

# CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO Informe Científico<sup>1</sup>

PERIODO <sup>2</sup>: 2013

Legajo N°:

## 1. DATOS PERSONALES

*APELLIDO:* Mendieta

*NOMBRES:* Julieta Renée

*Dirección Particular: Calle: N°:*

*Localidad:* Mar del Plata *CP:* 7600 *Tel:*

*Dirección electrónica (donde desea recibir información):* jumend@mdp.edu.ar

## 2. TEMA DE INVESTIGACION

Aplicaciones biotecnológicas del inhibidor de proteasas tipo germina (IPG). Análisis de su actividad antimicrobiana y antitumoral

## 3. DATOS RELATIVOS A INGRESO Y PROMOCIONES EN LA CARRERA

*INGRESO: Categoría:* Asistente *Fecha:* 1/7/2010

*ACTUAL: Categoría:* Asistente *desde fecha:* 1/7/2010

## 4. INSTITUCION DONDE DESARROLLA LA TAREA

*Universidad y/o Centro:* Universidad Nacional de Mar del Plata

*Facultad:* Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

*Departamento:* Instituto de Investigaciones Biológicas

*Cátedra:* Laboratorio “Degradación de Proteínas”

*Otros:*

*Dirección: Calle:* Funes *N°:* 3550

*Localidad:* Mar del Plata *CP:* 7600 *Tel:* 4753030

*Cargo que ocupa:* Investigador Asistente CIC-BA

## 5. DIRECTOR DE TRABAJOS. (En el caso que corresponda)

*Apellido y Nombres:* Rubén Danilo

*Dirección Particular: Calle: N°:*

*Localidad: Mar del Plata CP: 7600 Tel:*

*Dirección electrónica:* rdconde@mdp.edu.ar

<sup>1</sup> Art. 11; Inc. “e” ; Ley 9688 (Carrera del Investigador Científico y Tecnológico).

<sup>2</sup> El informe deberá referenciar a años calendarios completos. Ej.: en el año 2008 deberá informar sobre la actividad del período 1°-01-2006 al 31-12-2007, para las presentaciones bianuales.

.....  
Firma del Director (si corresponde)

.....  
Firma del Investigador

**6. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO.**

*Debe exponerse, en no más de una página, la orientación impuesta a los trabajos, técnicas y métodos empleados, principales resultados obtenidos y dificultades encontradas en el plano científico y material. Si corresponde, explicita la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.*

A continuación se expone la labor desarrollada en el periodo enero-diciembre 2013. Cabe destacar que dicha labor se compone de dos proyectos de investigación: uno correspondiente a un proyecto de ciencia básica con posible aplicación a mediano/largo plazo correspondiente al plan de investigación con el cual ingresé a la CIC como investigadora asistente y un segundo proyecto de tipo I+D llevado a cabo de forma paralela en colaboración con la Dra. Casalongué.

Título de proyecto presentado para ingreso a carrera CIC: Aplicaciones biotecnológicas del inhibidor de proteasas tipo germina (IPG). Análisis de su actividad antimicrobiana y antitumoral

Título del tema investigado: Estudio de las propiedades antimicrobianas y los efectos sobre células de mamíferos del Inhibidor de Tripsina tipo Germina de Trigo (IPG)

Objetivo General: Analizar las propiedades antimicrobianas de la proteína IPG sobre patógenos vegetales y evaluar sus efectos sobre cultivos de células de mamíferos.

**- Inhibidor de proteasas tipo germina de trigo (IPG)**

El Inhibidor de Proteasas tipo Germina (IPG) es un inhibidor de tripsina que se aisló en nuestro laboratorio a partir del fluido extracelular de hojas de trigo y su segmento N-terminal resultó ser homólogo a una *Germin-like Protein* (GLP). Este inhibidor presenta además, otras actividades enzimáticas como superóxido dismutasa (SOD) y actividad de adenosina difosfato glucosa pirofosfatasa (AGPP), caracterizando a esta proteína como una proteína multifuncional. Estas características multifuncionales, junto con los antecedentes bibliográficos de otros inhibidores de serin proteasas de plantas que presentan actividad antimicrobiana y diversos efectos sobre células de mamíferos han permitido plantear los siguientes objetivos:

OBJETIVO 1: Estudiar la actividad antimicrobiana *in vitro* del IPG sobre las estructuras reproductivas de los siguientes patógenos de plantas: *Fusarium solani* (hongo), *Phytophthora infestans* (oomycete) y *Pseudomonas syringae* (bacterias). (Este objetivo fue informado parcialmente en el informe anterior y ha sido completado en este período)

OBJETIVO 2: Determinar el posible mecanismo de acción mediante el cual IPG ejerce su acción antimicrobiana (Este objetivo fue propuesto en el informe anterior y ha sido alcanzado en este período).

OBJETIVO 3: Producir en forma recombinante la IPG de trigo (IPGr) (este objetivo fue propuesto en el informe anterior y ha sido alcanzado en este período)

OBJETIVO 4: Analizar *in vitro* el efecto antifúngico del IPGr sobre esporas de *F. solani*, comparativamente con IPG (este objetivo fue propuesto en el informe anterior y ha sido alcanzado en este período).

