

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

MARÍA ALEJANDRA BOSCH

INFORME PERÍODO

Septiembre 2013 - Agosto 2014

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	12
	PUBLICACIONES, COMUNICACIONES, ETC	12
9.-	TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERÍODO	14
10.-	OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES	14



INFORME PERIODO 09/ 2013 a 08/2014.

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-Diciembre 2013

3. I) PROYECTOS DE INVESTIGACION EN LOS CUALES COLABORA

a) Caracterización molecular y fenotípica de aislamientos clínicos recuperados de infecciones pulmonares crónicas de pacientes fibroquísticos

- *“Caracterización de cambios fenotípicos asociados a la adaptación de organismos del Complejo Burkholderia cepacia durante la infección pulmonar crónica en pacientes fibroquísticos. Implicancias en la eficiencia del tratamiento antimicrobiano”*. Proyecto de la Secretaría de Extensión de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata (Participación: **Dirección**). Período: Marzo 2014- Diciembre 2016

-*“Biofilms como sistema de estudio de aislados clínicos del complejo Burkholderia cepacia recuperados de infecciones pulmonares crónicas en pacientes fibroquísticos”*

Proyecto correspondiente al Programa de Incentivos, otorgado por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de La Plata (Participación: **Co-dirección**). Período: 2013-2016.

c) **Aplicación de métodos espectroscópicos vibracionales en 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..... N° 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 50N°...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.

PROYECTOS:

- a) **Caracterización molecular y fenotípica de aislamientos clínicos recuperados de infecciones pulmonares crónicas de pacientes fibroquísticos**
- b) **Biofilms microbianos. Estudio sobre estrategias desarrolladas por organismos patógenos respiratorios para su persistencia en el hospedador.**

INTRODUCCIÓN

Ambos proyectos fueron planificados conjuntamente con profesionales del Laboratorio de Microbiología del Hospital de Niños “Sor María Ludovica” de La Plata, con el fin de avanzar en la resolución del problema al que se enfrentan en los últimos años los Hospitales públicos regionales, en relación a la definición del tipo de tratamiento antimicrobiano que se debe aplicar a los pacientes con fibrosis quística, cuando los mismos son colonizados a nivel pulmonar por organismos del complejo *Burkholderia cepacia*. Como consecuencia de nuestros trabajos, el Laboratorio de Microbiología del mencionado hospital, pudo tomar conciencia en los últimos años de que las bacterias que habían producido una devastadora colonización de los pacientes fibroquísticos que viven en la región, durante el período 2004-2005, no habían podido ser erradicados de los pacientes originalmente infectados, sino que por el contrario, continuaban presentes en muchas de las muestras de esputo estudiadas.

En períodos anteriores hemos desarrollado en el laboratorio diversas tecnologías y procedimientos analíticos que permitieron la identificación certera de organismos Gram-negativos multi-resistentes y en particular los pertenecientes al complejo *Burkholderia cepacia* que colonizan los pulmones de pacientes FQ. Asimismo, los estudios realizados permitieron desarrollar diversas herramientas para describir la epidemiología y distribución de las diferentes especies del complejo *B. cepacia* en la región.

Si bien con el correr del tiempo en algunos de los pacientes infectados fue posible erradicar la infección, en aproximadamente el 50 % de la población fibroquística infectada, estos microorganismos continuaron colonizando el pulmón de los pacientes de forma **crónica**. En resumen, como consecuencia de los trabajos llevados a cabo, pudimos establecer que desde el momento en que se desencadenó el pico de infecciones, mediado por organismos de este complejo en pacientes FQ en el año 2004, estas bacterias continuaron diseminándose entre los pacientes, en el ambiente y que además se habían establecido colonizando de forma crónica a un número significativo de pacientes.

Entre las causas que dificultan la erradicación de estas bacterias del pulmón del paciente FQ podemos mencionar: i) la particular característica fisicoquímica del pulmón y vías aéreas del paciente FQ, que llevan a la acumulación de abundante moco seco en este nicho que dificulta la eliminación de los microorganismos depositados, ii) las características de los organismos del Complejo *B. cepacia* de ser multi-resistentes a los antimicrobianos, y iii) la capacidad de estos organismos de formar biofilms. Para el caso de las infecciones crónicas producidas por *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes FQ, ha sido reportada la intervención de otros factores adicionales que dificultan la erradicación de estas bacterias y que llevan a la instalación de la infección crónica en sí. En este sentido, se ha reportado que estos organismos son capaces de implementar diferentes estrategias que les permiten por un lado evadir el ataque del sistema inmune del hospedador, y además los tratamientos antimicrobianos con le permiten a la población adaptarse y persistir en el hospedador. Entre las estrategias desplegadas por *P. aeruginosa* podríamos mencionar: conversión del fenotipo no mucoide a mucoide, pérdida de movilidad celular, inactivación de funciones de quorum sensing, aparición de “colonias pequeñas”, incremento en la tasa de mutaciones (con aparición de organismos hipermutadores), y disminución de la expresión de factores de

virulencia asociados a la infección aguda. A diferencia de la gran cantidad de trabajos reportados que describen las características fenotípicas y genotípicas de aislados clínicos de *P. aeruginosa* que colonizan de manera crónica pulmones de pacientes FQ, para el caso de organismos del complejo *B. cepacia*, de acuerdo a nuestro conocimiento, ha sido muy poco lo reportado a nivel internacional sobre este tema. Esta falta de conocimientos hace muy difícil la implementación de estrategias de eliminación de organismos del complejo *B. cepacia* que colonizan crónicamente a los pacientes FQ.

