anuros utilizaron una variada gama de localizaciones y sustratos para las vocalizaciones. Al respecto, algunos anfibios mostraron diferentes valores de amplitud de microhábitat entre ambientes. Adicionalmente, la actividad de canto mensual difirió entre los sitios en 10 de los 22 taxones hallados cantando. El número mensual de especies vocalizando se correlacionó positivamente con la temperatura (en AG, AT y AP) y con la precipitación (en AG y AT). Cinco períodos reproductivos fueron observados y varias especies mostraron variaciones entre ambientes en este parámetro. Estas diferencias podrían deberse a la plasticidad en las estrategias reproductivas en relación a variables ambientales, y a discrepancias entre sitios en cuanto a recursos reproductivos disponibles. Las comunidades reproductivas de anuros más similares fueron las localizadas dentro del PNPD. Por su parte, el análisis gonadal mostró una disminución en el volumen testicular y en el número de túbulos seminíferos por testículo en *R. fernandezae*, así como un aumento de la proporción de testículos con forma irregular en *D. sanborni*, en ambientes con mayor exposición agrícola (AG y AT). En general, en estos dos sitios también se registró una reducción en la presencia de células germinales en relación a AP (*R. fernandezae*: Espermatogonias primarias, Espermatocitos primarios y Espermatidas; *D. sanborni*: Espermatogonias primarias y secundarias), y un mayor número

de anomalías gonadales, tales como túbulos seminíferos pobremente desarrollados y numerosas células pigmentadas. En síntesis, la histoarquitectura y función gonadal en machos de ambas especies denotan un efecto negativo deletéreo del uso de la tierra para agricultura sobre la biología reproductiva de estos organismos.

Se concluye que las prácticas agrícolas alteran la estructura de las comunidades de anfibios de la región. Finalmente, se recomienda el establecimiento de una *zona de amortiguación (buffer)* para el PNPD, con el fin de preservar las especies silvestres y mejorar los valores de conservación del área protegida.

Summary

Alterations of the dynamic and reproductive biology of anurans (Amphibia, Anura) produced by the advance of the agricultural frontier in natural environments in the upper Paraná river delta.

The general aims of this thesis were: **a)** to study the composition and diversity of anuran amphibians in areas cultivated with soybean (agroecosystem) which are adjacent to Pre-Delta National Park (PDNP), and within the park in two environments, the continental zone (transition site) and the island zone (natural forest site); **b)** to des-

cribe features of ecology related to reproduction of the species that composes the anuran communities.; and **c)** to study the alterations in the reproductive dynamic and biology of anurans produced by the advancing agricultural frontier in natural environments of the Upper Delta of Parana River. The three sites investigated were located in the south-western Entre Rios Province and were selected according to proximity to agricultural land. The studies were carried out weekly during the soybean-cropping period, during the years 2006-2008. In order to register amphibians, three standardized methods were used: pitfall traps, nocturnal searches, and tadpole surveys. Differences were found among environments in specific composition, habitat use during vocalizations and reproductive periods. In addition, testicular histoarchitecture and function in males of representative species (*Rhinella fernandezae* and *Dendropsophus sanborni*) denote a deleterious negative effect of land use for agriculture on the reproductive biology of these organisms. In this thesis is concluded that agricultural practices alter the structure of regional amphibian assemblages. Finally, it recommends the establishment of a buffer zone for the PDNP, in order to preserve wildlife and enhance conservation values of the protected area.

Tejido Adiposo: Rol de las Adipocitoquinas (leptina, TNF- α y adiponectina) en la adiposidad visceral. Relación con los ácidos grasos no esterificados plasmáticos, PPARs, resistencia insulínica y estrés oxidativo en un modelo experimental de dislipemia. Efecto de los ácidos grasos n-3

Dr. Selenscig, Dante A.

danselens@hotmail.com

Director: Dra. Bolzón de Lombardo, Yolanda /

Co-Director: Dra. Chicco, Adriana G.

Lugar: Laboratorio de Enfermedades

Metabólicas Relacionadas con la Nutrición.

Departamento de Ciencias biológicas.

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

Fecha de defensa: 15 de abril de 2011.

Resumen

La obesidad es considerada como uno de los factores de riesgo en la constelación de anormalidades que caracterizan al Síndrome metabólico, el cual constituye uno de los mayores desafíos de Salud Pública y de sumo interés en lo que atañe a su prevención y tratamiento. La compleja patogénesis de las anomalías involucradas en el Síndrome metabólico no está completamente dilucidada, sin embargo la interacción entre factores genéticos y ambientales contribuyen indudablemente a su mayor incidencia.

Además de su función tradicional de depósito de energía y principal proveedor de ácidos grasos a la circulación, el tejido adiposo (TA) es un importante órgano secretor, liberando un gran número de adipocitoquinas. Desde una perspectiva "adipocéntrica" se postula que la expansión del TA es un factor importante en el desarrollo del Síndrome metabólico como nexa entre obesidad y

resistencia insulínica. Además, la obesidad se asocia con estrés oxidativo pudiendo producir un desbalance entre los niveles de las especies reactivas del oxígeno.

De lo expuesto, el TA es un tejido clave para esclarecer algunos mecanismos fisiopatológicos involucrados en el desarrollo de dislipemia, resistencia insulínica y diabetes tipo 2 presentes en el Síndrome metabólico. En este contexto el modelo experimental "no genético" de dislipemia, insulino resistencia, hipoleptinemia y adiposidad visceral inducido por una ingesta crónica de una dieta rica en sacarosa (DRS) fue utilizado en el transcurso de esta tesis para desarrollar los siguientes objetivos generales -1. Evaluar aspectos bioquímicos y funcionales del TA que podrían jugar un rol clave en la dislipemia e insulino resistencia inducida por una dieta rica en sacarosa se analizaron: mecanismos que relacionan AGNEs, adipocitoquinas, receptor activador de la proliferación peroxisomal- α (PPAR- α), adiposidad visceral y algunos aspectos del estrés oxidativo. -2. Si el disturbio del metabolismo lipídico a nivel plasmático (incremento de AGNEs y triglicéridos) y tisulares es uno de los factores más importante involucrado en las alteraciones antes mencionadas, evaluamos la posibilidad de mejorar y/o revertir dichas anomalías utilizando cambios nutricionales adecuados: ácidos grasos n-3 de origen marino.

