



Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco  
" 2017 - Año de las Energías Renovables "

Facultad de Ciencias Naturales y  
Ciencias de la Salud

Comodoro Rivadavia, 28 de junio de 2017.-

VISTO:

La nota entrada a FCN. N° 1934/17, y

CONSIDERANDO:

Que en la misma se propone la incorporación fuera de término de una asignatura Optativa/Electiva para el ciclo lectivo 2017 para el plan de estudios de la carrera de BIOQUIMICA, (Res. Min. de Educ. N° 071/08).


Que el tema fue tratado en la III sesión ordinaria de este Cuerpo el 23 de junio ppdo. y aprobado por unanimidad.-

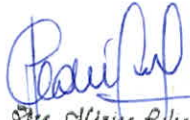
POR ELLO, EL CONSEJO DIRECTIVO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES y  
CIENCIAS DE LA SALUD  
RESUELVE

Art. 1°) Aprobar la Actividad **Optativa/Electiva** de la carrera de BIOQUIMICA para el ciclo lectivo 2017, que figura en el anexo que forma parte integrante de la presente resolución.

Art. 2°) Regístrese, incorpórese al expediente de la carrera, notifíquese a los departamentos de Docentes y Alumnos, y cumplido archívese.-

**RESOLUCION CDFCNyCS. N° 286/17.-**

  
Dra. Fabiana Patricia Ferreras  
Secretaría Académica  
Facultad de Ciencias Naturales y Cs. de la Salud  
U.N.P.S.J.B.

  
Dra. Mónica Liliana Freilo  
Decana  
Facultad de Cs. Naturales y Cs. de la Salud  
U.N.P.S.J.B.



**ANEXO – Cpd. R.CDFCNyCS. N° 286/17.-**

**ASIGNATURA OPTATIVA/ELECTIVA – CICLO LECTIVO 2017.-**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA**

	<b>NOMBRE</b>	<b>DOCENTE</b>	<b>CARGA HORARIA TOTAL</b>	<b>REQUISITOS PREVIOS</b>	<b>CUATRIM.</b>
1	Respuesta fisiológica de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> cepa PAT10 sometido a diferentes condiciones de estrés abiótico.	Dra. Silvia Estevao Belchior	100 horas	Epistemología y Metodología de la Investigación científica y Tecnológica. Fisiología. Química Biológica II. Química Analítica II. Biología Molecular y Genética. Microbiología Clínica.	Primer cuatrimestre

**Proyecto de Actividad Optativa Electiva:**

**Introducción**

*Corynebacterium pseudotuberculosis* es una bacteria Gram-positiva, filogenéticamente y patogénicamente relacionada con especies de los géneros *Nocardia*, *Mycobacterium* y *Rhodococcus* conformando el Grupo CNMR. Estos actinomicetos están relacionados taxonómicamente y son agentes causales de infecciones granulomatosas que afectan a humanos y animales. Para estos géneros se informaron largos períodos de supervivencia fuera del huésped en condiciones ambientales adversas como el estrés hídrico y bajas concentraciones de nutrientes. Por otra parte, varias especies pertenecientes al grupo CNMR son patógenos intracelulares facultativos y se encuentran en el interior de los macrófagos en el huésped, durante el proceso de infección. En este hábitat las bacterias se exponen a condiciones que afectan negativamente el metabolismo y dañan las macromoléculas. Los factores de estrés intracelular incluyen choque térmico, oxidativo, osmótico y acidez. Además en el ambiente fuera del huésped, también las bacterias pueden encontrarse bajo tensiones como la deshidratación, bajo contenido de nutrientes, etanol y radiaciones UV. Sin embargo, las bacterias logran sobrevivir, debido a una respuesta inmediata, adecuada y protectora que se refleja inicialmente por los cambios en la transcripción un conjunto específico de genes. Estos cambios les permiten sintetizar una serie de compuestos en respuesta a los estímulos adversos. La resistencia a las diferentes tensiones ambientales intra y extracelulares, se asocia con la capacidad de las bacterias patógenas para sobrevivir en el huésped y fuera de él.





**ANEXO – Cpde. R.CDFCNyCS. N° 286/17.-**

**Objetivo general**

El objetivo de este trabajo es estudiar, bajo condiciones controladas de laboratorio, la supervivencia y los mecanismos de adaptación fisiológica de *C. pseudotuberculosis* sometido a estrés etanólico, osmótico, oxidativo, acidez, etanólico y radiaciones ultravioletas.

