

**PERSONAL DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA
Y TECNOLÓGICA**

MARÍA ALEJANDRA BOSCH

INFORME PERÍODO

Septiembre 2011 - Agosto 2012

Director: Dr. José Luis Boiardi

Co- Director: Dr. Osvaldo M. Yantorno

CINDEFI- Facultad de Ciencias Exactas

UNLP

INDICE

1.-	APELLIDO	2
2.-	OTROS DATOS	2
3.-	PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN EN LOS CUALES COLABORA	2
4.-	DIRECTOR	3
5.-	INSTITUCIÓN DONDE DESARROLLA LOS TRABAJOS, SUBSIDIADOS POR LA CIC	3
6.-	INSTITUCIÓN DONDE DESARROLLA LA TAREA DOCENTE U OTRAS	3
7.-	EXPOSICIÓN SINTÉTICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERÍODO	4
8.-	OTRAS ACTIVIDADES	10
	PUBLICACIONES, COMUNICACIONES, ETC	10
9.-	PREMIOS OTORGADOS	13
10.-	TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERÍODO	14
11.-	OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES	14



INFORME PERIODO 09/ 2011 a 08/2012.

1. APELLIDO.....**BOSCH**.....
Nombre(s).....**MARÍA ALEJANDRA**
Título(s) Dra. de la Fac. Cs. Exactas /Bioquímica, UNLP. E- mail: bosch@quimica.unlp.edu.ar..

2. OTROS DATOS

INGRESO: Categoría....**ASISTENTE**.....Mes.....**Marzo**.....Año.....**1998 - 2002**.....
ACTUAL: Categoría.....**PRINCIPAL**.....Mes.....**Abril**.....Año...**2010-presente**..

3.
I) PROYECTOS DE INVESTIGACION EN LOS CUALES COLABORA

a) “*Caracterización e identificación de aislados clínicos de Burkholderia cepacia de pacientes fibroquísticos mediante técnicas moleculares y espectroscópicas vibracionales.*” Proyecto de la Secretaría de Extensión de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata (Participación: **Co-dirección**).

b) **Biofilms microbianos**

“*Biofilm microbianos. Estudio sobre estrategias desarrolladas por organismos patógenos respiratorios para su persistencia en el hospedador.*” Proyecto X534, correspondiente al Programa de Incentivos, otorgado por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de La Plata (Participación: **Co-dirección**)

c) **Fertilización asistida**

“*Diseño y desarrollo de una metodología no invasiva para la detección del potencial reproductivo de embriones humanos basada en Espectroscopía Infrarroja con transformada de Fourier combinada con Redes Neuronales Artificiales*”. Proyecto ANR 800/2011 del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva, Fondo Tecnológico Argentino (FONTAR), Convocatoria 2011. Proyecto aprobado NA 183/11. Empresa: CENTRO DE FERTILIDAD BUENOS AIRES S.A. (PREGNA). Directores: Drs. Marcos Horton (PREGNA) y Osvaldo Yantorno (CINDEFI) . **Directores Técnicos:** Dres. Marcelo Garcea (PREGNA) y Alejandra Bosch (CINDEFI). Período: 2012-2015.

4. DIRECTOR

Apellido y Nombre (s).....JOSÉ LUIS BOIARDI CO-DIRECTOR: **OSVALDO M. YANTORNO...**

Cargo Institución..... INVESTIGADOR INDEPENDIENTE – CONICET.....

Dirección: Calle.....50..... **Nº 227.....**Ciudad.....LA PLATA

C. P...1900..Prov: BS. AS.....Tel.: 483-3794.....Dirección Electrónica: boiardi@quimica.unlp.edu.ar

5. LUGAR DE TRABAJO

Institución.....CINDEFI (Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales)

Dependencia....Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.....

Dirección:Calle 50..... N °.....227.....

Ciudad.....La Plata.....**C. P.....**1900.....**Prov.....**Bs. As.....**Tel.....**483-3794.....

6. INSTITUCION DONDE DESARROLLA TAREAS DOCENTES U OTRAS

Nombre.....Área de Biotecnología, Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas.....

Dependencia....Universidad Nacional de La Plata.....

Dirección: Calle 50Nº...227.....

Ciudad.....La Plata.....**C. P.....**1900.....**Prov.....**Bs. As.....**Tel...221 483 3794...**

Cargo que ocupa.....Jefe de Trabajos Prácticos Dedicación Exclusiva.....

7.- EXPOSICIÓN SINTÉTICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERÍODO.

I) PROYECTOS DE INVESTIGACION EN LOS CUALES PARTICIPO

- a) ***Discriminación e identificación de bacterias pertenecientes al Complejo Burkholderia cepacia aisladas del tracto respiratorio de pacientes fibroquísticos mediante métodos moleculares y espectroscópicos vibracionales.***

INTRODUCCIÓN

La principal causa de morbilidad y mortalidad en pacientes fibroquísticos está asociada a ciclos de inflamación e infección causados por colonización bacteriana crónica del tejido pulmonar. Aunque *Pseudomonas aeruginosa* es el bacilo no fermentador (BNF) comúnmente aislado de muestras de esputo de estos pacientes, en las últimas décadas se ha incrementado la incidencia de otros BNF como *Stenotrophomonas maltophilia*, bacterias pertenecientes al complejo *Burkholderia cepacia* (CBc), *Acinetobacter* y *Achromobacter spp* (1).

La taxonomía del CBc es altamente compleja y dinámica. Hasta el año 2005 el Complejo estaba compuesto por 9 especies altamente relacionadas genéticamente (denominadas genomovares): *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, *B. stabilis*, *B. vietnamiensis*, *B. dolosa*, *B. ambifaria*, *B. pyrrocinia* y *B. anthina*. Se describió posteriormente una décima especie, *B. ubonensis*, y actualmente se consideran 17 las especies pertenecientes al Complejo *Burkholderia cepacia*.

