



Resúmenes de Tesis y TIF

.....

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS • DOCTORADO EN FÍSICA • MAESTRÍA EN DIDÁCTICA DE LAS CIENCIAS
EXPERIMENTALES • MAESTRÍA EN SALUD AMBIENTAL • ESPECIALIZACIÓN EN VINCULACIÓN Y GESTIÓN TECNOLÓGICA



RESÚMENES DE TESIS: DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Desarrollo de sistemas de diagnóstico para la hormona estimulante de tiroides (TSH) en suero humano: ELISA e Inmuno-PCR cuantitativa (qIPCR)

Julián Elías Abud

jabud@fbc.unl.edu.ar

Director: Dr. Horacio Adolfo Rodríguez

Co-Director: Dr. Enrique Hugo Luque

Lugar de realización: Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (UNL-CONICET), Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral

Fecha de defensa: 9 de marzo de 2018

La función de la glándula tiroides está regulada por la hormona estimulante de la tiroides (TSH), una hormona glicoproteica secretada por la hipófisis anterior. En respuesta principalmente a TRH, la TSH madura se libera a la circulación e induce la síntesis y secreción de las hormonas tiroideas: triyodotironina (T3) y tiroxina (T4), que son las hormonas metabólicamente activas. La secreción de TSH está regulada por TRH y por un ciclo de retroalimentación negativa en el que las hormonas T3 y T4 actúan a nivel pituitario e hipotalámico. Dado que el control por retroalimentación de la secreción de TSH es exquisitamente sensible a las hormonas tiroideas periféricas, la mayoría de los trastornos tiroideos pueden diagnosticarse midiendo los niveles de TSH y de las hormonas tiroideas. Por esta razón, para la toma de decisiones clínicas, la medición de TSH en suero humano ha sido establecida como la "primera línea" para el diagnóstico de la función tiroidea.

La mayoría de los métodos actuales para la determinación de TSH utilizados en los laboratorios clínicos son inmunoensayos heterogéneos "sandwich" que implican (1) enzimas, (2) sustratos fluorométricos o (3) marcadores quimioluminiscentes. En comparación con los inmunoensayos competitivos tradicionales, como los radioinmunoensayos, los inmunoensayos heterogéneos para cuantificar TSH ofrecen (1) límites de detección más bajos, (2) tiempo de respuesta rápido y (3) un rango de medición lineal más amplio. En virtud de su obvia importancia para el diagnóstico clínico, se ha realizado un esfuerzo constante para desarrollar métodos analíticos con alta sensibilidad para TSH en fluidos corporales humanos. Aunque la sensibilidad y la reproducibilidad de los inmunoensayos de TSH han ido mejorando progresivamente en los últimos 30 años, existen discrepancias analíticas en las determinaciones cuantitativas de TSH entre los sistemas disponibles comercialmente. La mayor variabilidad entre métodos se encuentra a bajas concentraciones de la hormona (por debajo de 0,4 $\mu\text{UI/ml}$), debido a la menor capacidad de detección y a la sensibilidad analítica de los inmunoensayos en este rango de concentraciones.

En 1992, Sano y col. crearon una técnica llamada inmuno-PCR (IPCR), en la que reemplazaron la enzima de detección del ELISA por una sonda de ADN conjugada a biotina. Esta sonda de ADN luego es amplificada

mediante PCR para la generación de señal, siendo el número de amplicones producidos proporcionales a la cantidad antígeno detectado. Desde la aparición de esta técnica, diversas aplicaciones y estrategias de IPCR se han desarrollado para la detección de innumerables antígenos. A lo largo de los años, estos estudios han demostrado que un ensayo de IPCR puede mejorar el límite de detección de 10 a 10.000 veces más que el de un ensayo de ELISA homólogo.

En este trabajo de tesis desarrollamos un ensayo de ELISA sandwich y uno de IPCR altamente sensible, específicos para la detección de la hormona estimulante de la tiroides humana (hTSH). Se generó un panel de anticuerpos monoclonales (MAbs) contra hTSH por tecnología de hibridomas y se seleccionaron racionalmente combinaciones de anticuerpos. Se establecieron las condiciones de ensayo óptimas para la determinación de la hormona por ELISA sandwich y se seleccionaron dos pares de MAbs (B-4 y B-9). Estos prototipos de ELISA se evaluaron frente a patrones calibrados con la 2ª preparación internacional de referencia de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y en comparación con un kit ELISA comercial. Aunque el límite de detección (LD) fue de 0,1 μ UI/ml en todos los casos, el prototipo de ELISA B-9 mostró un rendimiento analítico similar al kit de ELISA comercial. Por lo tanto, seleccionamos B-9 para desarrollar el ensayo de IPCR sandwich específico, utilizando el formato "Universal", en tubos de PCR estándar sin pretratamiento. La amplificación de la señal se logró a través de la interacción entre el MAb de detección biotinilado y la sonda de ADN mono-biotinilada, previamente autoensamblada con neutravidina. En comparación con los ELISAs evaluados, el ensayo de IPCR mostró un menor LD y un considerable aumento de la sensibilidad (pendiente), proporcionando una mejor resolución cuantitativa en el rango de bajas concentraciones de la hormona.

La sensibilidad, facilidad de uso y el bajo costo de la técnica IPCR desarrollada ubican a esta metodología como una plataforma potencial para la detección cuantitativa de hTSH en muestras de suero humano. Además, el método de IPCR descrito (universal) demostró ser un formato práctico y versátil, realizado en tubos de PCR estándar. Nuestros resultados respaldan el potencial de la técnica para su aplicación en el diagnóstico de los estados tiroideos y para la medición confiable de niveles bajos clínicamente relevantes. Consideramos que el método propuesto puede posicionarse como alternativa metodológica para el análisis de hormonas.

Development of diagnostic systems for thyroid stimulating hormone (TSH) in human serum: ELISA and quantitative Immuno-PCR (qIPCR).

Thyroid gland function is regulated by the thyroid stimulating hormone (TSH). Because feedback control of TSH secretion by peripheral thyroid hormones is sensitive, most thyroid disorders can be diagnosed by measuring basal TSH and thyroid hormone levels. Thus, measurement of TSH in human fluids is utilized as a "first line" thyroid test, in order to assist clinical decision-making.

In this work, we developed a conventional enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and a highly sensitive immuno-polymerase chain reaction (IPCR) assay specific for detection of human thyroid stimulating hormone (hTSH). Several anti-hTSH monoclonal antibodies (MAbs) were generated using hybridoma technology. The ELISA prototypes were evaluated with standards calibrated with WHO 2nd International Reference Preparation for hTSH and in comparison with a commercial ELISA Kit. We selected the B-9 ELISA to develop a hTSH-IPCR assay applying an "Universal-IPCR" format in standard PCR tubes without pretreatment. The hTSH-IPCR assay showed a lower LOD and a highest sensitivity in terms of the slope definition of sensitivity, providing better quantitative resolution for a given amount of measurement error.

The sensitivity, ease of use, and low cost of IPCR support this technique as a potential platform for the detection of hTSH hormone in serum samples. Our results support the potential of IPCR technique for being applied in diagnosis of thyroid states and for reliable measurement of low clinically relevant human TSH levels. Therefore, we consider that the proposed method has exhibited great potentiality and could act as a good tool for hormone analysis.

Potencial funcional (in vitro e in vivo) y tecnológico de exopolisacáridos (EPS) producidos por bacterias lácticas

Elisa Carmen Ale

eliale@fiq.unl.edu.ar

Directora: Dra. Ana Binetti

Co-Director: Dr. Jorge Reinheimer

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

Fecha de defensa: 14 de marzo de 2018

En la presente Tesis doctoral se propuso estudiar, en primera instancia, la producción de exopolisacáridos (EPS) por parte de diferentes cepas autóctonas de la colección del INLAIN aisladas de diversos nichos ecológicos y, a partir de las cuales, se seleccionó *Lactobacillus fermentum* Lf2 por su capacidad de producir altos niveles de EPS. La misma fue aislada como flora alterante de queso Tybo elaborado en la región, el cual presentaba defectos gasógenos causados por el metabolismo heterofermentativo de esta cepa. Este EPS fue estudiado abordando diversos aspectos que, según consideramos, son fundamentales para comprender el comportamiento de este compuesto a los fines de proponer su aplicación como ingrediente alimentario, con un potencial doble rol tecnofuncional.

Primeramente, se evaluaron las condiciones de producción de EPS a escala laboratorio, mediante la modificación de diferentes parámetros de desarrollo de la cepa en un medio semidefinido. Posteriormente, aplicando estrategias de diseño experimental, se modificaron aquellos factores con mayor influencia en la

producción de este metabolito. A partir de esta optimización se logró un rendimiento de hasta 2 g/L en las condiciones estudiadas hasta el momento, duplicando la producción obtenida en condiciones no optimizadas.

Por otro lado, se caracterizó el extracto purificado desde el punto de vista químico y estructural mediante metodologías adecuadas (RMN, SEC-MALS, GC-MS y HPLC), pudiendo dilucidar que el extracto de EPS está compuesto mayoritariamente por dos fracciones de polisacáridos: un β -glucano de peso molecular relativamente elevado ($1,8 \times 10^3$ kDa), y otro heteropolisacárido de peso molecular medio (90 kDa) formado por glucosa y galactosa. Ambas fracciones están presentes en una proporción similar, de aproximadamente 40 y 45%, respectivamente, en el extracto purificado.

Desde el punto de vista tecnológico, se abordó el estudio de su influencia en la textura y características organolépticas sobre distintas matrices lácteas, como son el yogur y el queso Cheddar, cuando se lo incorpora como ingrediente alimentario. El EPS adicionado como extracto crudo le otorgó consistencia y dureza a los yogures, aumentando su pseudoplasticidad, con un leve efecto sobre la sinéresis y la organolepsis. En el caso de los quesos Cheddar, el extracto adicionado en la leche de elaboración no tuvo impacto significativo en la textura del producto final.

Por otro lado, se estudió el rol funcional de este extracto de EPS incorporado a dos matrices lácteas, leche y yogur, mediante tres modelos in vivo (ratones BALB/c): estudio de su capacidad de protección frente a una infección por *Salmonella enteritidis* serovar Typhimurium; estudio de su rol inmunomodulador a nivel intestinal; y estudio de su rol probiótico/simbiótico sobre la microbiota intestinal, en forma individual y combinando el EPS con *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1, una cepa aislada de leche materna y con efectos probióticos ampliamente demostrados. A partir de estos ensayos se puso en evidencia la capacidad de proteger a los animales frente a una infección por *Salmonella*. Asimismo, se observó un rol inmunomodulador suave, mediado por IgA y por IL-6. A partir del estudio de su rol prebiótico/simbiótico, cuando se lo administra como ingrediente alimentario en yogures, se observó un aumento en la producción de ciertos ácidos grasos de cadena corta (ácidos acético y butírico) y en los niveles del grupo *Clostridium coccooides* a lo largo del tratamiento por parte del EPS individualmente, así como un efecto bifidogénico cuando se lo combinó con la bifidobacteria.

Otro objetivo planteado para esta Tesis, y que surgió a partir de una colaboración con el Prof. Paul O'Toole (UCC, Irlanda), fue estudiar el/los *cluster/s* genético/s involucrado/s en la síntesis de EPS de *L. fermentum* Lf2. Para esto, se comenzó por secuenciar el genoma bacteriano y, mediante análisis bioinformáticos, se logró ensamblar el genoma y encontrar genes que codifican enzimas que participan en la síntesis de EPS. Asimismo, y debido a la importancia de contar con una variante de esta cepa incapaz de producir EPS, se construyó una mutante *knockout* (KO) para un gen codificante de una enzima clave en el proceso de síntesis de heteropolisacáridos. En referencia a este estudio, a pesar de que se pudo eliminar este gen, la cepa KO fue fenotípicamente similar a la *wildtype*.

En base a lo expuesto, se puede concluir que *L. fermentum* Lf2, una cepa autóctona de nuestra región de influencia, tiene una particular relevancia en relación a su elevado rendimiento en la producción de EPS, que fue capaz de aportar, como ingrediente alimentario, un doble rol tecnológico y funcional, mejorando la textura de la matriz donde se aplica y ejerciendo ciertos beneficios a la salud del consumidor.

Functional (*in vitro* and *in vivo*) and technological potential of exopolysaccharides (EPS) produced by lactic acid bacteria

In the present Thesis, a study of different autochthonous strains of the INLAIN collection, isolated from different ecological niches, and regarding their ability to produce exopolysaccharides (EPS), was proposed. From the results obtained, *Lactobacillus fermentum* Lf2 was selected for its ability to produce high levels of EPS. This EPS was studied addressing several aspects which, we believe, are essential to understand the behavior of this compound, in order to suggest its application as a food ingredient, with a potential double functional-technological role. From this work it could be concluded that *L. fermentum* Lf2, an autochthonous strain of our region of influence, has a particular relevance in relation to its high yield of EPS production (close to 2 g/L under optimized conditions, constituted by two polysaccharide fractions of high and medium molecular weight), which can provide, as a food ingredient, both technological and functional roles, improving the texture of the matrix where it is applied and exercising certain benefits to the health of the consumer (protection against infection of *Salmonella*, immunomodulatory and prebiotic/symbiotic roles when it was combined with the probiotic and autochthonous strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1). Besides, from the genome sequence, the genetic clusters involved in EPS biosynthesis could be identified, and a KO mutant, which lacked a gen that codifies an essential enzyme for EPS syntesis, could be obtained.