Los resultados del presente trabajo señalan en animales alimentados con DRS: 1) Menor secreción de leptina basal y bajo el estímulo de la insulina (*adipocitos aislados*). 2) Menores niveles plasmáticos de adiponectina que se correlacionan con la alterada sensibilidad insulínica y mayor disponibilidad de AGNE plasmáticos. En *TA epididimal*: 3) Mayor contenido de leptina y del TNF- α . 4) Menor expresión de la masa proteica del PPAR- γ e incremento de la expresión de la masa proteica de la UCP2. 5) Un incremento significativo de la actividad oxidante asociado a una significativa disminución de las actividades de las enzimas antioxidantes. Esto se acompañó de un importante incremento del contenido de glutatión total y un menor estado redox del glutatión, lo que demuestra la disfuncionalidad del TA y su rol clave en la adiposidad visceral en este modelo experimental. 6) La sustitución parcial de la fuente de grasa dietaria -aceite de maíz por aceite de hígado de bacalao (AHB) rico en ácidos grasos n-3 que normalizó la dislipemia y la sensibilidad insulínica fue capaz de mejorar o revertir las anomalías antes mencionadas.

El efecto hipolipemiante del AHB que normaliza la sensibilidad insulínica periférica global, decrece la lipólisis intracelular, e incrementa la captación de glucosa del TA, podría contribuir a la normalización de la secreción de leptina y los niveles plasmáticos de adiponectina en los animales alimentados con DRS. Además, la administración de n-3 PUFAs redujo significativamente el tamaño de los adipocitos haciéndolos más sensibles a la acción insulínica, normalizó la masa proteica del PPAR- γ y el contenido del TNF- α , otra importante adipocitoquina involucrada en el desarrollo de la adiposidad visceral. Por otro lado los AGNEs están

implicados en la activación del estrés oxidativo, no solo desacoplando la fosforilación oxidativa (mayor expresión de la masa proteica de la UCP2) sino también por deteriorar las defensas antioxidantes. El efecto del AHB dietario sobre los niveles de AGNEs redujo a su turno también el estrés oxidativo normalizando la disfuncionalidad del TA.

De todo lo expuesto nuestros hallazgos sugieren que la manipulación de las grasas dietarias podrían jugar un rol clave en el tratamiento de los desórdenes lipídicos, modificando de manera favorable las anomalías metabólicas antes descritas. Si bien nuestros resultados no pueden ser extrapolados en forma directa al humano, el modelo experimental de DRS constituye una excelente herramienta para estudiar diferentes aspectos metabólicos y funcionales del Síndrome metabólico en general y en particular del TA.

Summary

Adipose tissue: Role of Adipocytokines (leptin, TNF- α and adiponectin) in visceral adiposity. Relationship with plasma NEFA, PPARs, insulin resistance and oxidative stress in an experimental model of dyslipidemia. Effect of n-3 fatty acids

Adipose tissue (AT) is a key tissue involved in some pathophysiological mechanisms implicated in the development of metabolic syndrome. *Objectives: 1.* Evaluate biochemical and functional aspects of AT which may play a key role in the insulin resistance and dyslipidemia induced by a sucrose rich diet (SRD) we analyzed: Mechanisms related to FFA, adipocytokines, PPAR-, visceral adiposity and some aspects of oxidative stress. *2.* If the disturbance of lipid metabolism is one of the most important factors involved in the alterations mentioned above, we eval-

uated the possibility of improving and/or reverse these abnormalities by the administration of dietary n-3 PUFAs of marine origin (fish oil). *Results:* in animals fed SRD: 1) Leptin release was reduced both basally and under the stimulus of insulin (*isolated adipocytes*). 2) Lower plasma adiponectin levels were correlated with impaired insulin sensitivity and plasma FFA levels. In AT: 3) High contents of leptin and TNF- α . 4) Reduced PPAR- γ and increased UCP2 protein mass levels. 5) Oxidative enzymes activities increased and *antioxidant activi-*

ties decreased, with an increase in total glutathione levels and lower redox state of glutathione, showing a dysfunctional AT in this experimental model. 6) Partial *substitution* of the source of dietary fat, corn oil by cod liver oil, that normalize the dyslipidemia and peripheral insulin sensitivity, was able to improve/reverse the anomalies mentioned above. *Conclusion:* Our findings suggest that manipulation of dietary fats may play a key role in the treatment of lipid disorders, favourably modify the metabolic abnormalities previously described.

Péptidos antimicrobianos naturales y sintéticos de pieles de anfibios: potenciales aplicaciones en salud humana

Dr. Siano, Álvaro S.

asiano@fcb.unl.edu.ar

Director: Dra. Georgina Tonarelli / Co-Director: Dr. Rafael Lajmanovich

Lugar de realización: Laboratorio de Péptidos Bioactivos. Dpto de Química Orgánica. FCB-UNL y Cátedra de Ecotoxicología. Escuela Superior de Sanidad (ESS). FCB-UNL. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Fecha de la defensa: 27 de Septiembre de 2011.

Resumen

El sistema inmune innato de los anfibios anuros comprende macrófagos, neutrófilos, proteínas del complemento, células natural killer y péptidos antimicrobianos. En respuesta al stress o al ataque de un depredador, las glándulas granulares de los anfibios secretan un complejo cóctel químico que contiene un amplio rango de compuestos

orgánicos bioactivos, tales como aminas, péptidos, proteínas, esteroides y alcaloides.