El número de especies descritas recientemente y sus características fenotípicas similares, es indicativo del desafío metodológico que debe afrontar un laboratorio de microbiología al momento de analizar una muestra de un paciente con fibrosis quística. La identificación rápida y precisa de organismos en muestras biológicas es de enorme importancia para la adopción de medidas dirigidas al control de infecciones. En el caso particular de fibrosis quística, son ampliamente reconocidas las limitaciones de los métodos bioquímicos tradicionales para la identificación microbiana. La bibliografía internacional ha resaltado lo complicado de las caracterizaciones taxonómicas para estos aislados (3, 9, 13), informando además el alto porcentaje de errores en la identificación bacteriana, con el uso de metodologías microbiológicas de rutina (2, 3, 6, 11, 13, 17, 21, 22, 26, 27). En este sentido, recomendaciones de centros de referencia mundial de esta enfermedad, están dirigidas a mejorar las metodologías de aislamiento, identificación y posterior determinación de susceptibilidad a antibióticos de organismos aislados de muestras de esputo de estos pacientes (3). Otro factor que contribuye a complicar el problema de identificación microbiológica es que los organismos que colonizan los pulmones de estos pacientes crecen en forma de biofilm y esta forma de crecimiento favorece la transmisión de material genético entre las bacterias que integran esos consorcios mixtos (5, 16).

Para implementar un tratamiento antimicrobiano específico es esencial la identificación rápida y precisa de los organismos aislados. Los métodos bioquímicos empleados en la identificación microbiológica demandan entre 5 y 10 días de análisis y permiten discriminar sólo en algunos casos hasta nivel de especie.

En el año 2004, en el marco de un Proyecto de Extensión de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección del Dr. O. Yantorno y mi co-dirección comenzamos un trabajo conjunto con el Hospital de Niños, Sor María Ludovica de La Plata con el fin de obtener una técnica rápida de caracterización y diferenciación de organismos aislados de muestras de esputo de pacientes fibroquísticos empleando diferentes metodologías.

Luego de una primer etapa (2004-2007) al estudio de otros bacilos Gram-negativos no fermentadores presentes en esputo de pacientes fibroquísticos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter* y *Achromobacter spp* y *Ralstonia spp*. Las investigaciones realizadas permitieron el desarrollo de nuevas metodologías que posibilitaron la rápida caracterización e identificación de aislados clínicos (12-36 h), con bajo costo operativo y alto grado de certeza (J Clin Microbiol 2008, 46: 2535-2546; Analyst 2009, 134: 1138-1148). Sin embargo la dinámica del CBc acompañada por el avance de nuevas tecnologías de análisis genotípico ha llevado a que en los últimos 3 años se describieran 5 nuevas especies dentro del complejo y un nuevo grupo de bacterias, denominado Grupo K o Taxón K, que comprende al menos dos nuevas especies, *B. contaminans* y *B. lata*. (Vanleare et al. 2009). Esta realidad determinó que la base de datos IR quedara desactualizada, lo que nos llevó a buscar su rectificación/actualización. Un elemento que apuntaló esta decisión fue el hecho de que a partir del año 2008, aún con las nuevas herramientas moleculares un 80% de los aislados locales no eran correctamente identificados. Teniendo en cuenta esta situación y la demanda permanente de los servicios de microbiología hospitalarios que trabajan con pacientes fibroquísticos, el objetivo fue para este período desarrollar técnicas moleculares que permitieran la identificación certera de aislados clínicos.

OBJETIVOS

El trabajo en este período se orientó a continuar con la caracterización molecular de organismos del CBc aislados de pacientes fibroquísticos, a nivel de especie por secuenciación de los genes *recA* y *gyrB*, y PCR-RFLP de los mismos genes empleando la enzima de restricción *Hae III*. Del mismo modo se continuó también con el registro de espectros FT-IR de los mismos aislados para llevar a cabo su caracterización fenotípica. Se realizó una genotipificación de los mismos aislados clínicos empleamos técnicas de *fingerprinting* basadas en los primers BOX, ERIC y Rep). En particular se realizaron estos estudios sobre los pacientes colonizados por organismos del complejo *B. cepacia* de forma crónica.

METODOLOGÍA

Microorganismos. Desde el año 2004 debido al constante trabajo en colaboración realizados con diversos Hospitales provinciales y nacionales, el CINDEFI cuenta con un cepario de más de 200 aislamientos pertenecientes al CBc recuperados de muestras de esputo de pacientes con fibrosis quística (FQ) y con 15 cepas de referencia de diferentes organismos Gram negativos multiresistentes. Los aislamientos de *Burkholderia spp*. fueron caracterizadas desde el punto de vista bioquímico y algunos de ellos caracterizados por sus perfiles de PCR-RFLP del gen *recA* (enzima de restricción *HaeIII*), los cuales confieren una identificación parcial ya que muchas especies no pueden ser discriminadas por este método. Durante el curso de las investigaciones realizadas en este período se han incluido nuevos aislados hospitalarios de centros de asistencia de diferentes regiones del país. Todos ellos han sido incorporados al cepario del CINDEFI, pero se han analizado desde punto de vista genético y fenotípico los aislamientos provenientes de infecciones crónicas (provenientes de pacientes con más de 3 cultivos positivos de Burkholderia en el lapso de 6 meses). Todos los organismos fueron mantenidos a -70°C en glicerol al 30%.