Estudios moleculares y celulares del sistema de endotelinas en cáncer colorrectal

Mariana Bianchi

mbianchi@ingenieria.uner.edu.ar

Director: Dr. Víctor Hugo Casco

Co-Director: Dr. Javier Fernando Adur

Lugar de realización: Laboratorio de Microscopia Aplicada a Estudios Moleculares y Celulares, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Entre Ríos

Fecha de defensa: 9 de febrero de 2018

Las endotelinas (ET) son moléculas con importantes funciones en procesos fisiológicos y fisiopatológicos. Sus roles fueron analizados tanto en colon normal como en el patológico, incluyendo además el estudio de los

péptidos natriuréticos (NP) ANP y CNP. ET-1 es la principal isoforma en el colon distal, mientras que la ET-2 predomina en el segmento proximal. El principal receptor de endotelinas es ET_B, localizado principalmente en los núcleos de células de la mucosa. El receptor ET_A exhibe niveles débiles de expresión génica aunque presenta una amplia localización. Los resultados revelaron que tanto las ET como los NP exhiben una distribución que permite postular que estarían involucrados en el mantenimiento de las propiedades mecánicas de las criptas de colon. Para la inducción del cáncer colorrectal murino (CCR), se utilizaron azoximetano y sulfato de sodio dextrano. Las muestras se tomaron en la cuarta, octava, decimosexta y vigésima semana. La progresión tumoral, generada principalmente en el colon distal, se observó mediante técnicas histológicas. Además, se utilizó microscopía de generación de segundo armónico, para analizar la disposición de las fibras de colágeno en la matriz extracelular. En el CRC, el hallazgo más relevante es la remisión temprana de la expresión de ET-2 en el colon distal. Aunque ET-1 no mostró modificaciones relevantes, hubo un aumento en la expresión de ET_A y una disminución del receptor de depuración, ET_B, que podría potenciar la actividad de ET-1. El CNP mostró aumentos sostenidos en su expresión, lo que sugiere que podría actuar contrarrestando los roles de las ET.

Molecular and cellular studies of the endothelin system in colorectal cancer

Endothelins (ET) are molecules with important roles in physiological and pathophysiological processes. Their roles were analyzed both in normal and pathological colon. The study of the natriuretic peptides (NP) ANP and CNP, their natural antagonists, was included. ET-1 is the major isoform found in the distal colon, while ET-2 predominates in the proximal segment. The main endothelin receptor is ET_B, which is mainly located in the nuclei of mucosal cells. The ET_A receptor exhibits weak levels of gene expression although depicts a widespread localization. In summary, the results revealed that both ET and NP exhibit a distribution that allows postulating that they would be involved in maintaining the mechanical properties of the colon crypts. For the induction of murine colorectal cancer (CRC), azoxymethane and dextran sodium sulfate were used. Samples were taken at the fourth, eighth, sixteenth and twentieth weeks. The tumor progression, mainly generated in the distal colon, was observed by classical histological techniques. Also, second harmonic generation microscopy, was used to analyze the collagen fibers arrangement in the extracellular matrix. In the induced CRC, the ET profile exhibit differential changes in its expression levels. The most relevant finding is the early ET-2 expression remission in the distal colon. While ET-1 did not exhibit relevant modifications, there was an increase in the ET_A expression and a decrease in the clearance receptor, ET_B, that could enhance ET-1 activity. CNP showed sustained increases in gene expression in distal colon, suggesting that it could act counteracting the roles of ET family.

Determinación sexual y diferenciación gonadal en yacaré overo. Genes involucrados en su regulación y efecto de la exposición a perturbadores endocrinos

Guillermina Canesini

gcanesini@fbc.unl.edu.ar

Director: Dr. Jorge Guillermo Ramos

Co-Directora: Dra. Mónica Muñoz-de-Toro

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

Fecha de defensa: 22 de marzo de 2018

La determinación sexual es un proceso que guía las gónadas bipotenciales (indiferenciadas) a desarrollarse en testículos u ovarios. *Caiman latirostris* (*C. latirostris*), yacaré overo, posee determinación sexual dependiente de temperatura (DST), donde la temperatura de incubación de los huevos durante un período crítico del desarrollo (período termosensible- PTS), es el principal factor determinante del sexo de la progenie. Estableciéndose de este modo, una temperatura productora de hembras (TPH) y una temperatura productora de machos (TPM). Además, esta especie es altamente sensible a la exposición de sustancias capaces de modificar el sistema endocrino, conocidas como perturbadores endocrinos (PEs). Atrazina (ATZ), un herbicida ampliamente utilizado a nivel mundial, es considerado un PE que altera los tejidos reproductivos masculinos durante el desarrollo. Por otro lado, los estrógenos son esenciales para el desarrollo ovárico y pueden anular el efecto de la temperatura e inducir la diferenciación ovárica incluso a temperaturas de masculinización. La determinación del sexo inducida por estrógenos (DSE₂) es una condición experimental, donde nacen hembras fenotípicas de huevos incubados a TPM y expuestos *in ovo* a una dosis de 1,4 ppm de 17-β-estradiol. Dados estos antecedentes, nos planteamos como hipótesis general que: “La exposición prenatal a estradiol y a un contaminante ambiental como es la Atrazina, modifican la expresión de moléculas claves en la determinación sexual y la diferenciación gonadal de *C. latirostris*”. En el presente trabajo evaluamos las características histomológicas de la gónada en tres estadios de desarrollo embrionario (E22, E24 y E27), mediante el procesado histológico del complejo Gónada-Adrenal-Mesonefro (GAM) y posterior tinción tricrómica con picrosirius-hematoxilina. Además, establecimos la ontogenia embrionaria gonadal de la expresión de proteínas implicadas en la proliferación celular (PCNA), daño del ADN (p63) y la apoptosis, como así también de la expresión de receptores hormonales: receptor de estrógenos α (REα) y receptor de progesterona (RP), esto se realizó mediante procesado histológico y posterior inmunohistoquímica. Con el fin de evaluar la expresión de la enzima aromatasa gonadal específica para *C. latirostris*, generamos un anticuerpo policlonal anti-Aromatasa. Por otra parte, dado que el tamaño y disposición de las gónadas embrionarias no permiten que las mismas sean disecadas de manera quirúrgica, se obtuvieron las gónadas aisladas mediante la técnica de micropunción de

Palkovits, y luego de esto se evaluó la expresión del ARNm de genes implicados en la determinación sexual y/o diferenciación gonadal: *amh*, *sox9*, *sf1*, *aromatasa*, mediante RT-PCR.

En primer lugar, comparamos los aspectos sexualmente dimórficos de la DST, analizando machos-DST y hembras-DST. La histoarquitectura gonadal embrionaria fue claramente diferente entre ambos grupos experimentales en el estadio 27 de desarrollo, próximo al nacimiento. Además, demostramos que las gónadas embrionarias muestran también diferencias en la expresión proteica de los receptores de estrógenos y progesterona de acuerdo al sexo, así como en la expresión de la enzima *aromatasa*. Observamos también, dimorfismo sexual en la proliferación celular y la posible incidencia de daño del ADN en las células germinales a través de la expresión de p63 en hembras. Finalmente, en la expresión génica hallamos patrones de expresión sexualmente dimórficos en todos los genes evaluados *amh*, *sox-9* y *cyp19-a1* (*aromatasa*) y *sf-1*. Ampliando de este modo, el conocimiento sobre la determinación sexual y diferenciación gonadal de esta especie a nivel embrionario.

Por otro lado, se estudiaron comparativamente las hembras, aquellas obtenidas por DST y las obtenidas por DSE₂. Demostramos que la histoarquitectura gonadal comienza a mostrar diferencias entre estas hembras en la etapa embrionaria 24. Además, las gónadas de hembras-DSE₂ muestran alteraciones en la expresión proteica de los receptores de estrógenos y progesterona, así como en la expresión de la enzima *aromatasa*, viéndose un incremento de la misma. Observamos también, un desequilibrio entre la proliferación celular y la apoptosis y la posible incidencia de daño del ADN en las células germinales en estas hembras, a través de la expresión de p63. Finalmente, hallamos diferencias entre las hembras DST y DSE₂ en la expresión de genes claves en el desarrollo gonadal como *amh*, *sox-9* y *cyp19-1a* (*aromatasa*), en los estadios de desarrollo de mayor sensibilidad al ambiente, correspondientes al PTS. En resumen, nuestros resultados muestran que tanto en las condiciones DST como DSE₂, se producen ovarios en embriones de *C. latirostris*. Sin embargo, esas gónadas son diferentes entre sí. Los cambios demostrados en embriones hembras-DSE₂ reflejan la idea de que los compuestos ambientales con actividad estrogénica comprobada podrían alterar la funcionalidad ovárica de *C. latirostris* adulto, poniendo en peligro su salud reproductiva y el equilibrio de las poblaciones silvestres en el ecosistema.

Finalmente, evaluamos las características gonadales embrionarias de los machos, comparando aquellos obtenidos por DST y expuestos a vehículo (condición control) con aquellos obtenidos por DST pero expuestos *in ovo* a una dosis ambientalmente relevante de ATZ (0,2 ppm). Encontramos modificaciones en la histoarquitectura testicular embrionaria en estadio 27 y cambios en moléculas claves del desarrollo gonadal, tanto a nivel proteico como a nivel génico, dos genes netamente vinculados a la diferenciación gonadal hacia testículo: *amh* y *sox-9*, se vieron modificados por la acción de Atrazina. Pudimos describir el aumento de la expresión de *aromatasa* gonadal; la exposición a ATZ modificó de este modo, moléculas de la vía estrogénica. Se alteró también, la proliferación celular en los machos-ATZ, lo que podría estar relacionado a un mayor daño en el

ADN de células germinales, evidenciado por la mayor expresión de p63, ya en etapas tan tempranas como las del desarrollo embrionario. En resumen, todos los efectos generados, refuerzan la acción perturbadora endocrina ya comprobada de la Atrazina, modificando las gónadas masculinas. Esto es especialmente significativo en términos del impacto que la Atrazina ambiental podría tener sobre el desarrollo y la reproducción de *C. latirostris* y tal vez sobre otras especies de vida silvestre.

Sex determination and gonadal differentiation in Yacaré Overo. Genes involved in its regulation and effect of exposure to endocrine disruptors.

Sex determination is the process that guides the undifferentiated gonads to develop into testicles or ovaries. The yacaré overo, *Caiman latirostris*, has sex determination by temperature (TSD) and is sensitive to pollutants classified as endocrine disruptors (EDs). Atrazine (ATZ), an herbicide considered ED, alters the male reproductive tissues during development. Estrogens are essential for ovarian development and can induce ovarian differentiation even at temperatures of masculinization (Estrogen-Induced Sex Determination - E2SD). Our hypothesis was that: "Prenatal exposure to estradiol and an environmental pollutant such as ATZ modify the expression of key molecules in sex determination and gonadal differentiation of yacaré overo". We compared the sexually dimorphic aspects of the TSD, analyzing males-TSD and females-TSD. We found differences in the embryonic gonadal histoarchitecture, in the protein expression of molecules involved in the estrogenic pathway, in cell proliferation, in the possible DNA-damage in germ cells and in the expression of key genes in sex determination and gonadal differentiation. On the other hand, we studied comparatively the females, those obtained by TSD and by E2SD. We show that although both conditions produce ovaries, these gonads are not identical. Finally, exposure to an environmentally relevant dose of ATZ modified the histo-morphological characteristics of the male embryonic gonads and produced changes in key molecules of testicular development. This could have detrimental effects on the sexual maturation and / or the reproductive success of the males of *Caiman latirostris*.

Desarrollo de estrategias biotecnológicas destinadas a la generación de células eritroides *in vitro* a partir de células madre/progenitoras hematopoyéticas derivadas de sangre de cordón umbilical

Luisina Anabel Cappellino

lcappellino@fbc.unl.edu.ar

Director: Dr. Claudio César Prieto

Co-Directora: Dra. Marina Etcheverrigaray

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

Fecha de defensa: 4 de diciembre de 2018

Las células eritroides humanas en sus diferentes estadios de maduración presentan aplicaciones como agentes terapéuticos en sí mismas o como potenciales vehículos para la incorporación de activos en el organismo. Asimismo, podrían ser empleadas *ex vivo* en ensayos dedicados a estudiar la acción de compuestos o a detectar anticuerpos anti-antígenos eritrocitarios en muestras de pacientes, para identificar pares de transfusión adecuados o individuos aloinmunizados. En los últimos años se han desarrollado estrategias biotecnológicas para la producción *ex vivo* de las células eritroides requeridas a partir de células madre/progenitoras hematopoyéticas (HSPCs). Dichos esfuerzos, en general, han tenido como finalidad la producción masiva de glóbulos rojos. Sin embargo, estos protocolos presentan un costo elevado y una baja rentabilidad, lo que impide su aplicación en la práctica clínica transfusional y restringe su empleo en el resto de las aplicaciones.

Por estas razones, este trabajo propone el diseño y aplicación de estrategias para producir cantidades adecuadas de células eritroides a partir de HSPCs derivadas de sangre de cordón umbilical, reduciendo el uso de factores de crecimiento costosos en el proceso de cultivo y contribuyendo así a una mejor comprensión de los procesos de producción.

Para ello se plantearon dos hipótesis principales de trabajo: por un lado, el desarrollo de procedimientos de diseño experimental permitiría generar una formulación óptima y eficiente del medio de cultivo utilizado para la expansión de las HSPCs. Adicionalmente, se propuso que la transgénesis lentiviral de las HSPCs con el gen de la eritropoyetina (hEPO) posibilitaría que las células produzcan y secreten la hormona en el medio de cultivo y que, consecuentemente, se reduciría el uso de este factor de crecimiento como suplemento y el costo asociado.

Así, en primer lugar, la optimización de la formulación del medio de cultivo se basó en el estudio de los efectos de suplementos sobre la expansión de las HSPCs, ya que los factores de crecimiento, la transferrina y el plasma tienen una contribución muy elevada al costo total del medio. De esta manera, se empleó una estrategia de diseño experimental de selección y optimización de las concentraciones de suplementos para la expansión de las HSPCs, las cuales, luego de su expansión, fueron cultivadas en un medio descrito para la proliferación y maduración de los precursores eritroides. Inicialmente se empleó un diseño de *Plackett-Burman* que permitió estudiar la significancia estadística del efecto de 11 factores sobre la expansión de las HSPCs, evaluada por recuento en cámara de Neubauer, y de la expresión del marcador de células hematopoyéticas CD34, mediante citometría de flujo. Se seleccionaron tres compuestos: albúmina sérica bovina (BSA), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) e hidrocortisona. Luego se optimizaron sus niveles mediante un diseño de *Box-Behnken*, manteniendo constantes los niveles de los demás factores evaluados. Se halló que las concentraciones óptimas de BSA, GM-CSF e hidrocortisona son 2% (P/V), 20 ng/ml y 4×10^{-5} M, respectivamente. Al finalizar la inducción eritroide de las células expandidas en el medio optimizado,

se pudo comprobar que la progresión global de los cultivos resultó favorable: se alcanzó una expansión acumulada máxima de 571 veces y se evidenció una diferenciación eritroide progresiva y una elevada selectividad eritroide en las nuevas condiciones. La diferenciación celular fue evaluada mediante análisis inmunofenotípico por citometría de flujo, estudio morfológico, detección de hemoglobina y de los precursores presentes por ensayos de formación de colonias.