El objetivo del trabajo de tesis fue avanzar en el conocimiento acerca de la potencialidad de las pieles de los anfibios anuros como nuevas fuentes de péptidos antimicrobianos, y además, aportar información sobre la fauna silvestre local, dado que este tipo de estudios hasta el momento no se ha realizado en la región.

Las siguientes especies de anfibios anuros pertenecientes a las familia Hylidae y Leptodactylidae fueron estudiadas: *Leptodactylus latrans* (L), *L. mystacinus* (Lm), *L. chaquensis* (Lc), *Hypsiboas pulchellus* (Hp), *Scinax nasicus* (Sn), *S. acuminatus* (Sa), *Pseudis paradoxo* (Pp) y *P. minuta* (Pm). Las muestras biológicas fueron obtenidas por extracción con solventes (ES) a partir de las pieles, y por estimulación eléctrica transcutánea (EET) a partir de las glándulas granulares.

Los resultados de los ensayos microbiológicos evidenciaron que las especies LI, Lc, Lm y Hp eran las de mayor interés. Las cuatro especies inhibieron el crecimiento de bacterias Gram (+) y Gram (-), mientras que solamente los extractos de LI y Hp obtenidos por ES inhibieron el crecimiento de la cepa *Mycobacterium tuberculosis* H37rv (MT).

Los extractos de LI obtenidos por ES fueron purificados por HPLC en fase reversa semipreparativa, y las fracciones que mostraron actividad inhibitoria frente a MT, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* fueron analizadas por Espectrometría de masas MALDI-TOF y posteriormente secuenciadas por ESI-MS-MS. Esto permitió la identificación de cinco secuencias, no reportadas previamente en la literatura. Por otra parte, los extractos de LI obtenidos por EET y los dos extractos de Hp fueron analizados en forma directa por HPLC integrado a la espectrometría de masas, identificándose un total de sesenta y cuatro secuencias inéditas [41 de LI (EET), 18 de Hp (ES) y 5 de Hp (EET)].

Sobre la base de estos resultados cinco secuencias fueron seleccionadas y sintetizadas mediante la química Fmoc en fase sólida: P1-LI-1577, P2-LI-1298, P4-Hp-1971, P5-Hp-1935 y P6-Hp-1891. Adicionalmente se sintetizó un péptido híbrido, constituido por la secuencia de ocellatina 5 y de P2-LI-1298, el cual fue identificado como P3-LI-2085. Los análisis predictivos de estructura secundaria de los péptidos P2-LI-1298, P3-LI-2085, P5-Hp-1935 y P6-Hp-1891 indicaron una alta probabilidad de estructura α -hélice, mientras que los otros dos no adoptarían ninguna conformación preferencial.

Entre los análogos α -helicoidales, P6-Hp-1891 y P3-LI-2085 fueron los más activos frente a las cepas de *E. coli* y *S. aureus* ensayadas (P3-LI-2085, CIM: 15 μ M y P6-Hp-1891, CIM: 17 μ M). El análogo P2-LI-1298 presentó mayor actividad antimicrobiana frente a *E. coli* (24.6 μ M) que a *S. aureus* (49 μ M) y P5-Hp-1935 fue el menos activo de todos los péptidos sintetizados. De los dos análogos no estructurados, P4-Hp-1971 fue el más activo frente a *S. aureus* (CIM: 8 μ M) y *E. coli* (CIM: 16 μ M).

Por otra parte, los péptidos P4-Hp-1971 y P5-Hp-1935 inhibieron la enzima butirilcolinesterasa (BChE), por lo cual se considera relevante continuar con estos estudios en el futuro.

El conjunto de los resultados evidencia el potencial de las pieles de anfibios anuros regionales como fuente de productos naturales bioactivos. Por otra parte, y como perspectiva futura, el estudio de la influencia de los factores ambientales que pueden estimular o inhibir la síntesis de los PAMs podría tener un impacto significativo desde el punto de vista ecológico.

Summary

Natural and Synthetic Antimicrobial Peptides from Amphibian Skin. Potential Applications in Human Health

The objective of this thesis was to advance in the knowledge about the potential of the skins of anuran amphibians as new sources of antimicrobial peptides, providing information on local wildlife, since this type of study so far has not been done in the region. Eight anuran amphibian species belonging to Hylidae and Leptodactylidae families were studied: *Leptodactylus*

latrans (Ll), *L. mystacinus* (Lm), *L. chaquensis* (Lc), *Hypsiboas pulchellus* (Hp), *Scinax nasicus* (Sn), *S. acuminatus* (Sa), *Pseudis paradoxa* (Pp) and *P. minuta* (Pm). Two methods were used for the extraction of bioactive components: solvent extraction and transcutaneous electrical stimulation. The extracts of Ll and Hp were analyzed by HPLC-MS-MS, which allowed the identification of a total of sixty nine previously unpublished sequences. Five sequences were selected and synthesized by Fmoc solid phase chemistry: P1-Ll-1577, P2-Ll-1298, P4-Hp-1971, P5-Hp-1935 and P6-Hp-1891. Additionally, a hybrid peptide, consisting of

ocellatine -5 and P2-Ll-1298 sequences was synthesized and identified as P3-Ll-2085.

Among the α -helical analogs, P6-Hp-1891 and the hybrid P3-Ll-2085 were the most active, inhibiting equally both bacterial strains. P2-Ll-1298 analog showed higher antimicrobial activity against *E. coli* and P5-Hp-1935 was the least active of all synthesized peptides. P4-Hp-1971 was the most active unstructured peptide. Moreover, peptides P4-Hp-1971 and P5-Hp-1935 inhibited the enzyme butyrylcholinesterase (BChE).

The results demonstrated the potential of regional anuran amphibian skins as a source of bioactive natural products.

Exposición ocupacional a los Agroquímicos. Evaluación del Daño Genético y su relación con procesos de Estrés Oxidativo

Dr. Simoniello, María Fernanda

fersimoniello@yahoo.com.ar

Director: Prof. Dra. Marta

Ana Carballo / Co-Director: Prof. Bioq. Elisa Carlotta Kleinsorge

Lugar de realización: Cátedra de Toxicología, Farmacología y Bioquímica Legal.