**Objetivos parciales**

Estudiar, bajo condiciones controladas de laboratorio, la supervivencia de *C. pseudotuberculosis* frente distintas situaciones de estrés.

Investigar los mecanismos fisiológicos de adaptación que desarrollan las bacterias sometidos a diferentes situaciones de estrés

**Actividades a desarrollar:** Se proponen las siguientes actividades, que la alumna desarrollará en el marco de la aplicación del método científico:

1. **Búsqueda bibliográfica sobre el tema a desarrollar.**
2. **Determinación de la supervivencia bacteriana bajo condiciones de estrés, térmico, osmótico, oxidativo, acidez, etanólico y exposición a radiaciones ultravioletas:** Con esta actividad se desea lograr que la alumna comprenda y desarrolle la metodología correspondiente desde el cálculo de materiales y reactivos, la preparación de los mismos, la puesta a punto de la técnica y desarrollo.
3. **Comparación y correlación de los resultados obtenidos.** El alumno deberá analizar los resultados obtenidos y discutirlos, utilizando bibliografía referente al tema, para elaborar conclusiones acordes al objetivo planteado. Esta actividad comprende el análisis de resultados aplicando herramientas de estadística descriptiva. De acuerdo a la distribución de las variables, paramétricas o no paramétricas, se aplicará el test de ANOVA. La probabilidad  $p < 0,05$  se considerará estadísticamente significativa.
4. **Elaboración del informe.**

**Materiales y Métodos:**

**Cepas a ensayar y condiciones de cultivo:**

Se trabajará con una cepa ya identificada de *C. pseudotuberculosis* cepa PAT 10.

*C. pseudotuberculosis* PAT10 corresponde a un aislamiento procedente de un nódulo en pulmón de un ovino de la Patagonia con linfadenitis caseosa (LAC) (Estevao Belchior et al. 2007).

**Tolerancia a situaciones de estrés: térmico, osmótico, oxidativo, acidez, etanólico y exposición a radiaciones ultravioletas.** Para esta meta se considerarán las técnicas propuestas en Alvarez et al. 1996; Bastos et al. 2012, Estevao Belchior et al. 2017; Pinto et al. 2014.

Las diferentes condiciones de estrés se aplicarán a células bacterianas en fase exponencial (48 h) y estacionaria (96 h) de cultivo y en desecación.

-Para las células en fase exponencial y estacionaria, luego de los cultivos correspondientes las células se lavarán con solución fisiológica (SF) estéril. El pellet obtenido por centrifugación, se lavará con solución fisiológica y se preparará una suspensión 1 McFarland. Alícuotas de 20  $\mu$ l se inocularán en 19,8 ml de caldo Mueller Hinton (MH).

BB  
—  
PF



**ANEXO – Cpde. R.CDFCNyCS. N° 286/17.-**

-Para obtener células en desecación, el pellet, obtenido por centrifugación de un cultivo en caldo de 48 h, lavado con SF estéril, se colocará sobre portaobjetos estériles dentro de placas de petri estériles. Se incubará por 5 días en condiciones de desecación (30°C y 20% de humedad relativa). Luego de la desecación se recolectaran las células y se resuspenderán en SF estéril hasta una concentración 1 McFarland.

Para cada uno de los estados bacterianos, se aplicarán diferentes condiciones de estrés:

- Estrés etanólico, por la adición de etanol al 96% a una concentración final de 9%(v/v).
- Estrés osmótico, por adición de una NaCl a una concentración final de 2,7 M.
- Estrés térmico, se someterá la suspensión de las células bacterianas a 47°C.
- Estrés oxidativo, por la adición de peróxido de hidrógeno en una concentración de 360µM.
- Exposición a radiaciones UV bajo lámpara (longitud de onda 253 nm).
- Exposición a pH ácido: se someterá la suspensión de las células bacterianas a pH5.

Se realizarán recuentos a distintos tiempos (0, 60 min, 120 min y 180 min) para cada condición. Los recuentos se realizarán por triplicado y se expresarán como promedio de log<sub>10</sub> UFC/ml. Se obtendrán los porcentajes de supervivencia con sus respectivas desviaciones estándar (DE).