La segunda estrategia abordada implicó la generación de HSPCs genéticamente modificadas con la secuencia de hEPO. Así, se transdujeron HSPCs con vectores lentivirales. Con éstas, se efectuaron cultivos sin EPO comercial [eHSPCs-EPOc (-)], los que fueron comparados con cultivos de células no modificadas suplementados con EPOc [nmHSPCs-EPOc (+)]. Ambos alcanzaron un estado similar de maduración, con compromiso hacia el linaje eritroide, lo cual fue demostrado por un decaimiento en la expresión de CD34 y CD45 y un incremento en la proporción de células que CD71⁺ y CD235a⁺ (marcadores eritroides). También se observaron cambios morfológicos y en la afinidad por colorantes característicos de la maduración eritroide. Se demostró que la diferenciación lograda en los cultivos de eHSPCs-EPOc (-) fue inducida por la hEPO secretada por las propias células ya que, en primer lugar, al efectuar cultivos control de nmHSPCs-EPOc (-) no se observó diferenciación eritroide. Por otro lado, la secreción de hEPO fue probada mediante ELISA sándwich e isoelectroenfocado seguido por Western Blot, el cual mostró similitud entre las isoformas de EPOc y de la hEPO secretada, aunque esta última presentó isoformas levemente menos acídicas que la primera. Esto permitiría reducir la cantidad de EPOc adicionada en los cultivos.

En conclusión, ambas estrategias desarrolladas en este trabajo podrían aplicarse conjuntamente para lograr mejoras prácticas en los procesos biotecnológicos destinados a la producción *ex vivo* de células eritroides con diversos fines, los cuales se encuentran actualmente en etapas de desarrollo y optimización.

Development of biotechnological strategies for in vitro generation of erythroid cells from hematopoietic stem/progenitor cells derived from umbilical cord blood

Erythroid lineage cells have potential application in cell therapy, drug delivery and screening, and identification of transfusion matches or alloimmunized individuals. However, the available protocols for their *ex vivo* production from hematopoietic stem cells (HSPCs) are not cost-effective, which prevents their utilization in transfusional practices and limits other uses.

The aim was to develop strategies to generate erythroid cells from umbilical cord blood HSPCs, reducing growth factors utilization, as they are the main contributors to the culture medium cost.

Experimental designs were applied to optimize the HSPCs expansion medium formulation. Plackett-Burman design allowed identifying that BSA, GM-CSF and hydrocortisone have significant effects over expansion. Their optimal concentrations were 2%(W/V), 20 ng/ml and 4x10⁻⁵ M, respectively, after applying a Box-Behnken design. After expansion in these conditions, HSPCs were cultured in a reported

erythroid expansion/maturation medium. 571-fold expansion and progressive and selective erythroid differentiation were evidenced by immunophenotypic, morphological, hemoglobin and CFU analyses. Additionally, it was hypothesized that lentiviral transgenesis with the erythropoietin (hEPO) gene would make cells produce hEPO, diminishing its utilization as supplement. Both transduced HSPCs cultured without commercial EPO [eHSPCs-EPOc(-)] and non-modified cells cultured with EPOc [nmHSPCs-EPOc(+)], reached similar maturation states, with erythroid commitment, as percentages of CD71+ and CD235a+ cells increased and morphological changes were evidenced. eHSPCs-EPOc(-) differentiation was shown to be induced by secreted hEPO, which was detected by ELISA and western blotting. Furthermore, nmHSPCs-EPOc(-) controls did not show erythroid commitment.

Both approaches are interesting to improve the biotechnological processes intended for ex vivo erythroid cells production.

Efectos de la semilla de *Salvia hispánica* L. (chia) dietaria -rica en ácido α linolénico- sobre las alteraciones bioquímicas-metabólicas del músculo cardíaco en un modelo de dislipemia y resistencia insulínica experimental

Agustina Creus

acreus@fbc.unl.edu.ar

Directora: Dra. Yolanda B. de Lombardo

Co-Directora: Dra. Adriana G. Chicco

Lugar de realización: Laboratorio de estudio de enfermedades metabólicas relacionadas con la nutrición. Cátedra de Química Biológica. Dpto. de Ciencias Biológicas. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral

Fecha de defensa: 23 de agosto de 2018

El síndrome metabólico (SM) es un factor de riesgo multifactorial de enfermedad cardiovascular (ECV), el cual comprende un conjunto de anomalías que incluyen dislipemia, resistencia insulínica, obesidad, adiposidad visceral, hipertensión, entre otras. En el presente trabajo se utilizó un modelo experimental que se asemeja al SM humano, inducido en ratas normales por la administración dietaria de una dieta rica en sacarosa (DRS) con el objetivo de profundizar el conocimiento sobre las anomalías bioquímicas-metabólicas del músculo cardíaco desarrolladas en este contexto; y evaluar si una intervención nutricional estratégica, la administración de semilla de *Salvia hispánica* L. (chia) -rica en ácido α linolénico- es capaz de mejorar/revertir estas alteraciones. Para tal fin, ratas machos Wistar recibieron una DRS (60 % energía) por 3 meses. Al cabo de este período las ratas se subdividieron en 2 subgrupos, un grupo continuó con la DRS mientras que el otro grupo recibió una DRS conteniendo semilla de chia como fuente de grasa dietaria en reemplazo isoenergético del aceite de maíz por 3 meses adicionales.

Los resultados alcanzados en el presente trabajo aportan nuevos conocimientos sobre los mecanismos involucrados en el desarrollo de lipotoxicidad y la anormal utilización de los sustratos energéticos (lípidos, glucosa) del músculo cardíaco inducidos por la ingesta de una DRS. La mayor disponibilidad de ácidos grasos plasmáticos junto con una mayor captación de los mismo conduce a un incremento de su oxidación mitocondrial, siendo esta insuficiente para impedir el acúmulo de lípidos intracelulares (lipotoxicidad). La activación del factor nuclear PPAR α y de la quinasa AMPK juegan un rol importante en estas alteraciones. En este contexto el metabolismo global de la glucosa, así como también la sensibilidad insulínica se encuentran comprometidos. Estas anomalías metabólicas se acompañan de un aumento de las especies reactivas del oxígeno resultado, al menos parcialmente, del deterioro de las defensas antioxidantes celulares.

La administración dietaria de semilla de chia impacta positivamente sobre las alteraciones bioquímicas-metabólicas del músculo cardíaco inducidas por la DRS. Esta intervención nutricional fue capaz de normalizar la captación de ácidos grasos por el cardiomiocito revirtiendo la lipotoxicidad y mejorando la utilización de los sustratos energéticos (lípidos vs. glucosa). Esto se acompaña del mejoramiento del estado oxidativo del músculo cardíaco, asociado a la inducción del factor de transcripción Nrf2, clave en la respuesta antioxidante celular. Además, esta intervención nutricional revirtió la hipertensión y la fibrosis del ventrículo izquierdo del corazón.

Si bien los resultados obtenidos a nivel experimental no pueden ser directamente extrapolados hacia el humano, los hallazgos alcanzados en el presente trabajo sugieren que la semilla de chia podría ser un nutriente complementario útil a fin de contrarrestar las complicaciones cardiovasculares asociadas al SM humano.

Effects of dietary *Salvia hispanica* L. (chia) seed -rich in α linolenic acid- upon the biochemical-metabolic alterations of cardiac muscle in an experimental model of dyslipemia and insulin resistance

The Metabolic Syndrome (MS) is a multifactorial risk factor of cardiovascular disease, which includes abnormalities such as dyslipemia, insulin resistance, obesity, visceral adiposity, hypertension, among others. In this work it was used an experimental model of dyslipemia and insulin resistance, which mimic the human MS, induced in normal rats by the administration of a sucrose-rich diet (SRD), with the purpose to study the biochemical and metabolic alterations of cardiac muscle developed in this context; and to evaluate if a strategical nutritional intervention: the administration of *Salvia hispanica* L. (chia) seed -rich in alpha linolenic acid- ameliorates/reverts these alterations. The results achieved provide new knowledge about the mechanisms involved in the development of lipotoxicity, the impairment of fuel utilization (lipids vs. glucose) and oxidative stress of cardiac muscle induced by an SRD intake. On the other hand, the results demonstrate that dietary chia seed impact positively upon the biochemical and metabolic alterations induced by an SRD. This nutritional intervention improved the fuel utilization

and reverted the lipotoxicity ameliorating the antioxidant defense status of cardiac muscle. Further, chia seed normalized the hypertension and the content of collagen in the left ventricle. Although the findings obtained at experimental level can not be directly extrapolated to the human, the results achieved in this work suggest that the chia seed could be a complementary nutrient useful to counteract the cardiovascular abnormalities associated to human MS.

Comparando el uso de modelos de distribución de especies y de algoritmos de optimización para priorizar áreas de conservación: usando reptiles y aves como indicadores.

Maximiliano Ariel Cristaldi

maximilianocristaldi@yahoo.com.ar

Director: Dr. Alejandro R. Giraud

Co-Directora: Dra. Vanesa Arzamendia

Lugar de realización: Laboratorio de Biodiversidad y Conservación de Vertebrados. Instituto Nacional de Limnología

Fecha de defensa: 04 de mayo de 2018

Las actividades humanas que producen destrucción del hábitat, sobre-explotación de especies, contaminación, introducción de especies exóticas y cambios climáticos son las principales causas de la crisis de biodiversidad. Si bien los sistemas de reservas son una de las estrategias de conservación con mayor potencial para lograr la protección de la biodiversidad, a menudo no han prevalecido criterios científicos para su designación perdiendo eficiencia en la conservación de la biodiversidad. Para mejorar la efectividad, los sistemas de reservas deben superponerse con los patrones espaciales de los objetos de conservación de interés y presentar coherencia espacial y conectividad. Realizamos una priorización espacial para la conservación de aves y serpientes raras y amenazadas de la provincia de Santa Fe (Argentina) utilizando dos algoritmos de optimización: 1) El algoritmo de complementariedad implementado en DIVA-GIS, que busca el área mínima requerida para la cobertura total de especies con el fin de maximizar la eficiencia del sistema de reservas. 2) El algoritmo Zonation que prioriza áreas basadas en la cobertura de las áreas núcleo dentro de la distribución geográfica de las especies con el fin de aumentar la efectividad del sistema de reservas. Utilizamos MaxEnt para estimar la distribución potencial de especies raras y amenazadas, considerando como zonas núcleo las regiones con los valores más altos de adecuabilidad climática. Con Zonation priorizamos en base a tres escenarios: 1) priorización con especies raras y amenazadas, 2) priorización con especies raras y amenazadas incluyendo el sistema de reservas existente, 3) priorización con especies raras y amenazadas junto con el costo del índice de Influencia Humana (IIH). Nuestros modelos obtuvieron medidas de desempeño superiores a un modelo nulo y capturaron adecuadamente los requerimientos ecológicos de las especies. Aunque comparaciones exactas entre los algoritmos de priorización no fueron posibles, ambos algoritmos priorizaron áreas que pertenecen a todas las regiones biogeográficas de Santa Fe: Chaco Seco, Chaco Húmedo, Valle de Inundación y Pampeana.

El sistema actual de reservas se concentra en el este de la provincia, no cubre la riqueza total de especies y no tiene suficiente superficie para proteger las áreas núcleo de la distribución potencial de especies. Adicionando el índice de actividad humana, se incrementó el valor de conservación en los Bajos Submeridionales, la Cuña Boscosa y el sur del departamento de San Javier; mientras que en los departamentos 9 de Julio, General Obligado y General López, la prioridad de conservación disminuyó. La actividad humana condujo a un sistema de áreas con un mayor número de parches y formas más inapropiadas, lo que compromete las posibilidades de lograr un sistema eficaz en caso de implementarse. Los patrones de priorización espacial entre los diferentes grupos de taxa considerados se superpusieron en gran medida aunque no completamente, y la similitud entre ellos aumentó cuando utilizamos el índice de influencia humana. La actividad humana impondría restricciones a las posibilidades de conservación. Nuestros resultados brindan prioridades y opciones espaciales para desarrollar un sistema de áreas protegidas más eficiente en la conservación de la biodiversidad, minimizando conflictos con actividades humanas, y aumentando la factibilidad de gestión para tomadores de decisión, administradores de recursos naturales y organizaciones ambientalistas interesadas en acciones y estrategias de conservación.

Comparing the usage of Species Distribution Models and Optimization Algorithms to prioritize areas for conservation: reptiles and birds as conservation targets.

Conservation Area Networks are essential to mitigate the biodiversity crisis caused by human activity. However, they were not often designed following scientific criteria. A Conservation Area Network must overlap spatial patterns of biodiversity priorities and present spatial coherence. Our aim was to define a Priority Area Network for rare and threatened bird and snake species of the Santa Fe province (Argentina). We applied two algorithms: (1) a complementarity algorithm that minimizes the area required to cover the presence of all target species (efficiency); (2) Zonation that maximizes the coverage of core areas of the geographical distribution of species (effectiveness). We used MaxEnt to estimate the potential distribution of species. We ran Zonation with three scenarios: (1) Scenario_1 includes the distribution of rare and threatened species, (2) Scenario_2 consists of Scenario_1 and the existing Conservation Area Network of the province, (3) Scenario_3 includes Scenario_1 and the Human Influence Index. Our models agreed with ecological requirements of species. Areas belonging to Chaco Seco, Chaco Húmedo, Valle de Inundación and Pampeana achieved the highest conservation scores. The existing Conservation Area Network does not overlap neither the presence of all species or an adequate percentage of the distribution of species. We obtained a Priority Area Network with lower compactness and higher perimeter in Scenario_3 than in Scenario_1. Patterns of spatial prioritizations between taxa overlapped partially but the similarity between Scenarios_3 was higher. We proposed a Priority Area Network that overlaps the potential distribution of species while avoiding high levels of human activity.