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

Fecha de la defensa: 1 de Julio de 2011.

Resumen

Aunque el uso de plaguicidas es necesario, resulta fundamental evaluar los riesgos para la salud en los seres humanos que están profesional y/o ambientalmente expuestos a estos agroquímicos. Esta exposición puede ocurrir durante la preparación de la mezcla, en el procesamiento de

carga y/o lavado de los equipos de fumigación y en el momento de su aplicación.

El objetivo de este trabajo de Tesis fue utilizar un conjunto de biomarcadores para evaluar el daño inducido por la exposición de humanos a mezclas simultáneas de plaguicidas empleados en los cultivos de la región Centro-Norte de la provincia de Santa Fe, con el fin de estudiar los posibles mecanismos involucrados en su toxicidad y su relación con aspectos laborales de la población en estudio.

Se evaluaron dos poblaciones de trabajadores expuestos a mezclas de plaguicidas:

a) 105 trabajadores rurales y aplicadores del cordón hortícola del departamento La Capital (Santa Fe, Argentina) y 112 donantes como grupo control; b) 48 aplicadores de plaguicidas en cultivos extensivos que

trabajan en los departamentos San Cristóbal, Las Colonias, San Javier, Garay (Santa Fe, Argentina) y 50 sujetos que conformaron el grupo control. La valoración del daño generado por exposición directa a mezclas de pesticidas se realizó mediante el empleo de biomarcadores enzimáticos (Butirilcolinesterasa y Acetilcolinesterasa), de estrés oxidativo (Catalasa, relación glutatión reducido vs. oxidado y lípido peroxidación) y de daño al ADN (Ensayo cometa, de Reparación, daño oxidativo al ADN y Micronúcleos).

Los resultados mostraron inhibición de las enzimas colinesterasas, alteraciones en el estado oxidativo en los trabajadores expuestos respecto a los controles, que se correlacionó con el daño al ADN. La antigüedad laboral y el uso de equipo de protección (EPP) fueron factores que demostraron estar relacionados con el daño observado en ambos tipos de cultivos. Los resultados obtenidos para cada uno de los biomarcadores fueron analizados en función de las mezclas que utilizaron los trabajadores durante la última semana. Las mezclas con mayor cantidad de principios activos fueron las que mostraron los valores extremos en la mayoría de los biomarcadores.

Las variables cuantitativas fueron dicotomizadas (0 y 1), con las variables tanto cualitativas como cuantitativas dicotomizadas se realizó la matriz de similaridad para observar la relación entre todas las variables, lo que permitió caracterizar a los grupos evaluados. Los aplicadores de cultivos intensivos son los que: preparan mezcla, usan el EPP, trabajan más hs, son jóvenes, tienen la primaria completa, no fuman, consumen alcohol. Los trabajadores rurales de cultivos intensivos: tienen mayor edad, son la mayoría mujeres, fuman y no preparan

mezcla, usan algún EPP y consumen alcohol. Para el grupo de aplicadores de cultivos extensivos, los biomarcadores alterados se relacionaban con los trabajadores con mayor edad, estudios secundarios incompletos y una prolongada residencia en la zona, el hábito de fumar y consumir alcohol, el no uso del EPP, la antigüedad laboral y las pulverizaciones aéreas.

La determinación de Odds Ratio (OR) permite reconocer diferentes parámetros como factores de riesgo o de protección de una exposición, además de identificar la magnitud de la asociación. El tiempo de residencia, el aplicar plaguicidas, el uso del EPP y la antigüedad laboral marcaron diferencias cuantitativas en algunos biomarcadores del grupo hortícola. OR en el grupo de aplicadores extensivos mostró aumentos en el marcador de daño oxidativo al ADN cuando se utilizó el uso de EPP como factor y para los micronucleos en mucosa bucal. Los mismos marcadores presentaron en OR incrementos cuando se consideró antigüedad como factor.

Como conclusiones: La exposición laboral a plaguicidas, tanto en cultivos intensivos como extensivos de la región Centro-Norte de la provincia de Santa Fe, es la principal fuente de estrés oxidativo y daño al ADN en individuos expuestos. La ausencia del uso de medidas de protección durante la manipulación de plaguicidas, la antigüedad laboral y las distintas mezclas utilizadas, son factores fundamentales determinantes del impacto de la exposición. Por lo tanto: a) se debe recomendar a los agricultores el uso de medidas de protección durante todo tipo de manipulación de plaguicidas; b) se propone que los individuos expuestos sean monitoreados de manera

frecuente para minimizar o reducir potenciales efectos dañinos de los pesticidas en el ADN; c) se debe continuar con la evaluación de los riesgos asociados con la exposición a pesticidas en la población expuesta de nuestro país.

Summary

Occupational exposure to agrochemicals. Genetic damage assessment and its relationship to oxidative stress.

Although the use of pesticides is necessary, it is important to assess health risks for humans that are professional and/or environmentally exposed to these chemicals.

The aim of this study was to apply a set of biomarkers for the evaluation of damage induced in humans exposed simultaneously to different pesticide mixtures in North-Central region of Santa Fe province, in order to study possible toxicity mechanisms and its relationship with labor aspects of the studied population.

Two different populations of workers were evaluated: a) 105 farm workers and applicators from the horticultural cord of 'La

Capital' department (Santa Fe, Argentina) and 112 donors as control group, b) 48 pesticide applicators working in extensive crops in San Cristobal, Las Colonias, San Javier and Garay departments (Santa Fe, Argentina) and 50 subjects comprising the control group.

The assessment of damage generated by direct exposure to pesticide mixtures, was carried out through oxidative stress, DNA damage and enzymatic biomarkers in peripheral blood. The results showed alterations in oxidative status which correlated with DNA damage in exposed workers. Factors such as labor length and the use of protective equipment were found to be related with the observed damage.