Caracterización molecular. Extracción de ADN bacteriano. Se emplearon dos métodos alternativos de extracción a partir de una suspensión de CBc de 1×10^9 - 1×10^{10} UFC. que fueron optimizados en el período anterior.

a) *Lisis por calentamiento:* La suspensión bacteriana se llevó a ebullición durante 10 min. Posteriormente se separó el ADN por centrifugación a $10.000 \times g$ durante 5 min.

b) *Lisis por acción enzimática:* Se obtuvo un sedimento bacteriano por centrifugación de 2 ml de un cultivo de 16 horas del CBc en medio Luria Bertani. El sedimento se resuspendió en 200 μ l de GET (Glucosa 50mM, EDTA 70 mM, Tris-HCl [pH=8] 50mM) y 2.8 ml de buffer lisis (1%SDS, Tris-HCl [pH=8] 50mM) conteniendo 60 μ g/ml RNAsa A y 30 μ g/ml Proteinasa K y 0.5mg/ml Pronasa (4). Se incubó a 37°C y luego se agregó 1 ml de Acetato de Amonio para la precipitación de proteínas y polisacáridos. Se incubó 1h y centrifugó a $17.000 \times g$ por 10 min. El ADN se recuperó por precipitación con etanol. El precipitado se disolvió en 200 μ l de buffer TE (Tris-Cl [pH=8] 10mM, EDTA 1mM).

Genotipificación de los genes *recA* y *gyrB*.

a) *recA-PCR-RFLP:* Utilizando los *primers* BCR1 y BCR2 para el complejo Bc se amplificó un segmento de aproximadamente 1 Kb. El producto amplificado se detectó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% con tinción de bromuro de etidio y posterior visualización bajo luz UV. El amplicón fue digerido con enzimas de restricción (*Hae III*). Los patrones de bandas obtenidos se compararon con los patrones de cepas de referencia. El producto de las digestiones se detectó por electroforesis en geles de agarosa al 2,5% con tinción de bromuro de etidio y se visualizó bajo luz UV.

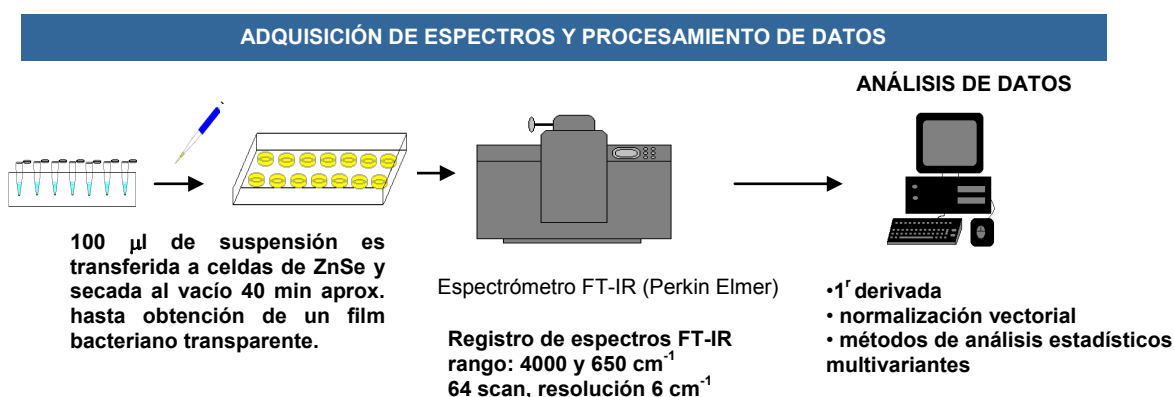
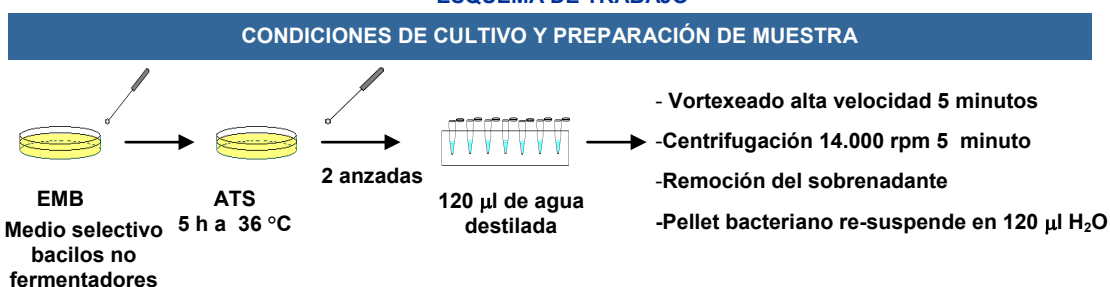
b) *Análisis de la secuencias nucleotídicas:* se determinó la secuencia completa del gen *recA* mediante secuenciación directa utilizando dos amplicones de 500 pb utilizando la combinación de primers BCR1/BCR4 y BCR2/BCR3 para cada amplicón (mahent). Las secuencias obtenidas se compararon con secuencias publicadas en Gene Bank y MLSTpub a través del análisis de BLAST. En base a las secuencias obtenidas se construyeron árboles filogenéticos del gen *recA*.

c) Genotipificación *con gyrB.* Se empleó como herramientas para confirmar las identificaciones más dudosas (5): secuenciación completa del gen y comparación con secuencias publicadas en Gene Bank y MLSTpub). *GyrB-PCR – RFLP* se empleó para estudios de epidemiología a través de la comparación de los perfiles empleando *HaeIII* como enzima de restricción.