OBJETIVOS

Los objetivos planteados para el período 2013-2014 consistían en i) finalizar los experimentos relacionados al estudio de la tasa de mutación de aislados del Complejo *Burkholderia cepacia* recuperados de infecciones crónicas de pacientes FQ y el análisis de secuencia de los genes *mutS* y *mutL* asociados a la reparación de la síntesis del ADN (*Mismatch Repair System -MRS*) a fin de establecer si la hipermutación podría ser una posible estrategia adoptada por estas bacterias para persistir y adaptarse al ambiente del hospedador; ii) Finalizar los estudios de resistencia a antimicrobianos en todos los aislados disponibles recuperados de infecciones crónicas y analizar su posible correlación con la presencia de hipermutación; iii) continuar con el estudio de la diversidad fenotípica de los aislados recuperados de infecciones crónicas estudiando la expresión de factores de virulencia, la capacidad de formación de biofilms en superficies abióticas, la expresión fenotípica global a través de estudios de espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR); iv) Finalizar y discutir entre las diferentes contrapartes que participaron en esta investigación, Dra Andrea Smania del CIQUIBIQ, Universidad Nacional de Córdoba, el Dr. Antonio Oliver del Hospital Son Espases de Palma de Mallorca, España y los profesionales del Hospital de Niños de La Plata Sor María Ludovica, la redacción del trabajo a ser enviado a una revista de referato internacional.

Avanzar en el conocimiento de la población microbiana que coloniza de manera crónica los pulmones del paciente FQ permitirá alcanzar un mayor conocimiento de los mecanismos de resistencia a antibióticos, tratamiento antimicrobiano, evolución de resistencia a tales agentes, todos datos claves para la definición del tratamiento de estos pacientes. Los resultados a obtener serían transferidos directamente al sector salud.

METODOLOGÍA

Se describe la metodología que se ha implementado en este período

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%.

Determinación de la ocurrencia de cepas hipermutadoras

A fin de determinar la ocurrencia de cepas hipermutadoras en la población de aislados crónicos del complejo, en particular las pertenecientes a la especie *B. contaminans*, se estimó la frecuencia de mutación mediante el método del recuento de mutantes resistentes a rifampicina en medio MH-rifampicina (300 ug/ml) descrito por Oliver y col. (Oliver, A. et al. (2000) *Science* **288**, 1251-1253), empleando como control cepas de referencia previamente caracterizadas como no mutadoras así como cepas de *P.aeruginosa* mutantes en el gen *mutS* (obtenida del laboratorio de la Dra. Smania, Córdoba, CIQUIBIC). Cabe aclarar que aunque la tasa de mutación a través del análisis de fluctuación puede proporcionar mejores estimaciones del estado de mutagénesis de una célula (Foster, 2006 *Methods and Enzymol*), debido al gran número de aislados a analizar y a la gran laboriosidad de esta metodología se procedió al cálculo de la frecuencia de mutantes resistentes a rifampicina la que se considera proporcional a la estimación de frecuencias mutación.

Análisis de genes del sistema Mismatch Repair System (MRS)

Para explorar las bases genéticas del fenotipo hipermutador en cada uno de los aislados seleccionados en el punto anterior, se secuenciaron los genes del sistema de reparación de bases mal apareadas (MRS). Para ello, se emplearon las secuencias de genomas de especies CBc disponibles en el GenBank (NCBI) para el diseño de *primers* específicos para los genes *mutS* (código de genbank NC010804.1, NC011000.1) y *mutL* (NC008060.1, NC010804.1, NC009256.1), principales componentes de este sistema, para lograr su amplificación por PCR y posterior secuenciamiento. Se emplearon diferentes software para el análisis bioinformáticos: Vector NTI Advance10 (Invitrogen) y MEGA 4 (version 4.0).

Sensibilidad a agentes antimicrobianos. Determinación de la Concentración inhibitoria mínima.

Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) de antibióticos empleados en el tratamiento de las infecciones a nivel hospitalario para organismos del Complejo *B. cepacia*: Ciprofloxacina, Minociclina, Ceftazidima, Meropenem, Cotrimoxazol), por el método de microdilución en placa, siguiendo las pautas señaladas por el NCCLS. Para realizar las determinaciones de la CIM se empleó caldo Mueller Hinton ajustado con cationes. Para la sensibilización de las microplacas, se inocularon 50 µL de cada una de las diluciones del antibiótico en los pocillos. Los antibióticos fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. Cada uno de los pocillos se inoculó con 50 µL de una dilución 1:100, preparada en caldo Mueller Hinton, de una suspensión bacteriana 0.5 de la escala McFarland. Un pocillo sin adición de antibióticos se empleó como control de crecimiento. Las microplacas se incubarán en aerobiosis durante 20-24 h a 35°C. La CIM será determinada como la concentración más baja del antibiótico que inhibe el crecimiento de los microorganismos. La interpretación de sensible-resistente se obtiene comparando los resultados obtenidos con los valores de las tablas del NCCLS para los microorganismos analizados.

LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES A ESTOS TRABAJOS SE ENCUENTRAN EN EL MANUSCRITO QUE SE ENCUENTRA EN PRENSA Y SE ADJUNTA AL PRESENTE INFORME.

c) Aplicación de métodos espectroscópicos vibracionales en 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.

Objetivo

Ya optimizada la tecnología general de trabajo, puesto en marcha el nuevo espectrómetro automatizado adquirido en el marco de este proyecto, el objetivo propuesto para este período 2013-2014 fue analizar el fingerprinting metabólico obtenido de espectros infrarrojos de sobrenadantes de cultivo de embriones y determinar si el mismo contiene marcadores espectroscópicos asociados a la metabolómica de los embriones que permitan discriminar el potencial reproductivo de los embriones en una cohorte de embriones previo a su transferencia a la madre. Para alcanzar este objetivo nos propusimos en primer lugar construir dos bases de datos: i) que contuviera los datos relacionados con los pacientes (edad de la madre, motivo de la esterilidad, cantidad de embriones obtenidos, etc) la cual se desarrollaría de manera conjunta con un centro de estadística especializado IECS (Instituto de efectividad clínica y Sanitaria), y ii) otra base de datos constituida por espectros de

sobrenadantes de 3 días de cultivo de embriones con la cual se llevará a cabo estudios mediante la aplicación de modelos estadísticos sencillos como el análisis de cluster y más complejos como las redes neuronales artificiales.

METODOLOGÍAS Y RESULTADOS OBTENIDOS

Las actividades asociadas a estas investigaciones comienzan en el Centro de Fertilización Asistida Pregna donde se lleva a cabo la recuperación de óvulos y espermatozoides, obtención y cultivo de embriones (1 a 10 embriones por paciente), recolección y congelamiento de los sobrenadantes del cultivo de los embriones luego de 3 días de incubación, evaluación y selección de los embriones en base a su morfología, y la transferencia de 1 o 2 embriones seleccionados a la paciente (Figura 1).

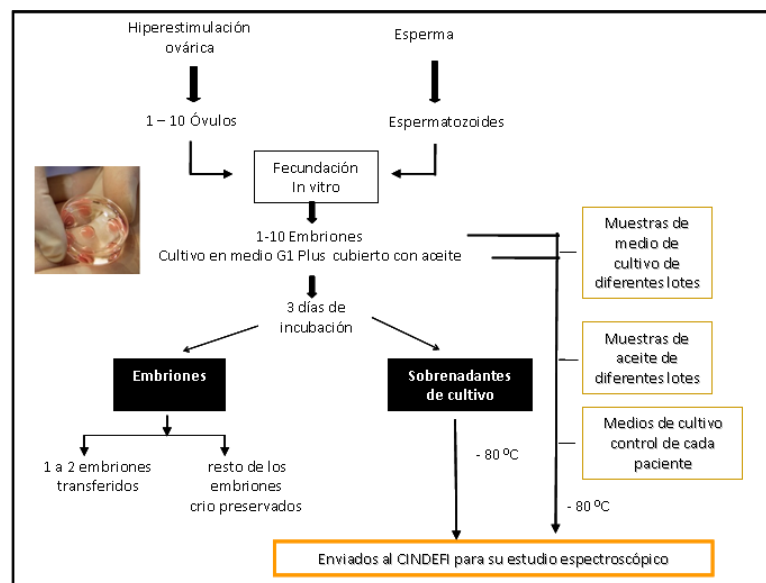


Figura 1. Esquema de trabajo y recolección de muestras en el Laboratorio de Fertilización Asistida (Pregna).

Durante el período informado se han reclutado 110 pacientes en el marco del presente estudio. A partir de los embriones de obtenidos de estos pacientes, se analizaron los correspondientes sobrenadantes de cultivo de 3 días de incubación.

- En el laboratorio de embriología del Centro de Fertilización Pregna se analizó también por microscopía la morfología de cada uno de los embriones obtenidos asignándoles una clase según la clasificación MI a MIV. Dentro de cada cohorte de embriones se seleccionaron para ser transferidos a la madre, de ser posible aquellos con morfología I o II.