In conclusion: a) farmers should be advised to use protective measures during all activities that imply pesticide handling, b) individuals under exposure risk must be monitored frequently to minimize potentially harmful effects of pesticides on the DNA, c) the evaluation of population risks associated with pesticide exposure in our country should proceed.

Análisis de la Expresión de los Genes *bcr-abl* y *hoxA9* en Leucemia Mieloide Crónica

Dr. Tedeschi, Fabián A.

tedeschi@fbc.unl.edu.ar

Director: Dr. Fabián Esteban Zalazar,

Lugar de realización: Laboratorio, Cátedra

y/o Departamento: Práctica Profesional

de Bioquímica. Facultad de Bioquímica

y Ciencias Biológicas. Universidad

Nacional del Litoral

Fecha de la defensa: 13 de junio de 2011

Resumen

La Leucemia Mieloide Crónica (LMC) es un desorden maligno de las células madre hematopoyéticas, caracterizada por la presencia del cromosoma Filadelfia -producto de la translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22- que genera la fusión de los genes *bcr* y *abl*. La proteína química codificada resultante presenta propiedades

“leucemogénicas” con un rol importante en la progresión de la LMC. Por lo general la LMC sigue un curso evolutivo bi- o trifásico, con un primer estadio en el cual la patología puede ser controlable y desde el cual, en algunos casos por fallas en el tratamiento o causas de origen desconocido, evoluciona invariablemente hacia una fase terminal o crisis blástica que recuerda en sus signos y síntomas a una Leucemia Mieloide Aguda. Aún sigue sin dilucidar completamente los mecanismos moleculares que llevan a esta progresión, pero se está en la búsqueda e identificación permanente de posibles genes candidatos que con su perfil de expresión sean útiles ya sea para el seguimiento y monitoreo de la enfermedad o para el desarrollo de fármacos capaces de revertir o curar a pacientes con LMC. EN este sentido, este estudio tuvo como objetivo analizar cambios en los niveles de expresión de 3 genes (*bcr-abl*, *hoxa9* y *junB*) en distintos estadios de la LMC, por RT-PCR semicuantitativa, expresando y normalizando los valores en relación al gen control *c-abl*.

A diferencia de los estudios previos de otros investigadores que han estudiado los niveles de *hoxA9* en pacientes con LMC en muestras únicas, en nuestro caso las muestras fueron extraídas desde el mismo paciente en dos fases distintas del curso de la enfermedad. Para el total de pacientes analizados se calculó el Índice de Sokal, que se utiliza con fines pronósticos y valora: edad, tamaño del bazo, número de plaquetas y porcentaje de blastos en sangre periférica. Teniendo en cuenta este índice se clasificaron a los pacientes en 2 grupos de riesgo: Bajo (A) e Intermedio/Alto (B). En primera instancia, realizamos un análisis cua-

litativo a fin de determinar, en los pacientes seleccionados, el tipo de rearreglo molecular *bcr-abl* presente. Del total de pacientes analizados, un 60 % expresaban el transcrito *b2a2*. Por otra parte, el rearreglo *b3a2* se detectó en el 30% de los pacientes. Ambos rearreglos se amplificaron simultáneamente en el 10% restante. El tipo de rearreglo hallado en cada una de las muestras, no mostró ninguna correlación con el Índice de Sokal calculado. El paso siguiente fue el de evaluar la expresión simultánea de los genes *bcr-abl* y *hoxA9*. El grupo de pacientes con los índices de Sokal más elevados (B), presentó niveles de expresión del gen *bcr-abl* 1.8 veces mayores a los del grupo de pacientes con mejor pronóstico (A) ($p < 0.05$). Una situación similar se observó para el gen *hoxA9*, para el cual encontramos niveles de expresión 2.8 veces superiores en el grupo con Índice de Sokal intermedio/alto, respecto del grupo de mejor pronóstico. No se encontró ninguna relación entre la expresión relativa de *hoxA9* (y *bcr-abl*), y el tipo de transcrito expresado (*b2a2* o *b3a2*); tampoco hubo diferencias significativas en la línea de base de la expresión de *hoxA9* entre los distintos pacientes estudiados. De manera significativa, un paciente que mostró la mayor relación *hoxA9/abl*, rápidamente ingresó en crisis blástica presentando un doble rearreglo *bcr-abl*, con evolución clonal 47XY,t(9,22),+8 y su deceso se produjo cinco meses después. Además, pudimos observar que la expresión de *junB* fué detectable en todos los pacientes clínicamente estables y sin cambios en sus niveles de expresión. Por otra parte, transcritos de *junB* no fueron detectables (en 8 de 13 pacientes) o expresados con niveles muy bajos en pacientes con

peor pronóstico. En consecuencia, nuestros resultados podrían alentar la posibilidad de evaluar la participación de *hoxA9* como regulador negativo de este importante modulador de apoptosis celular. Llegado este punto, hay que destacar que ya varios autores han resaltado que *HoxA9* podría desempeñar un papel importante en el desarrollo o en el mantenimiento del estado leucémico en pacientes con LMC y se ha sugerido que esta proteína podría cooperar con *BCR-ABL* en la transformación de células de médula ósea. A pesar de esto, aun resta conocer de qué manera esta proteína estaría interactuando en las diversas cascadas de represión o activación de sus probables genes blanco. A la luz de los trabajos que indican que la expresión génica de *HoxA9* se mantiene en niveles relativamente constantes a lo largo de la vida adulta, y aunque el locus de *hoxA9* suele presentar mutaciones frecuentes y que –a su vez– su expresión está sujeta a una regulación compleja, cambios en los niveles de expresión en pacientes con LMC, tal como los observados en este trabajo, podrían sugerir la participación de este gen en la progresión de la patología. Aunque se necesitan más estudios para establecer conclusiones que afiancen estas consideraciones teóricas, estos resultados aportarían información adicional sobre los cambios en los niveles de expresión de genes relevantes en la progresión de la LMC