Fingerprinting BOX/ERIC/Rep-PCR. Estas técnicas utilizan *primers* que hibridan y amplifican las regiones con secuencias de ADN repetidas o repetitivas que se encuentran distribuidas a lo largo del genoma en la mayoría de bacterias Gram-negativas (6). El polimorfismo resulta de la variabilidad en la repetición de dichas secuencias y bajo condiciones estandarizadas de trabajo, este método es muy confiable, reproducible, rápido y altamente discriminatorio, Por ello ha sido utilizado en estudios epidemiológicos en brotes infecciosos (3). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 15 μ l, constituido por 4 μ l de la muestra de ADN (ADN templado) y 11 μ l de la mezcla de reacción (master mix). La composición de esta mezcla de reacción es 1.5 μ l de buffer de la polimerasa (Tris-HCl 10 mM pH 9, KCl 50 mM, Triton X100 0.1%), 1.5 μ l de mezcla de dATP, dCTP, dGTP y dTTP cada uno 200 μ M, 1.8 μ l de MgCl₂ 3mM, 0.15 μ l de Taq DNA polimerasa, 1.0 μ l de cada uno de los primers en reacciones independientes (Box AR1, REP 1-2, ERIC 1-2).

Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR). Dado que el fenotipo de cada microorganismo depende de variables tales como: sistema de cultivo utilizado, composición del medio de crecimiento, tiempo de incubación, pH, temperatura, etc., se debió estandarizar las condiciones de operación para la toma y procesamiento de espectros IR (15,18). La metodología que se empleó se muestra a continuación.

ESQUEMA DE TRABAJO



RESULTADOS

En períodos anteriores se desarrolló un protocolo basado en PCR-RFLP de los genes *recA* y *gyrB* y se pusieron a punto las técnicas de secuenciación de ambos genes. Con esta metodología logramos discriminar e identificar 9 especies pertenecientes al CBc, incluyendo los aislados que hasta el año 2008 habían sido identificados como aislados “atípicos” pertenecientes a la especie *B. cenocepacia*. En base a estos nuevos instrumentos de identificación optimizados, estos aislados fueron asignados a la especie *B. contaminans*. Las 9 especies fueron encontradas en aislados tanto de pacientes como del ambiente, a excepción de *B. lata* que nunca se aisló en pacientes. Interesantemente, el análisis de las secuencias del gen *recA* reveló una alta uniformidad para los aislados locales de pacientes fibroquísticos, además de una gran prevalencia de *B. contaminans* (mayor al 80 %). En cuanto a los aislados de esta última especie, con patrón “K” el 85% producían hemólisis y pigmentación verde amarillenta, pero no se observó diferencias en cuanto al origen del mismo.

En los estudios epidemiológicos se han empleado diferentes metodologías fenotípicas y genotípicas como se indicó (ver métodos). Las técnicas de *fingerprinting* (BOX-PCR, ERIC-PCR y Rep-PCR) utilizadas a tal efecto revelaron la existencia de una mayor variabilidad genética que las obtenidas a nivel de secuencia de gen. Entre las diferentes técnicas moleculares implementadas, BOX-PCR mostró ser la herramienta con mayor poder de discriminación (ver resultados en comunicaciones y trabajos publicados).

Tanto la puesta a punto de estas técnicas como el análisis de sus resultados se realizaron con el asesoramiento del Dr. Antonio Lagares del IBBM, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

Los resultados obtenidos durante este período se encuentran detallados en el punto 8.

BIBLIOGRAFÍA

1). LiPuma J.J. et al. (1990). *Lancet* **336**, 1094-1096. 2). Vanlaere et al. 2009. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**, 102-111 3). Coenye, T., et al. 2002. *J Clin Microbiol* **40**: 2062-2069. 4). Mahentiralingham et al. 2000 *J Clin Microbiol* **38**, 3165-3173. 5). Dalmastri C., et al 2005. *FEMS Microbiol Lett.* **246**(1):39-45. 6). De Bruijn, F.J. 1992. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:2180-2187. 7). Donlan RM and Costerton J. W. 2002. *Clin Microbiol Reviews* **15**: 167-193. 8). Drevinek, P., et al. 2002. *Journal of Clinical Microbiology* **40**: 3485-3488. 9). Fauroux, B., et al. 2004. *J. Clinical Microbiol.* **42**: 5537-5541. 10). Helm, D., et al. 1991. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 69-79. 11). Henry, D., et al. 1997. *J. Clinical Microbiol.* **35**: 614-619. 12). Kirschner, C. et al. 2001. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 1763-1770. 13). Louws, F.J., et al. 1994. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 2286-2295. 14). McMenamin, J. D., et al. 2000. *Chest* **117**: 1661-1664. 15). Maquelin, K., et al. 2003. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 324-329. 16). Miller, M. B. and Gilligan, P. H. 2005. *Journal of Clinical Microbiology* **41**: 4009-4015. 17). Naumann, D. et al. 1991. *Nature* **351**: 81-85. 18). Naumann, D. 2002. *E. of Analytical. Chemistry. Jhon Wiley & Sons Ltd* 19). Nivens, D. 2001. *J. Bacteriol.* **183**: 1047-1057. 20). Payne, G. W., et al. 2002. *Appl. Environ Microbiol* **71**: 3917-3927. 21). Pollard, D. J. et al. 2001. *Bioprocess an Biosystems Engineering* **24**: 23-24. 22). Sandt, C. et al. 2003. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 954-959. 23). Schuster, K. C et al. 1999. *Vibrational Spectroscopy* **19**: 467-477. 24). Shelly, D. B., et al. 2000. *J. Clinical Microbiol.* **38**: 3112-3115. 25). Seo, Sang-Tea and Tsuchiya, K. 2005. *FEMS Microbiology Letters* **245**: 19-24. 26). Timelnot, K. et al. 2000. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 1599-1608. 27). Udelhoven, T. et al. 2003. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems.* **66**: 219-226. 28). Burdge, D. R. et al. 1995. *Clin. Infec. Dis.* **20**: 445-448.

b) *Biofilms microbianos:*

“Estudio sobre estrategias desarrolladas por organismos patógenos respiratorios para su persistencia en el hospedador Estudio de la respuesta fisiológica de B. pertussis en cultivos en biofilm” Proyecto X-534, correspondiente al Programa de Incentivos, otorgado por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de La Plata, 2009-2012. Participación: **co-directora.**