Los resultados obtenidos fueron almacenados y organizados en la base de datos del **OpenClinica** La misma fue desarrollada por el Instituto de Efectividad Clínica y Sanitaria (IECS), los profesionales del Centro de Fertilización Asistida Pregna y el grupo del CINDEFI durante el período anterior. La base de datos del OpenClinica se encuentra disponible en el sitio <http://www.serveriecs.com/iecs2/pages/login/login>, al cual es posible acceder por claves personales. En esta base se encuentran almacenados hasta el presente, los datos clínicos correspondientes a 150 parejas, el número de embriones obtenidos para cada una de ellas (casi 600 embriones), las características morfológicas de cada uno de ellos, el destino de los embriones (si se transfirieron o si se criopreservaron), la calidad de la transferencia de el o los embriones a la madre, la evolución del procedimiento (número de embriones que implantaron), la evolución del embarazo, y los datos del recién nacido.

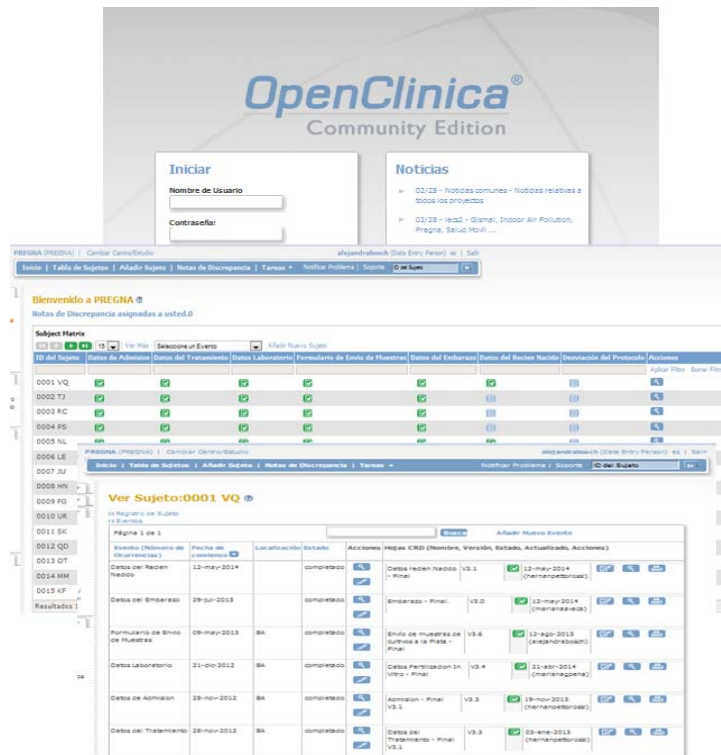
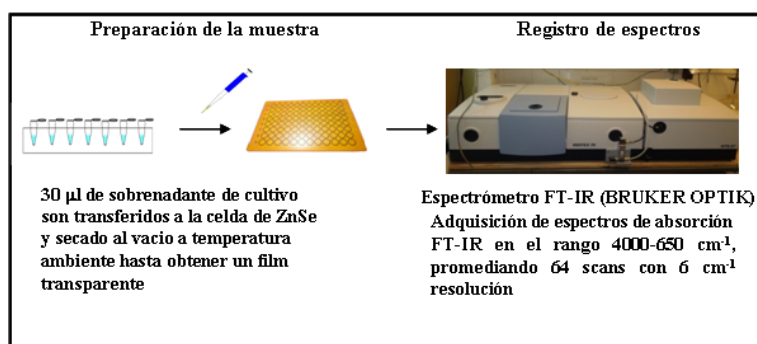


Figura 2. *Screenviews* de la base de datos del **OpenClinica** desarrollada por el Instituto de Efectividad Clínica y Sanitaria (IECS), los profesionales del Centro de Fertilización Asistida PREGNA y el grupo del CINDEFI. Disponible en el sitio <http://www.serveriecs.com/iecs2/pages/login/login>,

De acuerdo al organigrama de trabajo las actividades relacionadas al estudio espectroscópico de los sobrenadantes de cultivo continúan en el CINDEFI. Allí se procede a la preparación de la muestra para la lectura espectroscópica, el registro de los espectros FT-IR, el pre-tratamiento de los datos espectrales, y la construcción de la base de datos o librería espectral que permitirá posteriormente realizar el análisis de datos



-La preparación de las muestras y el registro de espectros se realizó en base al protocolo optimizado en el período anterior, de mismo modo el pre-tratamiento de los datos espectrales (aplicación del test de calidad espectral ii) de técnicas de aumento de resolución espectral (derivadas primera o segunda) y de una normalización vectorial.

-Con los espectros obtenidos se construyó y organizó una LIBRERÍA O BASE DE DATOS ESPECTRAL (Figura 5).