Summary

Analysis of bcr-abl and hoxA9 Gene

Expression in Chronic Myeloid Leucemia

Chronic myeloid leukemia (CML) results from the neoplastic transformation of a haematopoietic stem cell. The hallmark genetic abnormality of CML is a t(9;22)(q34;q11) translocation, which generates the *bcr-abl* fusion gene and a quimeric protein (BCR-ABL), pivotal in the development of the disease. Typically, after several years, the chronic phase of the disease evolves to a rapidly fatal blast crisis although the molecular mechanisms that underlie BCR-ABL-mediated transformation are poorly understood. Other gen that seems to be involved in myeloid transformation is *hoxA9*, key regulator in hematopoiesis, inducing stem cell spreading and blocking of myeloid differentiation. In addition, the *junB* gene seems to be downregulated by HOXA9. In the present work, we have analyzed the co-expression of the *bcr-abl*, *hoxA9* and *junB* genes in the follow-up of patients with CML. When the results were expressed in relation to *abl*, two different situations were found: (a) patients clinically stable at second sampling, with low relative risk at diagnosis (low Sokal's score), did not show significant differences in both *bcr-abl* and *hoxA9* levels in the sequential samples analyzed, and (b) patients with poor prognosis (showing intermediate or high Sokal's score at diagnosis) had increased expression of *bcr-abl* as well as *hoxA9* genes and decreased *junB* expression. Since *HoxA9* gene expression remains at relatively constant levels throughout adult life, our results could reflect actual changes in the expression rate of *hoxA9* y *junB* which could be useful as prognosis factors during the progression of CML.

Resúmenes Tesis: Maestría en Didáctica de las Ciencias Experimentales

Las nuevas tecnologías como complemento al trabajo en el aula

Mg. Müller Daniela

dmuller@fca.unl.edu.ar

Director: Mg. Adriana Engler

Lugar de realización: Facultad de Ciencias Agrarias. Matemática I
Facultad de Ciencias Agrarias-
Universidad Nacional del Litoral-
Esperanza, Santa Fe

Fecha de la defensa: 7 de diciembre de 2011

Resumen

La Matemática es una barrera difícil de superar para los alumnos que deben enfrentarla en el primer año de su carrera universitaria. En general, representa una "asignatura-problema" y alrededor de ella se genera mucho temor, producto de numerosos fracasos, de incompreensión de lo estudiado, de no hallar el sentido de su aplicación, de los rendimientos relativamente bajos.

De acuerdo a la experiencia como docente de la Facultad de Ciencias Agrarias, muchos de los alumnos ingresantes a Ingeniería Agronómica presentan dificultades para abordar distintos tipos de textos y carecen de estrategias de aprendizaje que los conduzcan a establecer relaciones, comparaciones, interpretaciones, fundamentaciones, argumentaciones y ejemplificaciones. Esto se advierte en la dificultad de interpretación de consignas en las evaluaciones escritas y en el manejo del material bibliográfico. También se observa en ellos, una escasa transferencia de conocimientos a nuevas situaciones y una mar-

cada disociación entre los conceptos teóricos y las aplicaciones prácticas. Todo esto se traduce en resultados poco satisfactorios en evaluaciones parciales y finales que constituyen un aspecto negativo que, en muchos casos, los conduce a adoptar una actitud de mínimo esfuerzo o de rechazo hacia la matemática.

Por otra parte, todo el sistema educativo, así como nuestra práctica docente, se ven impactados por el desarrollo y la presencia de las nuevas tecnologías. La creciente introducción de los recursos tecnológicos en los procesos de enseñanza y de aprendizaje de la matemática, ha generado nuevas posibilidades para mejorarlos y enriquecerlos. En el desarrollo de distintas actividades matemáticas, se considera que cuanto más amplias, variadas y complejas sean las relaciones que se establezcan, mayor será la capacidad de utilizar los conceptos implicados, en situaciones cotidianas, en la construcción de nuevos significados y en el establecimiento de nuevas relaciones.

A partir de esto se planteó la posibilidad de crear un escenario diferente para el aprendizaje, donde la interacción con el alumno se encontrara mediada por otras propuestas de enseñanza que, a través de diferentes tipos de materiales educativos y utilizando las nuevas tecnologías, propiciara la adquisición y la construcción del conocimiento de manera flexible y autónoma. De este modo, para los alumnos que presentaron las dificultades enunciadas y que no

lograron regularizar o aprobar Matemática I en el primer cuatrimestre del año 2009, bajo una metodología de investigación acción, se diseñó e implementó una experiencia utilizando un modelo mixto de aprendizaje que combinó actividades presenciales con otras virtuales. De los contenidos de Matemática I, para el desarrollo de este trabajo sólo se consideró el bloque *Funciones*. Las sesiones presenciales se complementaron con la resolución de guías de estudio que los alumnos resolvieron utilizando el software *Funciones para Windows*. Para las actividades virtuales se configuró la plataforma Moodle de la Universidad Nacional del Litoral (<http://entornovirtual.unl.edu.ar>).

Para llevar adelante la propuesta, se trabajó en profundidad en el diseño y elaboración de las actividades presenciales y virtuales de manera tal que resultaran variadas, de diferente complejidad y que abundaran en contenido, tratando de enriquecer sus posibilidades y de promover la reflexión sobre lo aprendido. En las mismas se procuró que favorecieran el aprendizaje, que resultaran adecuadas al entorno donde se utilizarían y que en particular, promovieran el uso de diversos registros de representación.

De los resultados obtenidos, se considera que las actividades desarrolladas en la plataforma virtual enriquecieron las sesiones presenciales, generando nuevos escenarios de intervención didáctica, logrando acciones y estrategias propias de las clases presenciales y también de otro espacio que permitió extender las actividades más allá del aula. También, la incorporación del recurso informático y de las nuevas tecnologías al aula de Matemática, mejoró la actitud de los alumnos frente a esta asignatura y a todas las actividades que se pro-

pusieron. Sería también deseable que este cambio se tradujera en mejores rendimientos académicos. Sin que esto desanime la tarea realizada, persistiendo en mis convicciones y apostando a un producto de excelencia, considero que el cambio se dará posteriormente en todos los órdenes.