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas agudas como difteria, cólera y tuberculosis, que ocuparon la atención de los microbiólogos el siglo pasado, estaban causadas por organismos patógenos con mecanismos específicos de virulencia. Los antibióticos y vacunas desarrollados contra ellos, basados en estudios de células planctónicas, han tenido un importante éxito en su control. En la actualidad el primer plano en cuanto a procesos infecciosos lo ocupan bacterias ubicuas, capaces de producir infecciones de tipo crónico, que responden pobremente a los tratamientos con antibióticos y no pueden prevenirse por inmunización. El análisis directo de los tejidos afectados muestra que estas bacterias crecen adheridas a superficies en forma de biofilm. Dentro del biofilm las bacterias están protegidas de la acción de anticuerpos, del ataque de células fagocíticas y de los tratamientos antimicrobianos. Por lo tanto, es actualmente evidente que los magros resultados en el control de estas infecciones provienen de estudios que emplearon erróneamente células crecidas en medios líquidos. Esta realidad llevó a reorientar muchas investigaciones hacia el conocimiento de las características fenotípicas y estructurales que presentan las poblaciones microbianas cuando crecen adheridas a superficies. El conocimiento de los mecanismos desplegados por las bacterias para la adhesión y colonización de tejidos u otras superficies resulta esencial para implementar cualquier estrategia de control de estas poblaciones.

OBJETIVOS

El objetivo en esta temática en este período fue concluir con la redacción y publicación de un capítulo de un libro sobre biofilms de *Bordetella pertussis* cuyos trabajos experimentales habíamos realizado en períodos anteriores. Asimismo, finalizamos también la redacción de un trabajo que se realizó en cooperación con un grupo de la Universidad de Tucumán en el período 2010-2011 en el tema de tratamiento de infecciones crónicas por *Pseudomonas aeruginosas* en quemaduras empleando sobrenadantes de cultivo de lactobacilos.

RESULTADOS

Ambos trabajos fueron aceptados para su publicación (las correspondientes citas se encuentra descriptas en el punto 8).

c) *Fertilización asistida*

Diseño y Desarrollo de una Metodología no invasiva para la detección del potencial reproductivo de embriones humanos basada en Espectroscopía Infrarroja con transformada de Fourier combinada con Redes Neuronales Artificiales”.

Entre los mayores desafíos de la investigación actual en el campo de la fertilización *in vitro* (FIV) se encuentran el mejoramiento de la tasa de embarazo y la disminución en la prevalencia de gestaciones múltiples. El principal problema en limitar el número de embriones transferidos deriva de la dificultad en estimar con precisión el potencial reproductivo de embriones individuales dentro de una cohorte de embriones, siendo la evaluación morfológica de los mismos, la técnica de selección de embriones vigente en la mayoría de los centros de referencia de FIV. Sin embargo en los últimos años han surgido una serie de tecnologías adicionales para estimar el potencial reproductivo de los embriones, muchas de las cuales son aún objeto de investigación. Estas metodologías incluyen el dosaje de glucosa, lactato, piruvato, niveles de aminoácidos, consumo de oxígeno durante el cultivo de embriones, y más recientemente la evaluación de los perfiles genómicos y proteómicos de los embriones y la metabolómica de los cultivos (Gardner et al 2001; Brison et al. 2004, Devreke 2007; Seli E, 2008, Botros et al. 2008; Marhuenda-Egea, 2010). La metabolómica en particular, tiende a determinar el potencial reproductivo de un embrión a través de la evaluación del perfil metabólico del sobrenadante de cultivo de los embriones.

En la última década, la espectroscopía infrarroja (IR) ha tomado un importante protagonismo como técnica de biodiagnóstico no convencional (Naumann 2000). La espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) aplicada a materiales biológicos proporciona un reflejo de la composición química y estructural de los mismos. Los espectros de absorción de los biomateriales están representados por bandas anchas constituidas por una superposición compleja de picos originados por la absorción de sus constituyentes (proteínas, carbohidratos, lípidos y otros compuestos de bajo peso molecular), representando “huellas digitales” altamente específicas de los mismos (Nichols 1995; Naumann 2000). Debido a la complejidad inherente a la interpretación de los espectros y la asociada al desarrollo de sistemas de clasificación de los mismos en sistemas biológicos se hace necesario recurrir a la quemometría. Esta disciplina constituye la aplicación de métodos estadísticos y/o matemáticos a los espectros FT-IR con la finalidad de extraer la información contenida en los mismos (Schmitt 2001). La quemometría abarca las operaciones correspondientes al reprocesamiento espectral que involucra las pruebas de calidad espectral, normalización, la aplicación de técnicas de aumento de resolución, y el análisis espectral empleando técnicas estadísticas multivariantes basadas en metodologías de reconocimiento de patrones, como el análisis de cluster y/o redes neuronales artificiales.

El objetivo del presente trabajo fue realizar un estudio preliminar para analizar si el fingerprinting metabólico obtenido de espectros infrarrojos de sobrenadantes de cultivo de embriones permitiría discriminar su potencial reproductivo. A tales fines la información espectral fue analizada mediante un modelo estadístico multivariante que permitió discriminar distintos tipos de embriones. Por ser este el primer trabajo que estudia la aplicación de la espectroscopía IR en el desarrollo de métodos no invasivos para determinar la viabilidad de los embriones, se debió optimizar en una primera etapa un protocolo de trabajo estableciendo las posibles interferencias.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos fueron publicados en la revista de la Sociedad Argentina de Medicina Reproductiva (se indica la cita correspondiente en el punto 8).