Espectros incluidos en la librería: hasta el presente, en el contexto de este proyecto, se han incluido casi 600 espectros adquiridos de los sobrenadantes de embriones recuperados de

las 150 parejas, 150 espectros correspondientes al medio de cultivo control que se obtiene para cada cohorte de embriones de cada paciente, 90 espectros provenientes de los diferentes lotes de medio de cultivo y 65 espectros adquiridos de muestras de los diferentes lotes de aceite empleados a lo largo del estudio.

Se EXCLUYERON de la librería espectral los espectros que no superaron el Test de calidad espectral establecido previamente.

Los espectros incluidos en la LIBRERÍA ESPECTRAL fueron organizados y clasificados en dos GRUPOS (A Y B) con 3 CLASES el GRUPO A y 4 CLASES el GRUPO B:

GRUPO A: Espectros infrarrojos correspondientes a sobrenadantes de cultivo que provienen de embriones que fueron TRANSFERIDOS. Este GRUPO de espectros es el que se empleará para desarrollar el modelo que permita establecer el potencial de implantación de los embriones. Los espectros contenidos en dicho grupo se clasificaron en 3 CLASES:

Clase I o positivos: Corresponde a los espectros de los sobrenadantes de cultivo de embriones que provienen de una transferencia en la que TODOS los embriones transferidos se implantaron positivamente.

Clase II o negativos: Corresponde a los espectros de sobrenadantes de cultivo de embriones que provienen de una transferencia en la que NINGUNO de los embriones transferidos se ha implantado.

Clase III: Incluye los espectros de los sobrenadantes de cultivo de los embriones correspondientes a una transferencia en la que un embrión implantó positivamente y el otro no implantó. Los espectros incluidos en esta Clase se emplearán en la última etapa del proyecto para fines de validación.

GRUPO B: Incluye a los espectros de sobrenadante de cultivo de embriones QUE NO HAN SIDO TRANSFERIDOS, es decir aquellos que fueron o bien criopreservados o transferidos a otro medio de cultivo para prolongar la incubación 2 días más. Estos espectros serán empleados para realizar un estudio adicional que permitirá establecer si existe alguna asociación entre la MORFOLOGÍA de los embriones y la metabolómica registrada a través de los espectros FT-IR. Este grupo está dividido en 4 subgrupos o clases (I a IV) de acuerdo a la morfología observada previo a su congelamiento (Morfologías I a IV, respectivamente (Anexo I, Figura 5).

Se estudió la homogeneidad, o similitud espectral dentro de cada Clase del GRUPO A, a través de la “distancia espectral”. Un conjunto de espectros caracterizados por una distancia espectral media pequeña ($d < 25$) indica que es una población homogénea, con poca varianza o dispersión, mientras que un conjunto de espectros caracterizado por una distancia espectral grande indica que es un grupo heterogéneo, con gran diversidad.

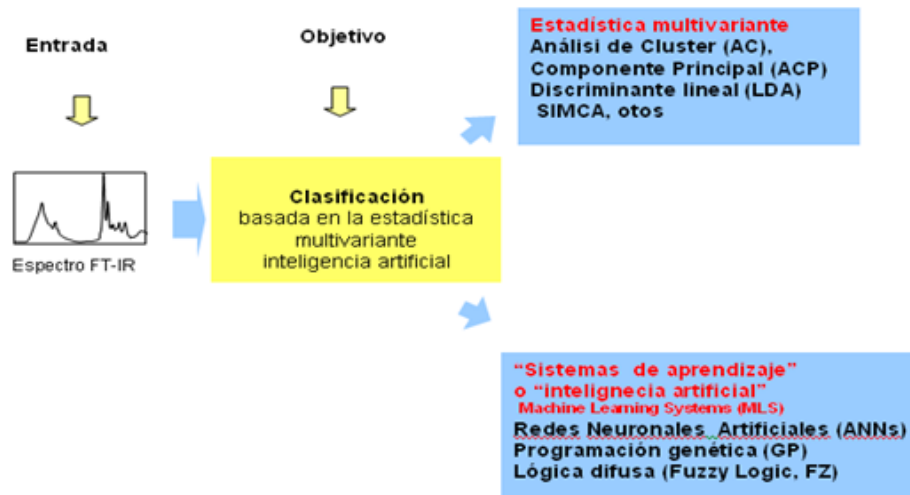
Se empleó el software Opus 7.0 para realizar el pre-tratamiento espectral y calcular las distancias espectrales medias y la respectiva varianza dentro de cada clase.