Summary

New technologies as a complement to the work in the classroom

The main problems of the students who enter to the university are learning difficulties, low academic performance, insufficient knowledge, poor transfer to new situations and negative attitude to mathematics.

Moreover, the use of new technologies to complement classroom activities, are increasingly frequent. One of the emerging possibilities is the creation of innovative learning environments to help students access the content and its representations.

Reflecting on the proper use of these spaces in specific contexts and processes of teaching and learning, as appropriate to the learning needs of students, to support their cognitive processes, it was decided to develop an innovative approach to teaching mathematics in Agricultural Engineering to include the integration of new technologies. Was implemented an experience in a blended model, which combined classroom activities with other virtual activities. For the development of these was considered that resulted varied, of varying complexity and content, trying to promote reflection on learning.

From the results, it is considered that the activities in the virtual platform enriched the classroom sessions, generating new scenarios of intervention in the classroom tea-

ching, managing own actions and strategies of classroom and other space that allowed extending the activities beyond the walls of the classroom.

Also, the incorporation of new technologies into the classroom of Mathematics,

improved the attitude of the students deal with this subject. It would also be desirable that this change translate into better academic achievement. Without discouraging the work done, persisting in my convictions, I think the change will in all orders.

Hacia un aprendizaje significativo de los test de hipótesis en las ciencias experimentales

Mg. Walz, María Florencia

fwalz@fbc.unl.edu.ar

Director: Mg. Elena Teresita Fernández de Carrera.

Lugar de realización: Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad Autónoma de Entre Ríos. Cátedra: Introducción a la Bioestadística del Profesorado en Biología.

Fecha de la defensa: 16 de Agosto de 2011.

Resumen

La Estadística nace como una rama de la Matemática con fuertes raíces en su lógica de razonamiento. Sin embargo, actualmente, es una disciplina ampliamente difundida en todas las áreas, y se ha convertido en la herramienta fundamental del método científico. Surge así, la necesidad de introducir Estadística, como asignatura, en todos los espacios curriculares de carreras universitarias, independientemente del perfil u orientación de la misma. Por lo que debió ser adaptada y transpuesta para los distintos casos, especialmente, para aquellos cuyo eje troncal fueran las Ciencias Experimentales y Sociales (entre otras); en las que el alumnado posee poco entrenamiento y uso de la estructura del pensamiento duro,

abstracto o inductivo, dando origen a la Estadística Aplicada.

De la Estadística Aplicada, uno de los temas inferenciales, ampliamente aplicados, es "Test de Hipótesis". El rol que éstos tienen en los diseños empíricos es muy importante; sin embargo, no siempre, quienes los emplean poseen una adecuada comprensión del concepto. Importantes autores coinciden en que esta herramienta es la peor comprendida y de la que más se ha abusado en toda la Estadística; lo que revela la existencia de un conocimiento no significativo de los Test de Hipótesis haciendo un uso de los mismos en forma pragmática que, potencialmente, podría perjudicar a la conclusión o discurso científico.

Considerándose los posibles obstáculos en el aprendizaje del concepto y las distintas metodologías de enseñanza del mismo, se plantea la siguiente hipótesis: La intensificación de la enseñanza de los conceptos *Población* y *Muestra* y de las nociones derivadas de ellos: *Parámetros* y *Estimadores*, a través de simulaciones y resolución de problemas reales, mejoran el aprendizaje significativo del tema Test de Hipótesis Estadístico.

Metodología: Se trabajó con los alumnos de las cohortes 2005 y 2006 del Profesorado en Biología de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad Autónoma de Entre Ríos. La cohorte 2005 conformó la muestra "Control" y la cohorte 2006 la muestra "Experimental". Al grupo "Control" se le dictó la asignatura *Introducción a la Bioestadística* según la metodología y planificación seguida hasta el año 2004, mientras que para el grupo "Experimental" se efectuaron modificaciones en ambos aspectos. En la planificación se reestructuraron los contenidos, la profundidad de los mismos y la carga horaria asignada a las distintas unidades y en la metodología se incentivó al alumno mediante la simulación y resolución de problemas reales (específicamente diagramados para la orientación biológica) y se implementó una actividad tipo investigativa, que debía realizar el alumno, para el tema *Muestra y Población (Parámetros y Estimadores)*. El tema Test de hipótesis se desarrolló, en ambas cohortes, con la misma metodología de enseñanza e idéntica planificación de carga horaria y contenidos.

La evaluación de la comprensión significativa de los Test de hipótesis se realizó, en ambas cohortes, mediante el análisis cuantitativo y cualitativo de la resolución de un mismo ejercicio aplicado sobre el tema. Para el análisis cuantitativo se confeccionó una grilla en la cuál, cada pregunta del problema, encerraba diferentes opciones de respuestas y se estimaron las distintas proporciones, que luego fueron comparadas mediante pruebas J_i cuadradas. En el análisis cualitativo se evaluó la calidad de las respuestas, en el sentido de ver si se evidenciaba la representación del significado del concepto.

Resultados: La proporción de alumnos que evidenció mejor comprensión, por mejor resolución práctica del problema en más de la mitad de los conceptos involucrados en los *Test de hipótesis*, fue estadísticamente mayor en el grupo Experimental. La calidad de las respuestas, especialmente relacionada a la comprensión del grado de incertidumbre involucrado en las conclusiones a las que se arriban con los test de hipótesis, fue superior en el grupo experimental.

Conclusión: Podría aceptarse que las modificaciones propuestas en el programa y las estrategias didácticas incorporadas en la planificación de la asignatura influyen positivamente en el desarrollo y aplicación de la psicología y filosofía del pensamiento estadístico inferencial, con su consecuente comprensión acabada de los objetos que componen el tema.

Summary

Towards a meaningful learning of hypothesis testing in the experimental sciences.