Ajustes biológicos de crustáceos de la familia Aeglidae (Decapoda, Anomura) en distintos ambientes de la Argentina

Valeria Paola Diawol

valeriadiawol@hotmail.com

Director: Dr. Federico Giri

Co-Director: Dr. Pablo Agustín Collins

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

Fecha de defensa: 29 de mayo de 2018

Los crustáceos se encuentran en una amplia gama de hábitats. En nuestro país, representantes del grupo taxonómico *Aegla* han sido registrados en variedad de ecosistemas, muchos de los cuales constituyen hábitats dinámicos y cambiantes en lo que respecta a sus características abióticas. Lo cual permite reconocer que algunas de las especies de la familia Aeglidae se habrían adaptado a los diferentes factores abióticos de estos ambientes dulceacuícolas. El objetivo de la presente tesis fue estudiar ajustes biológicos y ecofisiológicos de los aéglidos que les permiten vivir y desarrollarse en ambientes con diferentes características abióticas. En primer término se describieron y compararon ajustes biológicos y ecofisiológicos de tres poblaciones naturales de *Aegla uruguayana* a lo largo de un gradiente espacial y temporal. La estructura poblacional de los organismos estudiados coincidió con el patrón conocido para los aéglidos, presentando distribución contagiosa, reproducción concentrada en los meses más fríos del año, y liberación de los juveniles en la siguiente temporada. Además, se observó variabilidad interespecífica, y se registraron diferentes patrones en cuanto a las dinámicas poblacionales. Por otra parte, se estudió en *A. uruguayana* la presencia de ajustes en el crecimiento a través de variaciones en la forma y el tamaño. Se observó que durante la ontogenia se producen cambios en la forma del cefalotórax (alometría) de los individuos estudiados, además de variaciones en el tamaño. Los cambios en la forma del cefalotórax se relacionaron con las distintas etapas del desarrollo ontogenético (juveniles y adultos) y con el dimorfismo sexual en los adultos. El dimorfismo sexual, se manifestó como una variación en la forma y no en el tamaño del cefalotórax. Por último, se describieron y compararon ajustes en el consumo de oxígeno de tres especies de *Aegla*. En todos los ensayos el consumo de oxígeno fue medido en agua por respirometría. Se registraron diferencias entre los pesos de los ejemplares de tres poblaciones de *A. uruguayana*. Se observó dependencia entre el peso y el sitio (pH y temperatura) y el sexo. Los consumos de oxígeno variaron significativamente entre los sitios analizados, siendo los individuos de Entre Ríos los que presentaron el mayor consumo. La tasa metabólica fue directamente proporcional a la temperatura e inversamente proporcional al pH. Bajo condiciones comunes de laboratorio, los consumos de oxígeno de los ejemplares de los tres sitios analizados no revelaron diferencias significativas. El consumo de oxígeno de *A. uruguayana* fue similar entre machos y hembras. Se evidenció que *A. singularis* y *A. platensis* no presentan variación diaria en el consumo de oxígeno, presentando ambas especies similar estrategia de regulación del

intercambio de gases. La tasa metabólica media fue más alta en *A. singularis*. Se registraron disminuciones en la tasa metabólica asociada con el aumento de peso en ambas especies. El consumo de oxígeno de *A. platensis* y *A. singularis* fue similar entre machos y hembras. Finalmente, a partir de la integración de la información obtenida a lo largo del desarrollo de la presente tesis se concluye que existen ajustes biológicos, ecológicos y fisiológicos de los aeglidos a los diferentes contextos ambientales donde se distribuyen.

Biological adjustments of crustaceans of the family Aeglidae (Decapoda, Anomura) in different environments of Argentina

The aim of this thesis was to study biological and ecophysiological adjustments of the aeglids that allow them to live and develop in environments with different abiotic characteristics. The population structure of the organisms analyzed coincided with the pattern known for the aeglids, presenting clumped distribution, concentrated reproduction in the coldest months of the year, and release of the juveniles in the following season. In addition, interspecific variability was observed, and different patterns were recorded in terms of population dynamics. Changes in the shape of the cephalothorax (allometry) was observed during the ontogeny of the individuals, as well as variations in size. The changes in the shape of the cephalothorax were related to the different stages of ontogenetic development (juveniles and adults) and to the sexual dimorphism in adults. The sexual dimorphism was recorded in cephalothorax shape variation and not in size. Variation was registered in the degree of physiological plasticity along geographic gradients associated with local environmental parameters. On the other hand, similar metabolic rates among the populations, tested under common laboratory conditions, would be the result of the acclimatization of these crabs to the new environmental context. Time of day (noon and dusk), body weight and sex affected the oxygen consumption of each species in different ways. In this way, in the face of similar abiotic conditions each species would present a specific metabolic adjustment. Finally, it is concluded that there are biological, ecological and physiological adjustments of the aeglids to different environmental contexts where they are distributed.

Efecto de la ganadería sobre ensambles de aves en bosques fluviales de la región del Delta del río Paraná

Antonio Esteban Frutos

antoniofrutos.af@gmail.com

Director: Dr. Alejandro Raúl Giraudó

Co-Director: Dr. Carlos Ignacio Piña

Lugar de realización: Laboratorio de Ecología Animal, Centro de Investigaciones Científicas y Transferencia de Tecnología a la Producción (CONICET – Provincia de Entre Ríos – UADER)

Fecha de defensa: 26 de marzo de 2018

Los bosques riparios se encuentran entre los sistemas naturales más productivos y valiosos del planeta, albergando una alta biodiversidad. La mayoría de estos ambientes han sufrido procesos de degradación antrópica, siendo la introducción de ganado uno de los procesos que más modifica el ambiente, particularmente la estructura de la vegetación. Las respuestas de la biodiversidad a estas perturbaciones pueden ser negativas, neutras, o positivas respecto a su conservación, y se ha propuesto que las diferentes respuestas se relacionan con la fertilidad y productividad de los ambientes, la historia evolutiva de los mismos en presencia o ausencia de grandes herbívoros naturales, y fundamentalmente con el manejo y la intensidad de pastoreo. Se espera que ambientes que evolucionaron con alta presión de herbivoría presenten mayores valores de diversidad con niveles moderados de ganadería, asociado a un aumento de la heterogeneidad espacial. La presencia de las aves está estrechamente relacionada con la estructura de la vegetación, lo cual establece una relación directa entre las comunidades de aves y las modificaciones causadas por la introducción del ganado. Con el objetivo de evaluar el efecto de la ganadería sobre las comunidades de aves en los bosques fluviales de la región del Delta del río Paraná, se estudiaron y compararon los atributos de los ensambles de aves y la estructura de la vegetación en tres sitios con bosques fluviales de islas con y sin ganadería (Parque Nacional Pre-Delta y Parque Nacional Islas de Santa Fe). Las observaciones de aves fueron realizadas mediante la técnica de puntos de conteo, con un diseño que consistió en una transecta con 4 puntos en cada uno de 3 bosques fluviales en cada uno de los 3 sitios ($4 \times 3 \times 3 = 36$ puntos), los cuales fueron visitados cada 45 días (2 muestreos por estación del año) durante 3 años consecutivos (2014-2016; 864 muestras en total). Se encontró que la presencia de ganado está asociada con modificaciones en la estructura del bosque, con una disminución en la altura del estrato herbáceo y modificaciones en su composición, disminución de la cobertura del estrato arbustivo y disminución o pérdida de enredaderas, que en ausencia de la ganadería, tapizan la mayor parte de los troncos y arbustos. Estos cambios se asociaron con un aumento en la riqueza, la abundancia y la diversidad de aves en Islas con Ganadería. Respecto a la composición específica y las abundancias relativas de los distintos gremios funcionales, las diferencias estuvieron más relacionadas con los gremios que utilizan los estratos vegetales modificados en presencia de ganadería. Las especies del gremio del suelo se asociaron positivamente con Islas con Ganadería, mientras que las especies de los gremios del estrato arbustivo y del dosel bajo, se asociaron positivamente con los Parques Nacionales. Por otro lado, los gremios funcionales compuestos por especies menos relacionadas con los estratos que modifica la ganadería presentaron pocas o nulas diferencias de abundancia y riqueza entre los sitios. La actividad ganadera, que se practica en toda la región del delta del río Paraná, favorece al aumento de la diversidad de aves, por lo que los esfuerzos deberían centrarse en conocer los niveles de carga más apropiados en términos productivos, cuyo límite sea la no homogeneización del hábitat, manteniendo la dinámica que posiblemente hayan generado los grandes herbívoros naturales que habitaron

en el pasado. Generar parches con exclusión completa de la ganadería dentro de las islas podría brindar hábitats a algunas especies que se ven favorecidas por la ausencia de ganadería (aumentando la diversidad beta de las islas), de manera de incrementar la diversidad de la comunidad de aves en la región (diversidad gamma). En las áreas protegidas es importante considerar estos resultados y definir manejos adecuados a los objetivos de conservación de estos Parques Nacionales. La reintroducción o recuperación de los grandes herbívoros autóctonos que se han extinguido o disminuido en el área debería ser promovida, más allá de lo complejo que pueda resultar lograr este objetivo debido a problemas como la caza furtiva y otros conflictos de uso de suelo que puedan presentar los Parques Nacionales con las áreas que lo rodean, como ser la disponibilidad de ambientes en períodos de inundación, en los que los animales se desplazan a áreas más altas, fuera de los Parques Nacionales.

Effect of cattle grazing on assemblages of birds in riparian forests of the Paraná River Delta region

Riparian forests hold high biodiversity and are considered within the most productive natural systems in the planet. Most riparian forests suffered from anthropic deterioration processes such as cattle grazing. Cattle grazing impacts heavily on the environment, mainly by changing vegetation structure. Biodiversity responses to these disturbances can be negative, neutral or positive depending on the fertility and productivity of the environment, their evolutionary history with or without natural herbivorous, and the management and intensity of cattle grazing. Environments that have evolved under high herbivory pressure are expected to show greater levels of diversity with moderate levels of cattle that increase spatial heterogeneity. Presence of birds is tightly related to vegetation structure, therefore an indirect relationship among bird communities and alterations caused by cattle grazing is expected. To assess the effect of cattle grazing over bird communities in fluvial forests in the Delta area of Paraná River, several attributes of bird assemblages and vegetation structure in fluvial forests have been compared among islands with cattle and reserves with no or few cattle (Pre-Delta National Park and Islas de Santa Fe National Park). Bird data was collected through a point-count technique following a sampling design with 4 points along a transect in each of 3 river forests per site ($4 \times 3 \times 3 = 36$ points). Every point was visited every 45 days (2 samplings per season) for 3 consecutive years (2014–2016, 864 samples in total). The presence of cattle was associated with changes in the forest structure, with a decrease in the height of the herbaceous stratum and modifications in its composition, a decrease in the cover of the shrub layer, and lower abundance or absence of creepers, which cover most of the trunks and shrubs in the absence of cattle. These changes were associated with an increase in bird richness, abundance and diversity on islands with cattle. Most changes in the specific composition and relative abundance of the different functional guilds of birds were related to how they use plant strata. Species of the ground guild were linked positively to islands with cattle, while those species from bush strata and from low

canopy were positively related to the National parks. On the other hand, functional guilds of birds less related to those stratum modified by cattle showed little or no differences in abundance or richness among the sites. Livestock activity in the delta of Paraná river, associated with increased bird diversity. Consequently efforts should be made to determine the maximum cattle loading levels in terms of productivity that still maintain habitat heterogeneity, keeping the dynamics produced by native herbivores in the past. Patches with livestock exclusion within the islands could provide habitats for some sensitive bird species (increasing the beta diversity of the islands) in order to increase the diversity of the bird community in the region (gamma diversity). These results are important for the appropriate management for conservation within the National Parks. The reintroduction or recovery of the large native extinct or rare herbivores should be promoted in spite of limitations such as illegal hunting and land use conflicts of National Parks with the surrounding areas, such as the availability of environments during floods when animals move to higher areas outside the National Parks.

Exposición a glifosato y salud reproductiva: evaluación de efectos sobre la fertilidad y el desarrollo tumoral en rata

Marlise Luciana Guerrero Schimpf

marliseluciana@gmail.com

Directora: Dra. Jorgelina Varayoud

Co-Directora: Dra. María Mercedes Milesi

Lugar de realización: Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (UNL-CONICET), Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral

Fecha de defensa: 17 de Octubre de 2018

El glifosato es el ingrediente activo de una serie de formulaciones de herbicidas de amplio espectro que se utilizan de forma masiva en todo el mundo para controlar las malezas en áreas tanto urbanas como rurales. En la actualidad no existe consenso respecto al potencial carcinogénico y de disrupción endócrina de glifosato y sus formulaciones. El objetivo de la presente tesis doctoral fue evaluar la influencia de la exposición postnatal a un herbicida a base de glifosato (HBG) sobre la diferenciación organogénica y funcional del útero de la rata, y determinar si se producen consecuencias adversas a largo plazo sobre la fertilidad y el desarrollo de tumores ginecológicos. Para ello, crías hembra de rata de la cepa Wistar recibieron inyecciones subcutáneas cada 48 hs desde el día postnatal (DPN) 1 hasta el DPN7 con solución fisiológica o una formulación comercial de un HBG en una dosis de 2 mg de glifosato/kg/día (en el orden de magnitud de la dosis segura para glifosato de 1mg/kg/día, definida por la EPA). Luego del tratamiento, las hembras de ambos grupos experimentales fueron sacrificadas en distintas etapas de la vida (prepuberal y adulta).

Los resultados obtenidos durante la **etapa prepuberal** sugieren que la exposición postnatal temprana a bajas dosis de HBG: **i)** altera el desarrollo y la diferenciación postnatal del útero, produciendo hiperplasia endometrial y modificaciones en la expresión de proteínas que regulan la diferenciación morfogénica de este órgano; **ii)** induce modificaciones epigenéticas que conducen al silenciamiento en la expresión del gen homeótico *Hoxa10* en el útero; y, **iii)** produce alteraciones morfológicas, celulares y moleculares que evidencian un incremento en la sensibilidad uterina al estradiol.