En este período se ha comenzado con el desarrollo y aplicación de los métodos de análisis espectral más sencillo como lo son los métodos estadísticos multivariantes no supervisados. Se aplicaron los métodos de análisis de patterns o patrones, tales como Análisis de Cluster (AC) o Análisis de Componente Principal (ACP) empleando las derivadas segundas normalizadas de los espectros.

i) *Análisis de cluster*. Es un método estadístico aplicado para analizar si existe alguna agrupación o estructura intrínseca dentro de los datos sin ningún tipo de clasificación o asignación previa de clases dentro de la población de estudio. Permite establecer la similitud, disimilitud, o diversidad global entre las muestras. A través de esta técnica es posible analizar la existencia o no de algún agrupamiento o estructura dentro de la población total. Dicho agrupamiento se grafica empleando dendogramas.

ii) *Análisis factorial*. Este método se basa en la extracción de información esencial del grupo de datos, para alcanzar una reducción de los mismos y facilitar la búsqueda de un patrón de agrupación, o clasificación dentro de la población. Este método no requiere, al igual que el AC una asignación previa de clases, sino que analiza la población como un todo.

Herramientas para el tratamiento de los datos



Se ensayaron ambos métodos, se analizó a través de ellos la diversidad global en diferentes ventanas espectrales (ventanas asociadas a absorción de grupos funcionales presentes en carbohidratos, lípidos, proteínas), aplicando diferentes combinaciones de ventanas y diferentes métodos de cálculo (coeficiente de Pearson, factorización, scaling to first range) agrupamientos (algoritmo de Ward, Av. Linkage, etc). Los sistemas aplicados no lograron discriminar de manera adecuada los espectros de sobrenadantes de embriones que resultaron en embarazos positivos de los que no se habían implantado. Ninguno de los sistemas o combinaciones empleado mostró una agrupación de los datos en dos categorías o clases. Esto podría deberse a que el número de muestras (principalmente los de clase I) no es aún suficiente (deben reclutarse mayor número de pacientes), y/o a que los sistemas de discriminación ensayados no son suficientemente robustos para discriminar los patterns de los espectros provenientes de clase I de los de clase II. De modo que en la segunda etapa de esta beca se continuará incorporando un mayor número de muestras y se ensayarán otros sistemas de discriminación más robustos, entre ellos, se aplicarán redes neuronales artificiales y máquinas de soporte vectorial

LOS RESULTADO ALCANZADOS EN ESTE PROYECTO SE ENCUNTRAN EN EL MARCO DE UN PROYECTO DE CONFIDENCIALIDAD POR LO CUAL SÓLO HAN TENIDO UNA DIFUSIÓN PARCIAL.

8.- OTRAS ACTIVIDADES

8.1 PUBLICACIONES

8.1.1. TRABAJOS PUBLICADOS en el período informado

Martina, P., Sofía Feliziani, Carlos Juan, Marisa Bettiol, Blanca Gatti, Osvaldo Yantorno, Andrea M. Smania, Antonio Oliver, **Alejandra Bosch**.

HYPERMUTATION IN *BURKHOLDERIA CEPACIA* COMPLEX IS MEDIATED BY DNA MISMATCH REPAIR INACTIVATION AND IS HIGHLY PREVALENT IN CHRONIC INFECTION IN CYSTIC FIBROSIS PATIENTS.

Trabajo en prensa. *International Journal of Medical Microbiology*

Disponible online: 28-AUG-2014 DOI: 10.1016/j.ijmm.2014.08.011 Agosto 2014.

8.1.5 TRABAJOS DE TRANSFERENCIA / EXTENSIÓN EFECTUADOS

2004-2014

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.

Estos proyectos surgieron como necesidad de los laboratorios de Bacteriología de los diferentes hospitales, de poder contar con técnicas alternativas, rápidas, que permitieran caracterizar y diferenciar aislamientos de *B. cepacia* de pacientes fibroquísticos. Función dentro de estos proyectos: Co-dirección y colaboración en tareas de coordinación, supervisión y co-dirección de becarios de extensión.

8.3 ASISTENCIA A REUNIONES CIENTIFICAS/TECNOLOGICAS O EVENTOS SIMILARES

2013

6-8 de Septiembre

Participación y dictado de una conferencia por invitación. Título: Fibrosis quística.

“I Congreso Nacional de Estudiantes de Ciencias Exactas” (ICoNECEx).
Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas, La Plata.

23 - 26 de septiembre

Presentación de un poster: EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN AISLADOS CLÍNICOS LOCALES DEL COMPLEJO BURKHOLDERIA CEPACIA
Pablo Martina, Marisa Bettiol, Blanca Gatti, Brenda Valeiras, Patricia Montanaro, Claudia Prieto, Osvaldo Yantorno y Alejandra Bosch

XIII Congreso Argentino de Microbiología organizado por la Asociación Argentina de Microbiología (AAM), realizado en el Palais Rouge ciudad Autónoma de Buenos Aires.

16 de octubre

Presentación oral: *Fourier-Transform Infrared spectroscopy in metabolomics and its application to embryo assessment in IVF*

Fígoli C, Garcea M, Bisioli C, Horton M, Yantorno O, Bosch A.