Statistics has becoming the essential tool of the scientific method. Thus, the need arises to introduce Statistics as a subject in all the curriculum units of academic majors. Therefore, Statistics had to be adapted, especially for those whose backbone were the Social and Experimental in which the student body has little training of the inductive and hard thinking, resulting in Applied Statistics. In which, one applied topics is the "Hypothesis Test". Considering the possible obstacles in the concept learning and its different teaching methodologies the following hypothesis is suggested: The enhancement in the teaching of the Concepts of Population and Sample, and the notions that are derived from them: Parame-

ters and Estimators –through the resolution of real problems improve the significant learning of the Statistical Hypothesis Test topic.

It has been worked with two cohorts from the Teacher Training in Biology. The 2005 cohort made up the “Control” sample, and the 2006 cohort the “Experimental” sample. The “Control” was given the subject Biostatistics according to the traditional methodology, whereas modifications in scheduling, contents and depth and works load were introduced for the “Experimental”. The methodo-

logy, included the simulation and resolution of real problems and a field activity.

It was observed that the proportion of students that demonstrated a better understanding in more than half of the concepts involved in the Hypothesis Tests was statistically larger in the Experimental group. Hence, it could be accepted that the modifications suggested and the teaching strategies incorporated positively influence meaningful learning of the subject.

Implementación de Miniproyectos de Investigación: Una forma no convencional en los Trabajos Prácticos de Práctica Profesional Bioquímica

Mg. Pawluk, Diana B.

dbpawluk@fbc.b.unl.edu.ar;

dbpawluk@yahoo.com.ar

Director : Dr. Fabián Esteban Zalazar

Co-Directora: Dra. Plaggio, María Virginia

Lugar de realización: Laboratorio Práctica Profesional. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral

Fecha de la defensa: 11 de agosto 2011.

Resumen

La *propuesta pedagógica* de este trabajo consistió en implementar un trabajo práctico (TP) innovador, no estructurado, mediante el desarrollo de pequeños proyectos de investigación o “miniproyectos” con finales abiertos aplicando técnicas de Biología Molecular en el Laboratorio de Análisis Clínicos. Dado que, en los tiempos actuales, la educación asigna una particular relevancia al campo del conocimiento acti-

tudinal en la currícula de las carreras universitarias, evaluamos el impacto sobre las actitudes que experimentaron los alumnos al realizar una actividad práctica no estructurada (*Grupo Ensayo*), en comparación con la de alumnos que hicieron una actividad práctica tradicional (*Grupo Control*). Esta experiencia se desarrolló durante los trabajos prácticos de la Sección Parasitología y Micología de Práctica Profesional, última asignatura de la carrera de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral. Para evaluar las actitudes desarrolladas por los alumnos, se efectuaron observaciones directas, encuestas y cuestionarios de tipo abierto y cerrado, revelándose en éstos una actitud positiva hacia la realización de un trabajo práctico no estructurado. Esta impresión subjetiva fue confirmada desde una *perspectiva cuantitativa* al aplicarse dos instrumentos de medición: *Diferencial Semántico* y *Escala*

Likert, aplicados a un grupo de 46 alumnos durante tres cuatrimestres de cursado de la asignatura (2004-2005). Ambos instrumentos abarcaron ítems que se correspondieron con las siguientes dimensiones: 1. *Espíritu crítico (opinión)*; 2. *Interés*; 3. *Confianza*; 4. *Participación, compromiso, responsabilidad*; 5. *Motivación*; 6. *Agrado o desagrado*.

Del análisis de los resultados, se pudo inferir que los alumnos que participaron en la realización de un TP como miniproyecto de investigación demostraron mayor tendencia hacia actitudes favorables y buena disposición hacia actividades prácticas innovadoras en comparación con el Grupo Control.

La intervención de los alumnos en la resolución de situaciones problemáticas planteadas por el docente, les permitió relacionar los contenidos, manifestar sus conocimientos preexistentes y confrontarlos con las nuevas experiencias de aprendizaje, en este caso el diseño de miniproyectos.

La implementación de esta estrategia de trabajo con finales abiertos permitió a los alumnos desarrollar su capacidad de iniciativa, creatividad, autonomía, espíritu crítico y el trabajo participativo de equipo en la nueva actividad propuesta. Se observó que los alumnos mediante la búsqueda e indagación lograron salir de la pasividad en sus aprendizajes, tuvieron mayor libertad de expresión y autonomía con respecto a los TP tradicionales. A modo de conclusión y desde un enfoque constructivista, los alumnos se convirtieron en sujetos activos durante su proceso de aprendizaje.

Summary

Implementation of mini research projects: a non conventional way of practical work in the Clinical Biochemistry Professional Practice Course

In the present work, the feasibility to develop an innovative, unstructured practical activity (miniprojects research with open ends applying molecular biology methodologies) during the course Parasitología y Micología (Práctica Profesional, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral) was evaluated. The students (n=46) were divided in two groups: *Test* and *Control*. The student's attitudes in the Test Group was analysed in comparison to those students which carried out only conventional activities (Control Group). The performance as well as the attitudes of students, were evaluated by direct observation, surveys and open as well as closed questionnaires. Using these instruments, a positive attitude to the unstructured practical work was observed. This subjective feeling was confirmed by quantitative tools: Semantic Differential and Likert's Tests. Both instruments measured the following dimensions: critical opinion, interest, confidence, compromise, responsibility, motivation and pleasure. It can be concluded that the students into the Test Group showed a higher tendency to positive attitudes. The resolution of the problematic situation presented by the teacher, enable the students to relate contents, to express previous knowledge and confront them with new learning experiences (miniprojects), rising in the students their initiative, creativity, critical opinion, autonomy and teamwork. It was shown that students, by the search and the inquiry (during the miniprojects) left a passive position in their learning, experimented a higher freedom to express their own ideas as well as a higher autonomy. In conclusion, from a constructivist point of view, the students became active subjects during their own learning process.