Durante la **etapa adulta** observamos que la exposición postnatal a HBG: **i)** altera el ciclo estral e incrementa la relación estradiol/progesterona a nivel sérico; **ii)** produce subfertilidad, evidenciada por pérdidas embrionarias post-implantatorias; **iii)** modifica los mecanismos hormono-dependientes que regulan el proceso de decidualización durante la gestación. Concretamente, observamos una desregulación en una de las vías de señalización mediada por progesterona (receptor de progesterona/factor de transcripción COUP-II/morfogen *Bmp2*), clave para este proceso; y **iv)** aumenta el riesgo de desarrollar lesiones neoplásicas en útero, vagina, hígado y glándula mamaria de ratas de edad avanzada.

En conclusión, los resultados de esta tesis muestran que la exposición postnatal a bajas dosis del HBG produce alteraciones en la diferenciación organogénica del útero, y provoca efectos adversos a largo plazo sobre la salud reproductiva, como subfertilidad y mayor predisposición al desarrollo de tumores en distintos órganos. Diversos mecanismos moleculares podrían estar involucrados en los efectos observados, entre los cuales podemos mencionar: la acción de la formulación como perturbador endócrino (PE), la alteración del epigenoma, el incremento en la sensibilidad uterina al estradiol, el aumento en la relación estradiol/progesterona a nivel sérico y la alteración de los patrones de ciclicidad estral.

En conjunto, los resultados de esta tesis aportan nuevas evidencias a favor del potencial carcinogénico y de la actividad como PE de los HBGs, como así también conocimiento acerca de los mecanismos moleculares afectados.

Glyphosate exposure and reproductive health: evaluation of effects on fertility and tumor development in rats

In the last years, it has been controversy and debate regarding the carcinogenic and the endocrine disrupting potential of glyphosate and its commercial formulations. The aim of the present thesis was to evaluate the influence of postnatal exposure to a glyphosate-based herbicide (GBH) on the organogenetic and functional differentiation of the rat uterus, and to determine the long-term adverse consequences on female fertility and tumor development. Female Wistar pups were injected subcutaneously every 48 hs from postnatal day (PND) 1 to PND7 with saline solution or a commercial formulation of GBH at a dose of 2 mg of glyphosate/kg/day. After postnatal treatment, female rats from both experimental groups were sacrificed in different stages of life. Our results showed that postnatal exposure to

low doses of GBH not only alters uterine organogenetic differentiation during the prepubertal period, but also causes long-term adverse effects on female reproductive health, such as subfertility and tumor development in different organs, during adulthood. Several molecular mechanisms could be involved in the adverse effects induced by GBH exposure, among which we can mention: endocrine disruption, epigenetic modifications, enhanced sensitivity of the rat uterus to estradiol, increased estradiol/progesterone serum levels and abnormal estrous cyclicity. Overall, the results of this thesis provide new evidences about the carcinogenic potential and endocrine disrupting activity of GBHs, as well as knowledge about the molecular mechanisms involved.

Estudio de proteínas involucradas en la biogénesis de la Citocromo c Oxidasa y su papel en el metabolismo energético, el desarrollo vegetal y la respuesta a estrés

Natanael Mansilla

nmansilla@fbc.unl.edu.ar

Director: Dr. Daniel González

Co-Directora: Dra. Elina Welchen

Lugar de realización: Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral

Fecha de defensa: 19 de marzo de 2018

En los organismos eucariotas, las mitocondrias son las organelas encargadas de transformar el poder reductor generado por los distintos procesos metabólicos celulares en ATP. Este proceso es llevado a cabo en la membrana interna mitocondrial mediante la cadena de transporte de electrones. La misma está compuesta por 4 complejos multiproteicos que transportan los electrones desde los cofactores reducidos hacia el oxígeno, translocando protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana durante este proceso. Finalmente, este gradiente electroquímico es utilizado por el complejo V para la síntesis de ATP. La estructura de todos estos complejos ha sido extensamente estudiada en levaduras y en mamíferos. Gracias a esto se conoce que el ensamblado de los mismos es un proceso sumamente coordinado, que requiere de la correcta expresión del genoma nuclear y el mitocondrial para la producción de las distintas subunidades. Sumado a esto, es necesario que las proteínas de codificación nuclear sean correctamente importadas y ensambladas en la mitocondria. Además, la mayoría de estos complejos posee grupos prostéticos, los que suman un nivel extra de complejidad, dado que requieren de proteínas que se encarguen de su síntesis e inserción. Finalmente, las plantas, por ser organismos sésiles, poseen vías de ingreso de electrones extras así como también una oxidasa alternativa, las cuales no acoplan su funcionamiento a la translocación de protones. El complejo IV o Citocromo c Oxidasa, (COX), es la enzima terminal de la cadena de transporte de electrones. Este complejo está compuesto por 3 subunidades de codificación mitocondrial (COX1, COX2 y COX3) y 7-10 subunidades de codificación nuclear. COX cuenta con 2 centros de cobre y 2 grupos hemo α . Se conoce, por estudios en levaduras, que para

el ensamblado de COX son necesarias numerosas proteínas que participan en la inserción de las subunidades y en la síntesis e inserción de los cofactores. Búsquedas bioinformáticas en *Arabidopsis thaliana* han identificado supuestas proteínas homólogas a factores de ensamblado de COX, entre ellas OXA1, COX10, COX11, SURF1, COX15, COX17, COX19, COX23 y SCO1. COX10, COX15 y SURF1 participarían en la formación e inserción del grupo hemo *a*. COX17, COX19 y COX23 participarían en el transporte de cobre hacia SCO1 y COX11. Estas últimas serían las encargadas de la inserción y formación de los centros de cobre en COX.

En la presente tesis, nos propusimos estudiar la función de la proteína involucrada en la biosíntesis del grupo hemo *a* AtCOX10, así como profundizar en el entendimiento del rol biológico que tienen las proteínas de tipo Sco, HCC1 y HCC2, en Arabidopsis.

En levaduras, Cox10p es una farnesil transferasa que cataliza la conversión del hemo *b* en hemo *o*. Es el factor limitante en la biosíntesis del hemo *a* y es esencial para la inserción de éste en COX. En este trabajo, se caracterizó AtCOX10, la probable homóloga de Arabidopsis. AtCOX10 se localizó en la mitocondria y fue capaz de restaurar el crecimiento de la mutante nula de levaduras Δ cox10 en fuentes de carbono no fermentables, sugiriendo su participación en la síntesis del hemo *o*. No se pudieron obtener plantas mutantes con inserción de ADN-T en ambos alelos de AtCOX10. Las plantas heterocigotas mostraron semillas con embriones arrestados en estadios de desarrollo tempranos, los que carecieron de actividad COX. Estas plantas también exhibieron menores niveles de actividad COX y de respiración sensible a cianuro, pero los niveles de respiración total fueron normales a expensas de un incremento en la respiración alternativa. AtCOX10 parece estar implicada en el inicio y la progresión de la senescencia, ya que las mutantes heterocigotas mostraron una disminución más rápida del contenido de clorofila y del rendimiento de los fotosistemas en comparación con las plantas salvajes. Esto se observó durante la senescencia natural y la inducida por oscuridad. Sumado a esto, la complementación de las mutantes por la expresión del ADNc de AtCOX10 bajo el control de su propio promotor permitió obtener plantas con inserciones de ADN-T en ambos alelos de AtCOX10. Las plantas complementadas mostraron características fenotípicas comparables con las de plantas salvajes. Estos resultados resaltan la relevancia de la síntesis del hemo *o* en plantas y sugieren que este proceso es un factor limitante que influencia los niveles de actividad COX, la respiración mitocondrial y la senescencia.

HCC1 es una homóloga de plantas de las proteínas Sco, las que están involucradas en el tráfico e inserción de cobre en COX. Otra proteína similar, HCC2, está presente solamente en plantas y no tiene el dominio de unión a cobre. A pesar de ello, HCC2 presenta un elevado grado de identidad y se conserva en todas las plantas con flores. Para estudiar el rol de HCC1 y HCC2, analizamos el perfil de transcripción global de plantas mutantes en HCC2 (*hcc2*) y plantas que expresan un ARN antisentido de HCC1 (As-HCC1). Un número significativo de genes presentó perfiles transcripcionales opuestos en las líneas analizadas. Las plantas *hcc2* mostraron niveles aumentados de transcritos de respuesta a estrés, mientras que se observó una disminución de éstos en plantas As-HCC1. Sumado a esto, se observó una correlación entre los genes inducidos en las mutantes *hcc2* y

los asociados con la regulación por especies reactivas de oxígeno (ROS). En cambio, las plantas As-HCC1 presentaron una regulación opuesta de estos genes. En concordancia con esto, las plantas *hcc2* fueron más tolerantes al estrés por NaCl mientras que las As-HCC1 fueron más sensibles. Además, al medir respiración durante el estrés, se observó que las plantas AS-HCC1 presentaban una caída más temprana de la respiración dependiente de COX, con un concomitante aumento de la respiración alternativa, mientras que las plantas *hcc2* mostraron una caída menor que las plantas salvajes. Esto indica que existe una correlación entre la respiración por la vía COX y la tolerancia al estrés. Por otro lado, en plantas *hcc2* los genes de respuesta a estrés mostraron una inducción más temprana y/o mayor luego de un tratamiento breve con NaCl. En cambio, en las plantas As-HCC1 la respuesta se vio inhibida. Ensayos de complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC) indicaron que ambas proteínas HCC son capaces de interactuar *in vivo*. Los resultados sugieren que las proteínas Sco de plantas tendrían roles opuestos en la modulación de la respuesta a estrés. Dado que HCC2 no posee los residuos involucrados en la unión a cobre, postulamos que podría actuar modulando la actividad de HCC1 a través de interacciones proteína-proteína.

Study of proteins involved in cytochrome c oxidase biogenesis and its role in energetic metabolism, plant development and stress response

Cytochrome c oxidase (CcO) biogenesis requires several accessory proteins implicated, among other processes, in copper and haem *a* insertion. In this work, we characterized *AtCOX10*, a putative Cox10p homologue from *Arabidopsis thaliana* and two SCO proteins, named *HCC1* and *HCC2*. Plants with heterozygous T-DNA insertions in *AtCOX10* showed seeds with embryos arrested that lacked CcO activity. This mutant plants exhibited lower levels of CcO activity and cyanide-sensitive respiration but normal levels of total respiration at the expense of an increase in alternative respiration. *AtCOX10* seems to be implicated in the onset and progression of senescence, since heterozygous mutant plants showed a faster decrease in chlorophyll content and photosynthetic performance than wild-type plants after natural senescence. Furthermore, complementation of mutants showed phenotypic characteristics comparable to those of wild type.

On the other hand we observed that a deficiency in *HCC1* causes a decrease in the expression of several stress-responsive genes. In addition, *HCC1* deficient plants show a faster decrease in chlorophyll content, photosystem II quantum efficiency, cyanide-sensitive respiration, and COX activity and levels after salinity stress. Notably, *HCC2* deficiency causes opposite changes in these parameters. Bimolecular fluorescence complementation analysis indicated that both proteins are able to interact. We postulate that *HCC1* is a limiting factor for COX assembly during high salinity conditions and that *HCC2* probably acts as a negative modulator of *HCC1* activity through protein-protein interactions. In addition, a direct or indirect role of *HCC1* and *HCC2* in the gene expression response to stress is proposed.

Determinación por métodos multiresiduo de plaguicidas y micotoxinas en alimentos vegetales y lácteos mediante técnicas cromatográficas-espectrométricas de masa

Nicolás Michlig

nicomichlig@gmail.com

Director: Horacio R. Beldoménico

Lugar de realización: Programa de Investigación y Análisis de Residuos y Contaminantes Químicos, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral

Fecha de defensa: 3 de diciembre de 2018

La calidad de los alimentos está determinada por distintos factores que tienen lugar al inicio de la cadena de producción. Por un lado, la expansión agrícola influye como consecuencia del gran número de plaguicidas que se utilizan como herramientas para el control de plagas y para incrementar los rendimientos. Por otro lado, la intensificación de la producción animal requiere disponer gran cantidad de alimentos que se almacenan en condiciones muy variables y son propensos al desarrollo fúngico y la producción de micotoxinas. Tanto los plaguicidas como las micotoxinas pueden afectar la salud y la producción animal, y eventualmente también la de las personas que consumen alimentos derivados. El control de materias primas y productos al inicio de la cadena es entonces de importancia fundamental. El objetivo general de esta tesis fue estudiar metodologías analíticas para determinar micotoxinas y plaguicidas en leche y piensos para ganado basadas en técnicas avanzadas de cromatografía-espectrometría de masa y su aplicación en estudios de campo en la región central de la Provincia de Santa Fe.

LECHE. En una primera parte se describe la optimizó y validó una metodología basada en columnas de inmunoafinidad (IAC-UHPLC-MS/MS) para la determinación de aflatoxina M1 y su aplicación para el análisis de 160 muestras de leche tomadas de 40 tambos de la zona de estudio durante 4 estaciones climáticas. Se encontró una prevalencia de AFM1 cercana al 50% con niveles medios de concentración de 0,038 y un máximo de 0,293 µg/L. Aunque no se registraron excesos en el límite máximo establecido en Argentina (0,5 µg/L) se verificaron violaciones al LM de la Unión Europea (0,05 µg/kg) en el 8% de las muestras. En una segunda parte, se optimizó y validó una metodología alternativa al método IAC basada en el enfoque QuEChERS para integrar la determinación simultánea de AFM1 y residuos de plaguicidas. El método mostró un desempeño analítico con cifras de mérito compatibles con las normativas de Mercosur y la Unión Europea. Respecto a la determinación de plaguicidas, se validó la metodología QuEChERS-UHPLC-MS/MS para la determinación multi-residuo multi-clase de residuos de plaguicidas y micotoxinas en leche, y se aplicó en el análisis de 80 muestras de leche tomadas de los mismos establecimientos estudiados. Se encontró mayor prevalencia de insecticidas organofosforados como clorpirifos y diazinon, y en menor medida otros como atrazina, acetamiprid, carbendazim, y pirimifos-metilo. Se encontraron también residuos de plaguicidas organoclorados como heptacloro, isómeros de DDT o endosulfán-sulfato, de uso prohibido ya en Argentina.