**Análisis estadísticos:** De acuerdo a la distribución de las variables, paramétricas o no paramétricas, se aplicará el test de ANOVA. La probabilidad  $p < 0,05$  se considerará estadísticamente significativa (Pagano y Gauvreau, 2001).

**Desarrollo de informe:** Los resultados serán evaluados, mediante informes periódicos, con el propósito de considerar los avances logrados y se analizarán las dificultades detectadas a fin de implementar las correcciones necesarias.

**Bibliografía consultada:**

Alvarez HM, Mayer F, Fabritius D and Steinbüchel A. 1996. Formation of intracytoplasmic lipid inclusion by *Rhodococcus opacus* PD630. Arch Microbiol, 165:377–386.

Alvarez HM, Silva RA, Cesari AC, Zamit AL, Peressutti SR, Reichelt R, Keller U, Malkus U, Rasch C, Maskow T, Mayer F, Steinbüchel A. 2004. Physiological and morphological responses of the soil bacterium *Rhodococcus opacus* strain PD630 to water stress. FEMS Microbiol Ecol, 50: 75-86.

Alvarez L, William A, Castro I, Valenzuela F, Estevao Belchior S (c). 2017. Capacidad de supervivencia de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en distintos suelos de la provincia de Chubut, Patagonia Argentina. Rev. Argent. Microbiol. 2017; 49(1):105-109. DOI: 10.1016/j.ram.2016.09.004

Bastos BL, Dias Portela RW, Dorella FA, Ribero D, Seyffert N, Castro TL, Miyoshi A, Oliveira SC, Meyer SC, Azevedo V. 2012. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: inmunological responses in animal models and zoonotic potential. J Clin Immunol S4:005. doi:10.4172/2155-9899,S4005.

Estevao Belchior S, Alvarez HM, Álvarez L, William A, Ceballos G. 2016.

Handwritten initials in blue ink, possibly "BO" and "AF".





Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco  
"2017 - Año de las Energías Renovables"

Facultad de Ciencias Naturales y  
Ciencias de la Salud

Hoja N° 4/4

**ANEXO – Cpde. R.CDFCNyCS. N° 286/17.-**

Informe final de PI UNPSJB 1022: Estudios de resistencia a estrés ambientales en aislamientos *Corynebacterium pseudotuberculosis* y *Rhodococcus equi*, agentes causales de enfermedades zoonóticas. Estado: Aprobado.

Estevao Belchior S, Gallardo A, Abalos A, Díaz Y, Álvarez L, Callejo R, Prieto M, Jodor N, Jensen O. 2007. Diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep from Patagonia. Rev Arg Microbiol, 39:44-46.

Estevao Belchior S, Gallardo A, Ábalos A, Jodor N, Jensen O. Actualización sobre linfadenitis caseosa: el agente etiológico y la enfermedad. Rev Vet Arg 2006; 23: 258-78.

Miles AA and Misra SS. 1938. The estimation of the bactericidal power of the blood. J. Hygiene, 38:732-49.

Pagano M, Gauvreau K. Fundamentos de Bioestadística. 2001. 2° ed. International Thomson Editores SA de C.V. México

Pinto AC, Caracciolo Gomes de Sá PH, Ramos RTJ, Barbosa S, Barbosa HPM, Ribeiro AC, Silva WM, Souza Rocha F, Passos Santana M, Castro TL, Miyoshi A, Schneider MP, Silva A and Azevedo V. 2014. Differential transcriptional profile of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in response to abiotic stresses. BMC Genomics 15:14. doi:10.1186/1471-2164-15-14.

Teixeira Cerdeira L, Cybelle Pinto A, Cruz Schneider MP, Silva de Almeida S, Rodrigues dos Santos A, Vieira Barbosa EG, Ali A, Silvanira Barbosa M, Ribeiro Carneiro A, Jucá Ramos RT, Oliveira dos Santos R, Barh D, Barve N, Zambare V, Estevão Belchior S, Guimarães LC, de Castro Soares S, Carvalho de Abreu VA, Tauch A, Trost E, Miyoshi A, Azevedo V, Silva A. Whole genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* PAT10 strain isolated from sheep in Patagonia, Argentina. J Bacteriol, 193:6420–6421.

\*\*\*\*\*

lg  
—  
P