En el marco de este proyecto se ha iniciado en el mes de abril de 2012 un trabajo conjunto entre PREGNA, CINDEFI y la consultora IECS (Instituto de efectividad clínica y Sanitaria). El mismo consiste en el diseño de un sistema informatizado de formularios (desarrollados bajo estándares internacionales) que funcionará en el entorno de Internet. Esta herramienta facilitará la recolección y el análisis de datos.

En el período noviembre 2011 - enero 2012 se elaboró un proyecto entre CINDEFI y PREGNA Medicina Reproductiva que fue presentado al concurso internacional "**Grant for Fertility Innovation**" **GFI-2012**, auspiciado por Merck-Serono.

Se completaron las bases y formuló un proyecto relacionado con esta temática. en inglés El proyecto fue premiado. El premio fue otorgado en Estambul, Turquía, julio de 2012 (Ver descripción en el punto 8).

8.- OTRAS ACTIVIDADES

8.1 PUBLICACIONES

8.1.1. TRABAJOS PUBLICADOS en el período informado

1.- Sebastián Oderiz, María J. Palau, Paula del Palacio, Miriam C. Lewis, Marisa P. Bettiol, Pablo Martina, **Alejandra Bosch**, Osvaldo M. Yantorno, Blanca M. Gatti.

Evaluación de los sistemas comerciales automatizados VITEK 2 y API 20NE para la identificación de organismos del Complejo *Burkholderia cepacia* aislados de muestras clínicas. *Revista Argentina de Microbiología*, **43**: 168-175, 2011. ISSN 1851-7617.

2.- Marcelo Garcea, Priscila Calderoli, Claudio Bisioli, Mariana Gómez Peña, Osvaldo Yantorno y **Alejandra Bosch**.

Perfil metabólico de embriones humanos con diferente potencial reproductivo mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)

Revista de la Sociedad Argentina de Medicina Reproductiva (SAMER). Reproducción 2011; 26:45-54. 2011

3.- Alberto N. Ramos, María E. Sesto Cabral, Diego Noseda, **Alejandra Bosch**, Osvaldo M. Yantorno, and Juan C. Valdez

Antipathogenic properties of *Lactobacillus plantarum* on *Pseudomonas aeruginosas*: The potencial use of its supernatants in the treatment of infected chronic wounds. *Wound Repair and Regeneration*. 2012. **20**: (4) 552-562.

8.1.2. CAPÍTULOS DE LIBROS

Natalia Cattelan, Pablo Martina, Laura Arnal, Diego O. Serra, Claudia Prieto, **Alejandra Bosch** y Osvaldo M. Yantorno.
ROL DE ADHESINAS EN LA FORMACIÓN Y ESTABILIDAD DE BIOFILM DE ORGANISMOS PATÓGENOS
Publicado en CD-ROM. Fecha de catalogación 22/06/2012
Editores Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA)
ISBN: 978-950-34-0857-5
Páginas: 1-9. 2012

8.1.3. TRABAJOS DE DIVULGACIÓN PUBLICADOS

Nota periodística. “**Premian avance platense para mejorar las técnicas de la fertilización asistida**”. Publicada por el Diario EL DIA de La Plata, 6 de Agosto de 2012, Sección LA CIUDAD, página 11 (completa). 2012.

8.1.4. TRABAJOS REMITIDOS PARA SU PUBLICACIÓN

Pablo Martina, Marisa Bettioli, Cecilia Vescina, Patricia Montanaro, María Constanza Mannino, Claudia Prieto, Carlos Vay, Dieter Naumann, Juergen Schmitt, Osvaldo Yantorno, Antonio Lagares, and Alejandra Bosch.
Genetic diversity of Burkholderia contaminans isolates from cystic fibrosis patients in Argentina.
Enviado a Journal Clinical Microbiology (ASM) en Junio de 2012.
Control number JCM01545-12.

8.1.5 TRABAJOS DE TRANSFERENCIA / EXTENSIÓN EFECTUADOS

2004-2012

Trabajo de transferencia de tecnología al Hospital de Niños Sor María Ludovica, en el marco Proyectos de Extensión de la Facultad de Ciencias exactas, de la Universidad Nacional de La Plata (http://www.unlp.edu.ar/articulo/2008/4/10/extension_apertura_institucional). Desde el año 2004 hemos realizado conjuntamente con el Dr. O. Yantorno trabajado en colaboración con el Hospital de Niños de La Plata en la temática: **Empleo de métodos espectroscópicos vibracionales y moleculares para identificar, caracterizar y realizar estudios de evolución de organismos del complejo *Burkholderia cepacia* aisladas de pacientes con fibrosis quística.** Estas investigaciones surgieron como propuesta de los laboratorios de Bacteriología de los diferentes hospitales nacionales a fin de cubrir necesidades asociadas a poder contar con técnicas alternativas, rápidas que permitieran identificar, caracterizar y diferenciar aislamientos de *B. cepacia* de pacientes fibroquísticos. En el curso de estos trabajos de extensión se desarrollaron técnicas y estrategias de estudio inéditas para el estudio de estos microorganismos a nivel mundial, las cuales fueron ya transferidas casi en su totalidad al sector hospitalario. Función dentro de estos proyectos:

Co-dirección y colaboración en tareas de coordinación, supervisión y -dirección de becarios de extensión.

8.3 ASISTENCIA A REUNIONES CIENTIFICAS/TECNOLOGICAS O EVENTOS SIMILARES

8.3.1. CONFERENCIAS DICTADAS

26 Junio 2012

Disertante en la mesa redonda: El laboratorio de microbiología en la enfermedad fibroquística: Recomendaciones del Grupo de Trabajo de la AAM. Congreso de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas – SADEBAC.
Conferencia: Cambios fenotípicos de *B. cepacia* en el curso de la infección crónica. Palais Rouge, Buenos Aires, Argentina.