PIENSOS. Se analizó una amplia variedad de alimentos vegetales usados para alimentar al ganado lechero (pasturas, forrajes, cereales, ensilados, balanceados y subproductos industriales). La estrategia analítica orientada a enfoques de amplio espectro consistió en la determinación de 350 plaguicidas mediante QuEChERS-UHPLC-MS/MS y posteriormente de 160 plaguicidas mediante GC-MS/MS. De los 420 compuestos estudiados en total 50 se encontraron en las muestras analizadas, siendo el 62% insecticidas, el 20% herbicidas y el 18% fungicidas. Clorpirifos, metolaclo y difenilamina fueron los plaguicidas de mayor ocurrencia. Respecto a las matrices, en el 72% de las muestras se encontraron residuos de plaguicidas (n=54), siendo los alimentos balanceados y las semillas de algodón las de mayor cantidad de compuestos detectados. La concentración más alta de un plaguicida hallado fue para deltametrina en un balanceado (532 µg/kg). En una segunda etapa se determinaron micotoxinas en el mismo set de muestras y a partir del mismo procedimiento de extracción, integrando así la determinación simultánea de gran cantidad de compuestos de diferente origen. Se determinaron 56 metabolitos fúngicos incluyendo micotoxinas tradicionales, conjugadas o enmascaradas, y micotoxinas emergentes. Se encontró que el 100% de las muestras analizadas contenía al menos 1 micotoxina, y del total de compuestos incluidos en el alcance del método se identificaron 38 (68%). Además de las micotoxinas con incidencia histórica en la región (aflatoxinas, fumonisinas, zearalenona, deoxinivalenol), se hallaron otras emergentes como eniانتinas, toxinas de *Alternaria* y beauvericina que no habían sido previamente estudiadas. En algunos casos se verificaron excesos a los límites máximos establecidos por la UE para micotoxinas en piensos, como AFB1 en granos de maíz (LM=5 µg/kg), FB1 en gluten de trigo (LM=6000 µg/kg) y ZEA en silaje de maíz (LM=3000 µg/kg).

Los resultados obtenidos constituyen un aporte importante para un mayor conocimiento sobre la residualidad de plaguicidas y micotoxinas en la primera etapa de la cadena de producción, útil para perfeccionar las prácticas de manejo y control tendientes a proteger tanto la salud animal como la humana.

Pesticide and mycotoxin determination on vegetal and dairy feeds using multi-residue methods and chromatographic-mass spectrometry techniques

Consumers are exposed to pesticides and mycotoxins when they take in foods produced by animals that have previously been exposed to those contaminants during their feeding. These hazards not only represent risks for human health but also for animal health, affecting production performance and causing economic losses. The main purpose of this thesis was to study analytical methodologies based on advanced chromatographic-mass spectrometric techniques for pesticide and mycotoxin determination in milk and animal feed and to apply them on field studies in Santa Fe Province. For milk analysis, analytical methodologies were optimized and validated for the determination of 105 different compounds (pesticides and aflatoxins) in real samples. Findings showed a high prevalence of organophosphate insecticides like chlorpyrifos and diazinon along with trace amounts of organochlorine pesticides (heptachlor

and DDT isomers), and a close to 50% prevalence of aflatoxina M1 in the analyzed samples with concentration levels below the legal maximum levels. For animal feed analysis, wide-scoped analytical methods were applied for the determination of 420 pesticides and 56 mycotoxins in a wide variety of selected vegetal samples. In this case findings showed a high incidence of organophosphate insecticides (chlorpyrifos and pirimifos-methyl) and a broad spectrum of mycotoxins, both those of historical occurrence and also emerging mycotoxins not previously studied. Results from this work constitute a mayor contribution for a better knowledge on pesticide and mycotoxin occurrence at the beginning of the production chain, useful to improve control and management practices.

Evolución, desarrollo y estructura de las inflorescencias en la subtribu Eleusininae (Chloridoideae-Poaceae)

Sebastián Elías Muchut

sebamuchut@yahoo.com.ar

Director: Abelardo C. Vegetti

Co-Directora: Renata Reinheimer

Lugar de realización: Cátedra de Morfología Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Litoral

Fecha de defensa: 08 de marzo de 2018

La subtribu Eleusininae es un clado de gramíneas perteneciente a la tribu Cynodonteae (Chloridoideae – Poaceae). Corresponde a un extenso grupo que, a pesar de su vasta dispersión geográfica y variedad taxonómica, aparenta poca diversidad morfológica de inflorescencias. Esta asunción, sin embargo, está basada en descripciones generales de un reducido número de especies. Es por eso que, en esta tesis, se estudió la diversidad morfológica de las inflorescencias de Eleusininae a través de la caracterización de las formas adultas y los procesos ontogénicos en un contexto evolutivo. Se analizaron las estructuras de las inflorescencias maduras de 112 especies desde una perspectiva comparativa para poder reconocer homologías y determinar los procesos responsables de las variaciones. Se reconstruyeron los estados ancestrales de caracteres de inflorescencia y espiguilla en un árbol filogenético de 102 especies. Esto permitió determinar los patrones y tendencias macroevolutivas que dieron lugar a la diversidad de inflorescencias. Todos los miembros de Eleusininae tienen panojas de espiguillas con tres diferentes apariencias: piramidal, digitada y uni-ramificada. Las espiguillas, todas con flores hermafroditas, pueden ser clasificadas como uni, bi o multi-floras, según el número de antecios que presenten. El ancestro de la subtribu Eleusininae probablemente presentó una inflorescencia completamente homogenizada, con una apariencia piramidal y numerosas ramas primarias. Asimismo, es probable que haya tenido espiguillas multi-floras con más de un antecio fértil. Los análisis evolutivos señalan que, en la subtribu Eleusininae, hubo una dirección evolutiva hacia la disminución en el número de estructuras reproductivas. Considerando que es importante no limitar los exámenes a caracteres que se encuentran en plantas

adultas, se realizó un estudio del desarrollo de inflorescencia y espiguilla de 20 especies pertenecientes al clado. El aporte del estudio de desarrollo de inflorescencias y espiguillas fue significativo debido al descubrimiento de patrones que implican la presencia de homoplasias en la morfología adulta. Asimismo, este tipo de estudio permitió determinar nuevos caracteres relacionados a la morfología de los meristemas de espiguilla y la filotaxis de los antecios. En conclusión, el análisis evolutivo de los caracteres de inflorescencia madura indicó que la escasa diversidad de formas de inflorescencias pudo haber sido consecuencia de un camino evolutivo con dirección a la reducción de estructuras. La perspectiva del desarrollo permitió determinar que esta dirección evolutiva afectó del mismo modo a inflorescencias con procesos ontogénicos diferentes.

Evolution, development and structure of inflorescences of subtribe Eleusininae (Chloridoideae-Poaceae)

Despite being widespread and taxonomically variable, the grass subtribe Eleusininae appears to have little morphological diversity in its inflorescences. However, this assumption is based on general descriptions of a reduced number of species. For this reason, this thesis studies the morphological diversity of inflorescences of Eleusininae through the characterization of adult forms and developmental processes in an evolutionary framework. Structures of mature inflorescences were analyzed in a comparative manner to recognize homologies and determine the processes responsible for the variations. The ancestral states of inflorescence and spikelet characters were reconstructed with a phylogenetic tree. This allowed the identification of macroevolutionary patterns and trends that shaped the inflorescences diversity. All members of Eleusininae have panicles of spikelets with three different appearances: pyramidal, digitate, and single-branched. The spikelets, all with hermaphrodite flowers, can be classified as uni, bi or multi-flowered, depending on the number of florets they subtend. The ancestor of subtribe Eleusininae may have presented a fully homogenized inflorescence, with a pyramidal appearance and numerous primary branches. In addition, it also may have had multi-flowered spikelets enclosing more than one fertile floret. The evolutionary analyses indicate that the direction of evolution was towards a decrease in the number of reproductive structures. Considering the importance of developmental processes in the understanding of morphological forms, we performed a developmental study of inflorescences and spikelets of 20 species belonging to the clade. The contribution of the developmental studies was significant due to the discovery of patterns that imply the presence of homoplasies in the adult morphology. Likewise, this kind of study allowed the determination of new characters related to differences on the morphology of spikelets meristem and the phyllotaxis of florets. Concluding, the evolutionary analyses of adult inflorescences indicated that the little diversity of inflorescence forms may have been consequence of an evolutionary course with a direction towards a decrease in number of

structures. The developmental studies suggested that the course of evolution towards inflorescence with less complex structures affected equally inflorescences with different ontogenic processes.

Rol trófico de los crustáceos decápodos dulciacuícolas: buscando respuestas desde una perspectiva fisiológica

Gabriela Eliana Musin

gabriela.musin@gmail.com

Directora: Dra. Verónica Williner

Co-Director: Dr. Pablo A. Collins

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

Fecha de defensa: 23 de marzo de 2018

El estudio de las tramas tróficas en los ambientes acuáticos dulciacuícolas implica la consideración de varias aristas de análisis. La información sobre “quien come a quien” requiere de la realización de investigaciones que analicen aspectos fisiológicos, morfológicos y ecológicos. Aportar información desde estas distintas aristas lleva a la posibilidad de comprender el rol de las especies. A partir de los estudios de ecología trófica se determinó que la dieta de los decápodos dulciacuícolas en Argentina es principalmente omnívora, haciendo uso de recursos de diferentes niveles tróficos. Existe, por lo general, una brecha entre lo que ingresa al organismo como presas consumidas y lo que de ello es efectivamente metabolizado y utilizado. La información sobre la digestión y asimilación de determinados componentes permite identificar qué tipo de presa prefieren y cuáles de ellos están mejor equipados para ser digeridos. Este trabajo tiene por objetivo describir y analizar las estrategias tróficas de los crustáceos decápodos dulciacuícolas desde una perspectiva fisiológica. Se trabajó con dos especies de crustáceos decápodos, *Macrobrachium borellii* y *Aegla uruguayana*, representativas de las familias Palaemonidae y Aegliidae respectivamente, de las cuales ya se han estudiado otros aspectos tróficos. La organización de este manuscrito consta de cuatro capítulos. En primer lugar, se analiza el perfil metabólico de palemónidos y aéglicos en el ambiente natural en tres tejidos diferentes (hemolinfa, hepatopáncreas y músculo) y sus variaciones en cuanto a la estacionalidad y la ontogenia. Se colectaron especímenes de *A. uruguayana* y *M. borellii* de diferentes tallas y ambos sexos, durante primavera, verano, otoño e invierno, en el arroyo “Espinillo” (Entre Ríos). El perfil metabólico de *A. uruguayana* varió de acuerdo a la talla y la estacionalidad. Sin embargo, estas variaciones no siempre fueron causadas por la interacción simultánea de estos dos factores. Las mediciones de glucógeno y lípidos en hepatopáncreas estuvieron influenciadas por la interacción simultánea de talla y estación, como también lo fue en el caso de glucosa, triglicéridos y proteína total en la hemolinfa. En contraste, los metabolitos musculares no estuvieron influenciados por la talla y la estación. Se encontró que en todos los tejidos los metabolitos siempre variaron en función de la estación del año. Este no

fue el caso cuando sólo se tuvo en cuenta la talla. Con respecto a *M. borellii*, las mediciones en el tejido muscular no mostraron estar afectadas por la interacción simultánea de los factores talla y estación. No obstante, se evidenció efecto de la talla en las mediciones de lípidos y, de la estación, tanto en lípidos como en proteínas. Las observaciones de las variaciones de los metabolitos reflejan el uso y requerimientos de los nutrientes por la especie, indicando la dinámica de las comunidades y sus ambientes. En el segundo capítulo, se caracterizaron y describieron las actividades enzimáticas digestivas: lipasas, proteinasa total y amilasas en función del sexo y de las distintas tallas de *A. uruguayana* y *M. borellii*, provenientes del ambiente natural. No se registraron diferencias estadísticamente significativas entre sexos en ninguna de las especies bajo estudio. En cambio, sí se registraron cambios en la actividad de amilasas durante la ontogenia de *A. uruguayana*, indicando que en los juveniles los valores de dicha actividad son significativamente más altos que el resto de los grupos. *M. borellii* evidenció diferencias ontogénicas en la actividad proteinasa total, presentando los organismos de tallas intermedias actividades enzimáticas mucho menores que las tallas mayores. Las comparaciones de actividades enzimáticas entre ambas especies arrojaron diferencias significativas, siendo mayores los valores en la especie *A. uruguayana* respecto a *M. borellii*. Si bien ambas especies son omnívoras y consumen ítems similares, la actividad de estas enzimas digestivas podría estar evidenciando diferentes estrategias de aprovechamiento del recurso. En el tercer capítulo se evaluó la digestibilidad de distintas dietas artificiales y el efecto de dichas dietas sobre el perfil metabólico y la actividad enzimática en la especie *A. uruguayana*. Los tres tipos de peletizados que se utilizaron variaron, como componentes principales, harina de pescado en un 60, 45 y 30%, y microcelulosa en 0, 15 y 30% (dietas D₁, D₂ y D₃ respectivamente). Las proteínas fueron los nutrientes más digeridos para las tres dietas examinadas, sin importar la proporción en la cual éstas estuvieron presentes. No hubo un efecto de la dieta en las actividades de lipasas y proteinasa total, pero sí para las amilasas, indicando que la actividad de estas enzimas fue significativamente menor en la dieta D₃. En cuanto al perfil metabólico, se encontró un efecto de la dieta en las mediciones de glucosa de la hemolinfa. Proteínas totales y lípidos (triglicéridos y colesterol) medidos en la hemolinfa no mostraron estar afectados por el tipo de dieta. Teniendo en cuenta las mediciones metabólicas en el tejido muscular, se encontró un efecto de la dieta en la concentración de glucógeno y no así para las concentraciones de lípidos y proteínas, los cuales se mantuvieron en similares condiciones para cada caso. Finalmente, en el capítulo 4 se exponen las conclusiones generales de esta tesis y, también, se delinean las principales perspectivas que se podrían seguir analizando en el futuro con el fin de complementar y enriquecer los aspectos aquí estudiados.