Fertility Experts Annual Meeting of the American Society for Reproductive Medicine, Boston, USA

22-23 Octubre

Participación en el dictado de una conferencia por invitación: Insights into *Burkholderia cepacia* complex long-term infections through FT-IR spectroscopy.
Brenda Valeiras, Pablo Martina, Claudia Prieto, Osvaldo Yantorno, and Alejandra Bosch.

9th International Workshop FT-IR Spectroscopy in Microbiological and Medical Diagnostics, realizado en el Robert Koch-Institute, Berlin, Alemania

27 de Noviembre

Conferencista Título: *FT-IR spectroscopy applied to the characterization and identification of respiratory tract bacteria down to the strain level.*

“Seminar on Vibrational Spectroscopy Applied to the Analysis of Biological Samples” llevado a cabo en el Centro Científico Tecnológico CONICET - LA PLATA, Argentina el 27 de Noviembre de 2013.

2014

11 al 14 junio 2014

-Presentación de Póster: Hypermutation in *Burkholderia cepacia* complex is highly prevalent in chronic respiratory infections of cystic fibrosis patients

A. Bosch, P. Martina, S. Feliziani, C. Juan, M. Bettioli, B. Gatti, B. Valeiras, O. Yantorno, A. Smania, A. Oliver.

-Presentación de Póster: *Burkholderia contaminans* in cystic fibrosis: genetic and phenotypic diversity among isolates from long-term infections.

A. Bosch, P. Martina, C. Prieto, B. Valeiras, M. Bettioli, P. Montanaro, O. Yantorno

“37th European Cystic Fibrosis Conference, organizada por la European Cystic Fibrosis Society, en Gothenburg, Suecia.

2 - 4 Julio

Presentación de un poster: Detection of *Burkholderia cepacia* epidemic strain marker (BCESM) and the cable pilin subunit gene (*cbIA*) in *Burkholderia contaminans* local isolates

Pablo Martina, Marisa Bettioli, Blanca Gatti, Brenda Valeiras, Patricia Montanaro, Claudia Prieto, Osvaldo Yantorno y Alejandra Bosch

“X Congreso de Microbiología General”, organizado por la Sociedad Argentina de Microbiología General (SAMIGe) realizado Mar del Plata

11-14 Agosto

-Presentación de un poster: ¿Nuevo miembro perteneciente al Complejo *Burkholderia cepacia*?

Martina P, Montanaro P, Valeiras B, Jacome J, Ferreras J, Yantorno O y Bosch Alejandra

-Presentación de un poster: Diseño de UNA Base de Datos virtual interactiva para el almacenamiento y manejo de datos asociados a organismos patógenos en laboratorios de microbiología

Prieto Claudia, Massillo Cintia, Valeiras Brenda, Martina Pablo, Yantorno Osvaldo, Blanca Gatti, Marisa Bettioli, Patricia Montanaro, María Laura Cazzola, Silvia Susana Perez, Fernando Rentería, Graciela Diez, Achiary Carlos Achiary Andrés, y Alejandra Bosch.

XV Jornada Argentina de Microbiología. Adelantos tecnológicos en el diagnóstico microbiológico, organizada por la Asociación Argentina de Microbiología (AAM), llevada a cabo en Córdoba. 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 Ciencia y Comunidad 2013. Dr. Pedro J. Carriquiriborde, en el **Área Desarrollo Social, Trabajo y/o Salud**- Otorgado por la Comisión de Investigaciones Científicas CIC PBA, Ministerio de Producción, Ciencia y Tecnología de la Provincia de Buenos Aires. Distinción a la Dra. Alejandra Bosch y el grupo de trabajo del CINDEFI por el impacto de su investigación en la mejora de calidad de vida de la población de la provincia de Buenos Aires. Premio \$ 50.000 (cincuenta mil pesos) y Diploma de Honor para el grupo de investigación. El premio fue otorgado el 20 de septiembre, 2013, en el Teatro Argentino de La Plata, en el marco del 1er Congreso Internacional Científico/tecnológico de la Provincia de Buenos Aires.

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 Desarrollo de Incentivos Docentes, otorgado por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de La Plata en el marco del Programa de incentivos. Título: Proyecto: BIOFILM COMO SISTEMA DE ESTUDIO DE AISLADOS CLÍNICOS DEL COMPLEJO BURKHOLDERIA CEPACIA RECUPERADOS DE INFECCIONES PULMONARES CRÓNICAS EN PACIENTES FIBROQUÍSTICO.

Director: OCo-directora: Alejandra Bosch. Periodo 2013-2016. Monto total anual: \$ 15.000

Proyecto de Extensión de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata- Área Salud y Diagnóstico. Título: *"Caracterización de cambios fenotípicos asociados a la adaptación de organismos del Complejo Burkholderia cepacia durante la infección pulmonar crónica en pacientes fibroquísticos. Implicancias en la eficiencia del tratamiento antimicrobiano"*.