9 de Agosto

Disertante en la mesa redonda de Microbiología en el paciente fibroquístico. Situación epidemiológica en Argentina y técnicas de diagnóstico molecular. II Congreso Argentino de Fibrosis Quística, realizado en el Hotel Sheraton Córdoba.

21 Octubre 2011

Conferencia por invitación: *Burkholderia contaminans* in cystic fibrosis: FT-IR spectroscopy-based study of phenotypic variation and diversity among isolates in long-term infection. **Workshop FT-IR Spectroscopy in Microbiological and Medical Diagnostics**, realizado en el Robert Koch-Institute, Berlin, Alemania

4 Julio 2012

Panelista en mesa redonda: “FT-IR data analysis, discussions with experts” en el **1st Brazilian Biophotonic Winter School**, realizado desde el 1ro al 7 de Julio de 2012 en la Universidad São José dos Campos, San Pablo, Brazil.

8.3.2- PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS - ENCUENTROS - JORNADAS Y SIMPOSIOS

2011

29 de Septiembre al 1 de Octubre

Presentación de un poster: DISTRIBUCIÓN DE MARCADORES DE TRANSMISIBILIDAD EN AISLADOS CLÍNICOS DEL COMPLEJO *BURKHOLDERIA CEPACIA* OBTENIDOS DE PACIENTES FIBROQUÍSTICOS. Martina P. Bettioli M. , Cazzola L. , Zappa M.E. , Montanaro P. , Yantorno O. , Bosch A.

XIV Jornada Argentina de Microbiología, III Jornada de Microbiología e Infectología del NEA organizada por la Asociación Argentina de Microbiología (AAM), llevada a cabo en Resistencia, Chaco, Argentina.

3 Octubre

Exposición oral: DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO EN FIBROSIS QUÍSTICA. Pablo Martina, Osvaldo Yantorno y Alejandra Bosch.

INNOVAR, Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva, realizado en Tecnópolis, Buenos Aires Argentina. Premios Innovar 2011 (\$5.000), Categoría Innovación Aplicada, otorgado por el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva (MINCyT).

20 -21 Octubre

Presentación poster: FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY AS A TOOL TO EVALUATE THE EFFECT OF *LACTOBACILLUS PLANTARUM* SUPERNATANT ON *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* BIOFILM DEVELOPMENT. Autores: Ramos, Alberto N. Bosch, Alejandra; Claudia Prieto, Valdez, Juan C.; and Yantorno, Osvaldo M. **Workshop FT-IR Spectroscopy in Microbiological and Medical Diagnostics**, realizado en el Robert Koch-Institute, Berlin, Alemania.

2012

4 de Julio

Presentación de Poster: FT-IR SPECTROSCOPY-BASED STUDY OF PHENOTYPIC VARIATION OF *BURKHOLDERIA CEPACIA* COMPLEX ISOLATES RECOVERED DURING LONG-TERM LUNG INFECTION OF CYSTIC FIBROSIS PATIENTS. Autores: Pablo Martina, Ailén Natale, Claudia Prieto¹, Dieter Naumann, Juergen Schmit, Antonio Lagares, Osvaldo Yantorno, and Alejandra Bosch.

1st Brazilian Biophotonic Winter School, realizado desde el 1ro al 7 de Julio de 2012 en la Universidad São José dos Campos, San Pablo, Brazil.

26 Julio

Presentación de poster: DIVERSIDAD GENOTÍPICA Y FENOTÍPICA DE AISLADOS CLÍNICOS DE ORGANISMOS DEL COMPLEJO *BURKHOLDERIA CEPACIA* RECUPERADOS DE INFECCIONES CRÓNICAS EN PACIENTES FIBROQUÍSTICOS. Autores: Pablo Martina, Ailen Natale, Marisa Betiol, Patricia Montanaro, Antonio Lagares, Osvaldo Yantorno y Alejandra Bosch

Congreso de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas – SADEBAC. Palais Rouge, Buenos Aires, Argentina.

9. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO

9.1 CARGOS DOCENTES

Jefe de Trabajos Prácticos, Dedicación Exclusiva, Área de Biotecnología, Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. (Exp: 700-8977).

10. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES.

10-1.- PREMIOS

-Premio **INNOVAR 2011**. Concurso Nacional de Innovaciones. Premio otorgado en la Séptima Edición del Concurso INNOVAR de la Secretaría de Planeamiento y Políticas de Ciencia e Investigación del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva (MINCyT).

Proyecto 10344: **"KIT DE DIAGNOSTICO MOLECULAR RAPIDO PARA COMPLEJO BURKHOLDERIA CEPACIA**. Autores: Pablo Martina, Osvaldo Yantorno y Alejandra Bosch. El premio fue otorgado en Tecnópolis, Buenos Aires Argentina. Categoría Innovación Aplicada, en Octubre de 2011. Premio: \$5.000

http://www.mincyt.gov.ar/noticias/noticias_detalle.php?id_noticia=296

-Premio Internacional "**Grant for Fertility Innovation**" **GFI-2012**. otorgado por Merck Serono. Proyecto: "**Fourier-Transform Infrared spectroscopy in metabolomics and its application to embryo assessment in IVF**". El proyecto, basado en el desarrollo de una metodología no invasiva basada en espectroscopía infrarroja para evaluar el potencial reproductivo de embriones humanos en fertilización asistida, fue otorgado en la 28 sesión anual de la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología en Estambul, Turquía, julio de 2012. Es un premio compartido por miembros de dos instituciones, CINDEFI, Facultad de Ciencias Exactas y PREGNA Medicina Reproductiva, Centro Médico de fertilización asistida. **Autores: Osvaldo Yantorno, Alejandra Bosch, Marcos Horton, Marcelo Garcea. Premio: Euros 190.000.**

http://www.grantforfertilityinnovation.com/en/gfi_2012/winners/winners.html
http://www.unlp.edu.ar/articulo/2012/8/6/premio_cientificos_fertilizacion_asistida

-Reconocimiento de la Honorable Cámara de Diputados de la Nación a través del Proyecto presentado por la Diputada de la Nación Dra. Olga E. Guzmán. Mediante el Expte: 5662-D-2012, la **Honorable Cámara de Diputados de la Nación da su beneplácito por la tarea llevada a cabo por profesionales del CINDEFI con motivo de las investigaciones llevadas a cabo en el campo de la Fertilización Asistida**. Mediante el Expte: 0700-013031/12-000, la facultad de Ciencias Exactas de la UNLP toma conocimiento y da su reconocimiento a la labor realizada por el Dr. Osvaldo Yantorno y la Dra. Alejandra Bosch y a su grupo de trabajo en la temática de Fertilización Asistida.