Trophic rol of freshwater decapods crustaceans: looking for responses from a physiological perspective

The objective is to describe and analyze the trophic strategies of two species of decapod crustaceans: *Macrobrachium borellii* and *Aegla uruguayana* from a physiological perspective. The organization of this

thesis consists of four chapters. In the first place, the metabolic profile of these decapods in the natural environment was analyzed in three different tissues (hemolymph, hepatopancreas and muscle) and their variations in terms of seasonality and ontogeny. The measurements reflect the use and requirements of the nutrients by the species, indicating the dynamics of the communities and their environments. In the second chapter, digestive enzymatic activities (lipases, total proteinase and amylases) were characterized and described in organisms from the natural environment, according to sex and the different sizes. The results obtained could be evidencing different strategies of resource utilization. In the third chapter, the digestibility of artificial diets and their effect on the metabolic profile and enzymatic activity in *A. uruguayana* were evaluated. Three types of pellets were used, with different protein:cellulose ratios (D1=60:0, D2=45:15 and D3=30:30). The proteins were the most digested nutrients for the three diets examined, regardless of the proportion in which they were present. There was no effect of the diet on the activities of lipases and total proteinase, but for the amylases. Dietary effects was found in glucose (hemolymph) and glycogen (muscle). Finally, chapter 4 discusses the general implications of this thesis and also delineates the main perspectives that could be analyzed in the future in order to complement and enrich the aspects here studied.

Síntesis de 5-amino -1*H*-1-arilpirazoles con potencial actividad fitosanitaria

Silvana Cristina Plem

silvanaplem@gmail.com

Director: Dr. Marcelo C. Murguía

Lugar de realización: Laboratorio de Química Aplicada , Cátedra de Química Orgánica, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral y Laboratorio de Medio Ambiente, Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (UNL-CONICET)

Fecha de defensa: 16 de marzo de 2018

En el trabajo de tesis doctoral se sintetizaron cuatro series de 5-amino-1*H*-1-arilpirazoles de siete compuestos químicos cada una, con el objetivo de sintetizar análogos al principio activo comercial Fipronil® y evaluar la actividad fitosanitaria en diferentes modelos biológicos.

En síntesis química a partir de siete arilhidracinas diferentes y 4 reactivos 1,3 dielectrófilos como reactivos de partida se obtuvieron y caracterizaron las 4 series de derivados arilpirazolicos. En primera instancia se obtuvo y caracterizo la serie de 5-amino-1-*H*-1-arilpirazoles-4-carbonitrilos (**7a-f**), la cual posteriormente por hidrólisis ácida de la posición 4 del anillo pirazol permitió obtener la serie 5-amino-1*H*-1-arilpirazoles-4-carboxamidas (**10a-f**).

Por otro lado se realizó la modificación química obteniendo la serie 5-amino-1*H*-1-aryl-4-sulfinilpirazoles (**14a-f**) previa síntesis de la serie 5-amino-1*H*-1-arylpirazoles (**9a-f**). Las moléculas sintetizadas fueron caracterizadas utilizando técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN), espectrometría de masa, punto de fusión, cuantificados por cromatografía y demás herramientas analíticas disponibles. Los rendimientos en general, fueron coincidentes con los reportados por la literatura (en el caso de las moléculas ya registradas).

Asimismo se aisló en laboratorio el principio activo (i.a.) Fipronil® del comercial CLAP 20% para utilizarlo como testigo en los bioensayos de actividad insecticida y fungicida y comparar la eficacia de los compuestos sintetizados respecto al comercial aplicado y tan cuestionado por su toxicidad.

Los ensayos de actividad insecticida de pirazoles sintetizados y seleccionados, se realizaron en el lepidóptero *Spodoptera frugiperda* o gusano cogollero, una plaga polífaga de gran importancia económica dado que ataca principalmente cultivos de maíz y otros cereales en nuestro país. Los bioensayos se realizaron en el Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE) dependiente de la Universidad Nacional de la Plata – CONICET.

Otros bioensayos en búsqueda de compuestos activos como potenciales controladores químicos de ciertas plagas, se realizaron en modelo biológico *Tuta absoluta* o minador del tomate, un microlepidóptero de gran interés a nivel global dado el daño que presenta en solanáceas como tomate (*Solanum lycopersicum*), papa, entre otras. Estos bioensayos se realizaron en la Planta Piloto de Procesos Industriales Microbiológicos (PROIMI) dependiente de la Universidad Nacional de Tucumán – CONICET.

Como resultados a los bioensayos insecticidas, se destacaron dos moléculas que presentaron muy buena actividad. Sumado a estos bioensayos, todas las series sintetizadas fueron ensayadas para determinar su actividad fungicida junto a fipronil®, en los hongos fitopatógenos *Alternaria sp.*, *C. Kikuchii*, *C. Sojina*, *Fusarium sp.*, *A. niger ATCC*, y el saprófito *Trichoderma sp* en la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral.

Los resultados obtenidos en la tesis doctoral proponen estudios complementarios de toxicidad y para promover su uso como control químico diferente de Fipronil frente a plagas agrícolas de nuestro país.

Synthesis of 5-amino-1*H*-1-arylpyrazoles with potential phytosanitary activity

In the present thesis, 4 different series of 5-amino-1*H*-1-arylpyrazoles were synthesized in order to look for analogues of the commercial insecticide Fipronil® to evaluate its possible phytosanitary activity in different biological models.

For the chemical synthesis, the 5-amino-1-*H*-1-arylpyrazoles-4-carbonitriles serie was obtained and characterized, which was subsequently modified by acid hydrolysis of the 4-position of the pyrazole ring to 5-amino-1*H*-1-acylpyrazoles-4-carboxamides. On the other hand the synthesis of 5-amino-1*H*-1-aryl-

4-sulfinylpyrazoles is shown prior to synthesis of the 5-amino-1*H*-1-arylpyrazoles series. Synthesis products were isolated and subsequently characterized using nuclear magnetic resonance (NMR) techniques, mass spectrometry, melting point, quantified by gas chromatography.

The active principle (i.a.) Fipronil® from the CLAP commercial 20% was also isolated by successive extractions and column chromatography to be use as a control in bioactivity tests.

The bioassays of efficacy of chemical control of the synthesized pyrazoles and selections, were carried out on the lepidóptera *Spodoptera frugiperda* or the crown worm; and in the tomato microlepidóptero *Tuta absoluta* or tomato miner, finding insecticidal activity of interest by two of the compounds synthesized and selected and tested against both biological models. Regarding the fungicidal activity in strains of phytopathogenic fungi and a species of saprophytic fungus, all the synthesized compounds were tested without showing fungicidal activity.

Influencia de la variabilidad climática sobre la composición de la comunidad íctica en el tramo medio del río Paraná.

Ana Pia Rabuffetti

piarabuffetti@gmail.com

Director: Dr. Luis Alberto Espínola

Co-Director: Ing. Mario Luis Amsler

Lugar de realización: Laboratorio de Hidroecología, Instituto Nacional de Limnología (UNL-CONICET)

Fecha de defensa: 15 de marzo de 2018

Las fluctuaciones hidrológicas y la temperatura son factores claves estructurantes de los ecosistemas de agua dulce con planicies de inundación como el del río Paraná en su tramo medio. Desde mediados del siglo XX se han producido cambios en su cuenca que han afectado su climatología/hidrología con repercusiones aún no conocidas en su dinámica ecológica, entre ellas en las pesquerías continentales, las mayores del país en el caso del tramo medio. Los estudios referidos a los efectos de la variabilidad del clima sobre los peces de agua dulce son aun relativamente escasos; el 90% de esas investigaciones se concentra en zonas templadas dada la mayor disponibilidad de series históricas de datos provenientes en general de pesquerías comerciales. Dentro de esos trabajos, los basados en evidencia empírica son proporcionalmente menores que los que utilizan información predicha. A su vez, del total de antecedentes que emplean datos empíricos, menos del 10% considera en conjunto efectos climáticos y antropogénicos.

Esta tesis tuvo como objetivo general evaluar el efecto de fluctuaciones climáticas ocurridas a nivel continental en Sudamérica durante los últimos 100 años, sobre las poblaciones ícticas y sus capturas en el tramo medio del río Paraná. El intento incluye discriminar la significación de la componente hidroclimática con respecto a la de eventuales efectos de otras variables de origen esencialmente antrópico, sobre los cambios

poblacionales del ensamble de peces de importancia comercial. Los resultados alcanzados se utilizaron, además, para inferir la influencia probable sobre la ictiofauna comercial de diversos escenarios climáticos futuros propuestos para la cuenca del Plata.

Se analizaron más de 8 décadas de información (1934-2016) referida a las principales especies de interés comercial del sistema incluidas en cinco bases de datos. Dos de ellas provenientes de organismos estatales (1934-1983, 2011-2015) y tres elaboradas con fines científicos (1964-1996, 1978-1980, 2009-2016). Se contó con series históricas de datos diarios del nivel hidrométrico (1905-2016) en puerto Santa Fe y se confeccionó la de temperatura del agua (1920-2016), aplicando un procedimiento apropiado que utiliza la temperatura diaria del aire. Mediante el examen estadístico de diversos atributos se determinó un conjunto de variables hidroclimáticas (18), que caracterizan al régimen hidrológico y la temperatura del agua asociada. Paralelamente, se determinó un conjunto de variables antrópicas (9) referidas a la pesca, la producción pesquera y de las poblaciones. De las especies más frecuentes y abundantes se analizaron variaciones a largo y corto plazo de diversos atributos (abundancia, largo estándar, estructura de talla, factor de condición).

Los resultados indicaron que las fluctuaciones climáticas ocurridas a nivel continental durante los últimos 120 años produjeron dos períodos húmedos (1900-1940 y 1970-2000) y uno seco (1940-1970) que afectaron las características de las crecientes (magnitud, duración y frecuencia) y bajantes a largo plazo en el río Paraná. Esas fluctuaciones incidieron sobre diversos atributos de las especies comerciales, sobre todo las migradoras de larga distancia (estrategia de vida periódica). Durante los períodos húmedos las capturas se incrementaron significativamente, esto es, en décadas con frecuentes inundaciones, sobre todo de primavera-verano (oct-mar), de gran intensidad ($H_{max} > 6m$) y duración (> 80 días). Este tipo de inundaciones tuvo una frecuencia de ocurrencia media de 4-6 años, que aumentó a 3 o más por década durante los períodos húmedos y disminuyó a solo 1 por década durante los secos.

En este contexto, pero a corto plazo (en un año en particular), se verificó que ese tipo de crecientes tuvieron un rol central, claramente favorable para el éxito reproductivo y posterior reclutamiento exitoso de las especies comerciales. Esto es, se tradujo de inmediato en incrementos notorios de juveniles en la planicie y, posteriormente (2 años en promedio), en abundante biomasa de tallas legales de captura. Por el contrario, períodos de desconexión pronunciados con la planicie produjeron una disminución abrupta de las capturas comerciales. Se deduce el papel clave que juegan las crecientes descritas para la sostenibilidad del recurso.

Finalmente, se logró significar la influencia de la componente hidroclimática sobre la ictiofauna comparada con efectos antrópicos (fundamentalmente vinculados con la actividad pesquera) a lo largo del tiempo. Se logró establecer un incremento de la incidencia de estos últimos hacia el presente, debido a cambios sucedidos en el grado de explotación del recurso desde mediados de 1990 y en la primera década del siglo XXI.

Influence of climate variability on the composition of the fish community in the Middle Paraná River.

This thesis deals with the effects of climatic fluctuations occurred in La Plata basin during the last 100 years on the fisheries of the Paraná River in its middle reach. The significance of hydroclimatic variables compared with others accounting for anthropic impacts on the population changes of commercial species, was appraised. The results enabled to approach the probable influence on the ichthyofauna of distinct future climatic scenarios advanced for the basin. Data series covering more than 8 decades (1934-2016) of the most frequent and abundant commercial species inhabiting the main channel as well as the nearby large floodplain of the Paraná River, were used. Fish attributes (biomass, size -Ls-, body condition factor) changed over time. Their long (short) term increments/reductions were closely related with fluctuations of 18 hydroclimatic variables. Positive effects on the ichthyofauna were recorded during humid periods (1900-1940 and 1970-2000), when the frequency of large spring-summer floods increased (these floods had an average frequency of 4-6 years along the whole studied period). An increment of the anthropic incidence (accounted through 9 variables), was recorded during the last two decades. Future hydroclimatic conditions as predicted by available models, would not be adequate for commercial fisheries since a decrement of discharges and hydrological connectivity is expected and, thus, of the reproductive success and catches of the different species (particularly the large migrants).

Desarrollo de una tecnología de producción de la enzima alfa Galactosidasa humana recombinante para uso terapéutico

María Celeste Rodríguez

mcrodriguez@fcb.unl.edu.ar

Director: Dr. Claudio César Prieto,

Co-Directora: Dra. Natalia Analía Ceaglio,

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

Fecha de defensa: 23 de febrero de 2018

La enfermedad de Fabry (OMIM 301500) es un desorden metabólico asociado al cromosoma X en forma recesiva, producido por una alteración en el catabolismo de los esfingolípidos como resultado de la actividad defectiva de la enzima α -Galactosidasa A. Se caracteriza por el depósito progresivo de residuos α -D galactósidos terminales que forman parte de glicoesfingolípidos neutros, principalmente de Globotriaosilceramida (Gb3), en los lisosomas de la mayoría de los tejidos viscerales y en los fluidos corporales.