Director: Alejandra Bosch. **Co-director:** Osvaldo M. Yantorno. Subsidio: \$6.000 y un cargo de Ayudante alumno por el período 2014-2016.

10.4. FORMACIÓN Y DIRECCIÓN DE RECURSOS HUMANOS

10.4.2 Tesis Doctorales en curso

-Título: Formación de biofilm por aislados clínicos de *Burkholderia contaminans* recuperados de infecciones pulmonares crónicas de pacientes con fibrosis quística. Respuestas adaptativas asociadas a la persistencia.

Tesista: Lic. en Genética Brenda Valeiras

Director: Alejandra Bosch

Osvaldo Yantorno: Co-director:

Beca: CONICET- Tipo I (2013-2015)

-Título: Desarrollo de una metodología no invasiva basada en espectroscopía Infrarroja, para la detección del potencial reproductivo de embriones previo a su transferencia en tratamientos de fertilización asistida

Tesista: Cecilia Beatriz Figoli

Director: Alejandra Bosch:

Director Técnico: Marcelo Garcea (PREGNA, Medicina Reproductiva)

Beca: CONICET- cofinanciada con empresa Tipo I (2013-2015).

10.4.3 Tesinas y pasantes de grado finalizadas

a.- Tesinas finalizadas

Alumnos: Leandro Caporalle

Detección e identificación directa y simultánea de especies del género *Pseudomonas* y del Complejo *Burkholderia cepacia* en muestras de esputo de pacientes fibroquísticos.

Facultad de Genética, Universidad Nacional de San Luis.

Director: Alejandra Bosch.

Período: julio 2013 – Junio 2014

10.4.4 Tesinas y pasantes de grado en curso

Alumna: Mariana Leguizamon

Título de la Tesina: Evaluación de la presencia de marcadores de transmisibilidad, BCESM (*Burkholderia cepacia* epidemic strain marker) y *cblA* (cable pilin subunit gene) en aislados clínicos del complejo *Burkholderia cepacia* obtenidos de pacientes fibroquísticos

Carrera: Bioquímica, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata,

Director: Alejandra Bosch. Co-dirección: Claudia Prieto

Período: Mayo - Diciembre 2014

Profesional Formado: Juliana Palau

Bioquímica de planta de la Sala de Microbiología del Hospital de Niños de La Plata Sor María Ludovica.

Proyecto: Caracterización genética y fenotípica de aislados clínicos recuperados de infecciones pulmonares crónicas en pacientes fibroquísticos y colaboración en la construcción de la base de datos CFC database.

Período: Septiembre 2014- Diciembre 014

Director: Alejandra Bosch

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

-Estudiante: Cintia Lorena Massillo

Becaria de Extensión de la Universidad Nacional de La Plata.

Proyecto: Cconstrucción de una base de datos virtual conteniendo información sobre características moleculares y sensibilidad a antimicrobianos de organismos patógenos circulantes en la región, en particular asociado a las infecciones de pacientes fibroquísticos.

Período: Mayo 20113-Diciembre 2014

Director: Alejandra Bosch

10.5. ORGANIZACIÓN DE EVENTOS CIENTÍFICOS - VISITAS DE INVESTIGADORES

Organización, del Seminario "***Seminar on Vibrational Spectroscopy Applied to the Analysis of Biological Samples***". El Seminario consistió en una jornada de trabajo sobre la aplicación de espectroscopía infrarroja y Raman al estudio de muestras biológicas (proteínas, microorganismos, fluidos biológicos, etc.). Dicho evento, fue organizado de manera con la Dra. Evelina Ferrer, I CEQUINOR, Facultad de Ciencias Exactas UNLP. El evento contó con la participación del Profesor Visitante ***Dr. Dieter Naumann del Robert Koch Institute de Berlín, Alemania*** como principal disertante. El mismo se llevó a cabo el 27 de noviembre de 2013 en Centro Científico Tecnológico CONICET - LA PLATA, Calle 8 No 1467 entre 62 y 63

10.6. ESTADÍAS DE ENTRENAMIENTO Y/O VISITAS EN TEMAS ESPECÍFICOS EN LABORATORIOS DEL EXTERIOR

Junio 2014

Visita al ***Norwegian University of Life Sciences, Department of Mathematical Sciences and Technology***, y al ***Nofima Institute***, Norway invitada por el Prof. Dr. Achim Kohler y la Dra. Volgha Sephadal. Durante la visita a la Universidad y el laboratorio de investigación se analizaron y discutieron los resultados obtenidos en nuestro laboratorio durante el período 2013 – 2014 en el tema del desarrollo de un método basado en espectroscopía infrarroja para la determinación del potencial de implantación de embriones en tratamientos de fertilización asistida. En dicha estadía se trabajó en métodos de análisis de espectros multivariantes alternativos a las redes neuronales artificiales.