10.2. PARTICIPACIÓN EN SOCIEDADES ACADÉMICAS Y PROFESIONALES

Coordinadora del "**Grupo de Trabajo *Burkholderia Cepacia***" creado por la Asociación Argentina de Microbiología (AAM), desde Diciembre de 2007.

El "**Grupo de Trabajo *Burkholderia Cepacia***" constituye ámbito científico auspiciado por la Asociación Argentina de Microbiología que promueve la difusión de la información necesaria para realizar y optimizar el aislamiento, la identificación fenotípica y molecular, formas de erradicación de organismos pertenecientes al Complejo *Burkholderia cepacia* y difundirla en la comunidad científica, hospitalaria en la industria y la sociedad.

10.3. SUBSIDIOS RECIBIDOS

Proyecto de Investigación y/o Desarrollo (Proyecto X534) otorgado por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de La Plata en el marco del Programa de incentivos. Participación en la **Co-dirección** del Proyecto dirigido por el Dr. Osvaldo Yantorno. Título: Biofilms Bacterianos - Estudio sobre estrategias desarrolladas por organismos patógenos respiratorios para su persistencia en el hospedador.

Período 2009-2012. Monto total solicitado: \$ 15.500

Proyectos de Extensión de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. - Área Salud y Diagnóstico. Participación en la **Co-dirección** del Proyecto dirigido por el Dr. Osvaldo Yantorno. Título: "Empleo de métodos moleculares y espectroscópicos para la discriminación de organismos pertenecientes al complejo *Burkholderia cepacia* aislados de pacientes fibroquísticos y del ambiente. Implicaciones epidemiológicas". Subsidio: \$500 y un cargo de Ayudante Alumno rentado.

Período: 20011-2013.

Proyecto ANR 800/2011 del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva, Fondo Tecnológico Argentino (FONTAR), Convocatoria 2011. Proyecto aprobado **NA 183/11**: “Diseño y Desarrollo de una Metodología no invasiva para la detección del potencial reproductivo de embriones humanos basada en Espectroscopía Infrarroja con transformada de Fourier combinada con Redes Neuronales Artificiales”. Empresa: CENTRO DE FERTILIDAD BUENOS AIRES S.A. (PREGNA). Directores: Drs. Marcos Horton (PREGNA) y Osvaldo Yantorno (CINDEFI) . **Directores Técnicos:** Dres. Marcelo Garcea (PREGNA) y Alejandra Bosch (CINDEFI). Monto aprobado por FONTAR: \$ 798.000. Fondos Laboratorio CINDEFI: \$ 395.000.
Período: 2012-2015.

10.4. FORMACIÓN Y DIRECCIÓN DE RECURSOS HUMANOS

10.4.1. Tesis Doctorales terminadas y aprobadas

Título: Caracterización mediante marcadores moleculares y espectroscopia infrarroja de aislamientos del hongo *Fusarium graminearum*
Tesisista: Lic. Gisele Kikot
Director: Teresa Alconnada
Co-director: Alejandra Bosch
Beca: CONICET
Período: 2008-2012

10.4.2 Tesis Doctorales en curso

Título: Caracterización, discriminación e identificación de organismos de complejo *Burkholderia cepacia* aislados del tracto respiratorio de pacientes fibroquísticos mediante métodos moleculares y espectroscópicos vibracionales.
Tesisista: Lic. en Genética Pablo Martina
Director: Osvaldo Yantorno
Co-director: Alejandra Bosch
Beca: Beca Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, Proyecto PICT 2005, No 34836 (Período 2008-2010). CONICET- Tipo II (2011-2012)
Finalización estimada Diciembre 2012.

10.4.3. Dirección y/o Co-dirección de Becas de Extensión Universitaria

Estudiante: María Eugenia Zappa
Becaria de Proyecto de Extensión de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
Período: Octubre 2010-Marzo 2012
Director: Osvaldo Yantorno
Co-dirección: Alejandra Bosch
Tema: Identificación de bacterias pertenecientes al Complejo *Burkholderia cepacia* aisladas de pacientes fibroquísticos por métodos moleculares y espectroscópicos vibracionales

Estudiante: Ailen Natale

Becaria de Proyecto de Extensión de la Universidad Nacional de La Plata.

Período: Febrero 2010-Marzo 2013

Director: Alejandra Bosch

Co-director: Osvaldo Yantorno

Tema: Evaluación del fenotipo hipermutado en aislados clínicos de *Burkholderia*

contaminans recuperados de infecciones pulmonares crónicas de pacientes con fibrosis quística. Implicancias para el tratamiento antimicrobiano.

10.5. EVALUADOR DE TRABAJOS PARA PUBLICACIONES DE REFEREATO INTERNACIONAL

Evaluación de 1 trabajo científico para la revista de Elsevier, Journal of Microbiological Methos Enero 2012

Evaluación de 3 trabajos para la revista Journal of Environmental Microbiology, de la American Society of Microbiology ASM. Enero, Mayo y Junio de 2012