La Terapia de Reemplazo Enzimático (TRE), a partir de la cual la enzima mutada o ausente es reemplazada con la administración exógena de una variante recombinante en forma crónica al paciente, está disponible

para el tratamiento de la enfermedad de Fabry desde el año 2001. Se han desarrollado dos presentaciones comerciales: *agalsidase beta* (Fabrazyme®; Genzyme Corporation) y *agalsidase alfa* (Replagal®; Shire Human Genetic Therapies). Uno de los principales inconvenientes de este tipo de terapias es su elevado costo, debido a la falta de información respecto de las características clínicas, etapas y el curso normal de la enfermedad, el número reducido de pacientes y la necesidad de administración de elevadas y repetidas dosis. Otras desventajas consisten en la corta vida media en circulación y eficacia limitada, fundamentalmente en pacientes en un estadio avanzado de la enfermedad. En este contexto, se han propuesto numerosas estrategias tratando de reducir los costos del proceso de producción global. De igual manera, el desarrollo de nuevas alternativas farmacológicas con características mejoradas resulta de gran interés.

En el presente trabajo de tesis se desarrolló una tecnología de producción de la enzima alfa Galactosidasa A humana recombinante (rhαGAL) para uso terapéutico. En una primera etapa del trabajo, se llevó a cabo el desarrollo de métodos analíticos confiables que permitieran el seguimiento del proceso de producción y el aseguramiento de la calidad del producto final.

Posteriormente, se generaron líneas y clones recombinantes en células CHO-K1, mediante el empleo de la tecnología de vectores lentivirales de tercera generación para la transferencia de material genético a la célula huésped. Los resultados demostraron las ventajas de este sistema sobre las metodologías tradicionales de transfección. En tal sentido, se obtuvieron clones con valores de productividad específica de hasta 8 veces mayor, y valores de actividad específica, en sobrenadante de cultivos, de 1,8 veces mayor que los valores reportados para el clon AGA5.3, el cual constituye la actual plataforma para la producción de uno de los medicamentos comerciales (Fabrazyme®, Genzyme). Asimismo, se emplearon distintos sistemas de cultivo: cultivos adherentes y en suspensión, en modo *batch*, *fed-batch* y continuo con perfusión en biorreactor.

En una tercera etapa se desarrolló el protocolo de purificación a partir de sobrenadante de cultivos, que consistió en un primer paso empleando una resina de intercambio aniónico débil (*DEAE Sepharose Fast Flow*) y un segundo paso por interacción hidrofóbica (*Butyl Sepharose 4 Fast Flow*). La enzima se purificó a partir de la cosecha perteneciente a la línea celular CHO GAL TD3 50 (rhαGAL-L) y a partir del clon P3G2 derivado de ésta (rhαGAL-C). Luego del segundo paso de purificación, se alcanzó una pureza de aproximadamente 98% y una recuperación del 60%.

La caracterización fisicoquímica y bioquímica de ambas moléculas, evidenció similares características a una de las variantes utilizadas en la TRE para la enfermedad de Fabry, producida en células CHO (Fabrazyme®). Ambas proteínas purificadas presentaron un comportamiento tipo Michaelis-Menten, así como la molécula de referencia. La composición estructural de las tres moléculas, determinada por espectroscopia de fluorescencia, demostró ser similar. Con respecto al estudio de estabilidad frente a proteasas, la molécula rhαGAL-L no presentó variaciones en comparación con la molécula de referencia, mientras que la molécula rhαGAL-C

presentó una estabilidad significativamente aumentada. Cabe destacar que ambas moléculas purificadas, mostraron propiedades mejoradas con respecto al perfil de glicosilación, en particular presentando un mayor contenido de ácido siálico Neu5Ac y una menor proporción de la variante inmunogénica Neu5Gc, atributos que darían lugar a una mejora de la eficacia *in vivo* de la terapia. Asimismo, se logró confirmar una correcta internalización y localización sub-celular hacia lisosomas.

En conclusión, todos los resultados obtenidos demuestran que el bioproceso desarrollado representa una alternativa muy interesante para la producción de la enzima rh α GAL para uso terapéutico.

Recombinant human alpha Galactosidase A production process development for therapeutic use

Fabry's disease is an X-linked recessive metabolic disorder caused by deficiency in lysosomal α -Galactosidase A, producing an alteration in the catabolism of sphingolipids.

Enzyme replacement therapy, in which the defective enzyme is replaced by an exogenous chronic administration of a recombinant variant, has been available for Fabry disease treatment, since 2001. Currently, two commercial formulations have been developed: *agalsidase beta* (Fabrazyme) and *agalsidase alfa* (Replagal). However, this approach presented some disadvantages related to the high cost of the treatment, small number of patients and the need of repeated administration of large amount of the enzyme.

In the present thesis work a production technology of the recombinant human alpha Galactosidase A (rh α GAL) enzyme for therapeutic use was developed. First, the optimization of reliable analytical methods was developed, in order to allow the tracing of the production process and the quality assurance of the final product. After that, recombinant cell lines and clones were developed in CHO-K1 cells, achieving up to eightfold higher productivities compared to the ones corresponding to AGA5.3 clone (the actual platform for the production of the commercially available product Fabrazyme®). Later, a purification protocol was developed. The enzyme was purified from suspension culture supernatants, obtaining after the second step, 98% purity and 60% yield. Importantly, the purified enzyme evidenced biochemical and physicochemical properties similar to Fabrazyme®, exhibiting improved properties regarding glycosylation.

Taken together, our results represent a significant advance that could improve the overall production process of a promising therapeutic alternative for Fabry disease.

Conservación de la avifauna de Entre Ríos (Argentina): uso de métodos biogeográficos y de optimización para evaluar la efectividad de las áreas protegidas.

Juan Andrés Sarquis

juandres.sarquis@gmail.com

Director: Dr. Alejandro Raúl Giraudo

Co-Director: Dra. Vanesa Arzamendia

Lugar de Realización: Laboratorio de Biogeografía y conservación de tetrápodos terrestres. Instituto Nacional de Limnología (UNL-CONICET)

Fecha de defensa: 21 de marzo de 2018.

La pérdida de diversidad biológica es una de las principales consecuencias de la mayor crisis ambiental global que ha vivido la humanidad, transformándose en un tema de interés mundial. Los problemas ambientales de la Argentina son diversos y están provocando una irremediable pérdida de biodiversidad. En la provincia de Entre Ríos, el avance de la frontera agrícola y la urbanización han dejado pocos remanentes de hábitat naturales y la frontera agropecuaria podría expandirse un 25% más en toda la superficie de la provincia en los próximos 20 años. En este contexto, las áreas protegidas (APs) cumplen una importante función en la conservación de la biodiversidad regional. No obstante, muchas APs se han establecido sin criterios científicos y por razones oportunistas, existiendo sesgos en la representación de la biodiversidad de especies y ecosistemas, y deficiencias en superficie como se ha constatado en todo el nordeste argentino. Las aves han sido reconocidas como valioso indicador de condición ambiental, para identificar regiones perturbadas o que necesitan protección, debido a la gran cantidad de información disponible sobre su biología y su relativa facilidad de estudio. En este estudio se proponen Áreas Prioritarias para la Conservación (APC) de las aves raras y amenazadas de Entre Ríos comparando complementariedad y un algoritmo de optimización complejo. Se compilieron 34.155 registros en 1.320 puntos georreferenciados correspondientes a 380 especies de aves nativas, obtenidos mediante (1) Bibliografía; (2) Bases de datos de biodiversidad; (3) Colecciones de museos; y (4) Muestreos propios. Se seleccionaron 192 especies de aves consideradas raras (primer cuartil de distribución y abundancia) y 17 las amenazadas (IUCN). Se evaluó su riqueza y complementariedad en 39 celdas de 0.5° de lat-long y se comparó con las áreas protegidas vigentes. Los resultados mostraron que si se utiliza solo la riqueza de especies para seleccionar APC quedarían 30% de las especies analizadas sin protección efectiva. Con complementariedad se necesitan un total de 12 celdas para incluir las aves raras y amenazadas, ubicándose 10 celdas asociadas a los ríos Paraná y Uruguay. Adicionalmente, se seleccionaron APC utilizando Modelos de Distribución de Especies (MDE) y ZONATION (algoritmo de optimización, función *Core Area Zonation*) con las 209 especies raras y amenazadas modeladas. Se optimizaron las APC con el sistema de áreas protegidas vigente, sin este e incluyendo un índice de la Huella Humana (HII) como costo. Los resultados mostraron que las áreas detectadas por ZONATION no se superponen con el sistema vigente, presentando

deficiencias en superficie y representación de especies. Las áreas prioritarias para la conservación seleccionadas se concentran en sectores de los ríos Paraná y Uruguay e incluyeron todas las regiones biogeográficas de Entre Ríos. Cuando se incluyó el índice de Huella Humana como costo, las APC seleccionadas presentaron un mayor grado de fragmentación, cambiándose grandes áreas aledañas a los ríos por áreas dentro de la provincia. Un futuro sistema de áreas protegidas debería incluir sectores de los grandes ríos Paraná y Uruguay, particularmente el Paraná. También, se identificaron áreas importantes en el delta del Paraná y en el arroyo Feliciano, por poseer un importante valor de conservación. Algunas de las APC detectadas se solaparon APs municipales, provinciales y Áreas Importantes para la Conservación de las Aves. En conclusión, el sistema actual de APs es insuficiente para conservar poblaciones de aves raras y amenazadas, y las áreas prioritarias detectadas podrían aportar a su mejoramiento mediante: (1) Consolidar las APs preexistentes y aumentar los grados/categorías de protección de las mismas; (2) incluir algunas AICAs en categorías más estrictas y; por último (1) diseñar nuevas áreas protegidas públicas o privadas en los sectores más prioritarios detectados.

Conservation of the avifauna of Entre Ríos (Argentina): use of biogeographic and optimization methods to evaluate the effectiveness of protected areas.

The natural habitats of Entre Ríos province were replaced by the advance of the agricultural frontier and urbanization. Although, Protected areas (PAs) play an important role in conserving biodiversity, they are usually established without scientific criteria. These produces biases in the representation of species and surface deficiencies, as has been noted in Entre Ríos. We proposed Priority Areas Conservation (APC) of rare and threatened birds that inhabit Entre Ríos. We recorded a total of 34,155 records distributed in 1,320 georeferenced points divided into 380 native bird species. The rarity analysis of species indicated that 192 species are rare and 17 are threatened in Entre Ríos. We analyzed the richness and complementarity in 39 cells of 0.5 ° lat-long in relation to the current PAs. We do not found a unique cell that contain all the richness of rare and threatened birds, thus, 12 cells are require to include all birds species that inhabit Entre Ríos. A spatial prioritization was carried out by using the predictions obtained with MaxEnt and ZONATION. The selected APCs do not overlap with the current PA system, indicating that the current APs from Entre Ríos do not include a large number of rare and threatened birds. Future PAs should include the Paraná and Uruguay rivers, followed by the Paraná delta and the Feliciano stream. Finally, the current PA system could be improved by: (1) improving pre-existing PAs and / or changing their categories; (2) include some AICAs in more stringent categories; (3) design of new areas

Sistemas de liberación controlada basados en complejos de inclusión ciclodextrina-fármacos incluidos en matrices poliméricas

Natalia Soledad Velázquez

nataliasvelazquez@gmail.com

Director: Dr. Julio Alberto Luna

Co-Director: Dr. Luciano Nicolás Mengatto

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

Fecha de defensa: 28 de mayo de 2018

La tesis se centra en el desarrollo de sistemas de liberación basados en geles de quitosano (Q) y ciclodextrina (CD), para dos drogas de baja solubilidad acuosa: paclitaxel (PTX) y progesterona (PGT). Los capítulos presentan los resultados y conclusiones de:

Capítulo 1. Comportamiento del PTX con una beta-CD metilada (RAMEb-CD) mediante diagramas de solubilidad de fases (DSF) y de los distintos protocolos de formación de complejos de inclusión (CI) ensayados. Los CI se caracterizaron y se verificó la inclusión de PTX en la CD. Se obtuvieron Eficiencias de Inclusión dispares. Los CI formaron agregados de gran tamaño que se lograron reducir mediante el uso de agentes antiagregantes.

Capítulo 2. Comportamiento de la PGT con beta-CD y RAMEb-CD mediante DSF y de los distintos protocolos de formación de CI ensayados entre PGT y RAMEb-CD. Los CI se caracterizaron y se verificó la inclusión de PGT en la CD. Se obtuvieron altas Eficiencias de Inclusión.

Capítulo 3. Optimización de la preparación de geles de Q mediante diseño estadístico de experimentos y de la manufactura del sistema de liberación mediante la incorporación de CI de PGT/RAMEb-CD en los geles optimizados. El sistema se caracterizó y comparó con un gel comercial (Crinone) de aplicación en terapia hormonal. El sistema Q resistió en mayor medida que el comercial a la degradación en fluido vaginal simulado. La liberación in vitro a través de tejido vaginal porcino de PGT desde el sistema Q presentó difusiones sostenidas en el tiempo similares a las exhibidas por el gel comercial.

Controlled release systems based on cyclodextrin-drug inclusion complexes included in polymer matrices

The thesis focuses on the development of release systems based on gels of chitosan (Q) and cyclodextrin (CD), for two drugs of low aqueous solubility: paclitaxel (PTX) and progesterone (PGT). The chapters present the results and conclusions of:

Chapter 1. Phase solubility diagrams (PSD) used to study the behavior of PTX with a methylated beta-CD (RAMEb-CD) and different protocols used for the preparation of inclusion complexes (IC). The IC

were characterized and the inclusion of PTX in the CD was verified. Dissimilar Inclusion Efficiencies were obtained. The IC formed large size aggregates that were reduced by the use of anti-aggregating agents. Chapter 2. PSD used to study the behavior of PGT with beta-CD and RAMEb-CD and different protocols used for the preparation of IC between PGT and RAMEb-CD. The IC were characterized and the inclusion of PGT in the CD was verified. High Inclusion Efficiencies were obtained.

Chapter 3. Optimization of the preparation of Q gels by statistical design of experiments and manufacture of the release system by incorporating the IC of PGT / RAMEb-CD in the optimized gels. The system was characterized and compared with a commercial gel (Crinone) for application in hormonal therapy. The Q system resisted more than the commercial one to the degradation in simulated vaginal fluid. In vitro release of PGT through porcine vaginal tissue showed that the Q system presented similar sustained diffusion in time to those exhibited by the commercial gel.