OBJETIVO 5: Analizar los efectos biológicos de IPG sobre células de mamíferos. (Objetivo desarrollado en este período).

**En resumen y tal como se describirá a continuación, los objetivos propuestos en el informe anterior fueron completados en su totalidad. Además, en este periodo también ha sido posible plantear y llevar a cabo un nuevo objetivo (objetivo 5).**

**OBJETIVO 1 y 2**

**Efecto antifúngico y mecanismo de acción de IPG sobre el hongo *F. solani***

La proteína IPG inhibió la germinación de las estructuras reproductivas de *F. solani* manera dosis dependiente. El inhibidor de tripsina comercial no inhibió la germinación incluso en la concentración más alta ensayada. Los valores de IC50 (dosis en la que se observa un 50% de inhibición de la germinación), resultó ser de 750 µg/ml para *F. solani*. Se avanzó en el estudio del mecanismo de acción de IPG sobre este hongo. El tratamiento de las

esporas con IPG y Sytox Green, un fluoróforo que marca daño de membrana plasmática, indica que el efecto de IPG no implica la desestabilización de la membrana. Además, el desarrollo de las esporas pretratadas con IPG en medio de cultivo fresco indica que el efecto de IPG es de retraso y/o inhibición del crecimiento pero no de muerte celular. Estos datos condujeron a pensar que el IPG podría estar ejerciendo un efecto inhibitorio de una/s proteasa/s excretada/s por el hongo esencial/es para su crecimiento o desarrollo. Así, el extracto extracelular de cultivos líquidos de *F. solani* tratados con IPG, indicaron que este inhibidor de proteasas es capaz de inhibir en aproximadamente 50 % la actividad azocaseinolítica total.

Por otra parte, se realizó un ensayo *in vivo* con el fin de evaluar el efecto de IPG sobre la capacidad infectiva de *F. solani* en plántulas de tomate. Se llevó a cabo un bioensayo según describen Mansilla y col (2013) donde una suspensión de esporas previamente tratadas durante 16 horas con 500 µg/ml de IPG se utilizó para infectar plántulas de tomate. Los tratamientos realizados con las mismas concentraciones de IPG pero en ausencia del patógeno no evidenciaron síntomas de infección sobre los cotiledones lo que indica que IPG no afecta el estado general del cotiledón. Por otra parte, *F. solani* es capaz de infectar cotiledones de tomate, visualizándose notorios síntomas de infección en los tratamientos sin IPG. La cuantificación del área afectada mostró que el ~70% del cotiledón presentó síntomas de infección. El tratamiento de las esporas con IPG mostró un área afectada del cotiledón de sólo un 5 %. Por lo tanto, IPG ejerce un efecto sobre la capacidad infectiva de las esporas de *F. solani* en cotiledones de tomate.

#### **Efecto antimicrobiano de IPG sobre *Phytophthora infestans***

Teniendo en cuenta el efecto sobre las estructuras reproductivas de *F. solani*, se decidió investigar la actividad antimicrobiana de IPG sobre otro patógeno de plantas: el oomicete *P. infestans*. Una concentración de 500 µg/ml de IPG inhibió la germinación del 80% de los esporangios. Los esporangios que no habían germinado presentaron lisis en la zona del ápice. El tratamiento realizado con el inhibidor de tripsina comercial mostró que los esporangios germinaron en su totalidad por lo que estos resultados evidenciarían que el efecto inhibitorio de IPG no es común a todos los inhibidores de serina proteasas. El efecto de IPG mostró ser dosis dependiente y el valor de IC<sub>50</sub> calculado de la curva dosis respuesta fue de 130 µg/ml.

Estos resultados, dieron lugar a una presentación a congreso (Sociedad Argentina de Microbiología General, Julio 2013, ver sección 7.5: COMUNICACIONES) y a un manuscrito en preparación en las etapas previas para ser enviado a International Journal of Macromolecules (ver sección 7.4 TRABAJOS TERMINADOS Y AUN NO ENVIADOS PARA SU PUBLICACION). Por otra parte, la estudiante de la carrera de Lic. en Biología, la Srta. Fernanda Marchetti, quien había realizado dos pasantías de investigación consecutivas y se encontraba desarrollando su Tesis de Grado en esta línea de investigación con el apoyo de una Beca de entrenamiento de CIC (Octubre 2012-septiembre 2013) (Ver sección 11 DIRECCIÓN DE BECARIOS Y/O INVESTIGADORES y sección 12 DIRECCIÓN DE TESIS), defendió su trabajo el 27 de diciembre de 2013.

#### **OBJETIVO 3 y 4**

##### **- Obtención de IPGr y análisis de la actividad antifúngica sobre esporas de *F. solani*.**

La secuencia de cDNA correspondiente al ORF de la proteína IPG se disponía clonada en el vector de expresión pET24b, denominado pETIPG22. Tanto pET24b como pETIPG22 se utilizaron para transformar células de *E. coli* BL21(DE3), a partir de los cuales se crecieron las bacterias en medio no-inductor compuesto según Studier (2005). La purificación de IPGr se realizó lisando las bacterias, calentando el material resultante a 70 °C durante 30 minutos y se lo sembró en una columna de níquel Ni-NTA (Invitrogen).

Se estudió comparativamente el efecto antifúngico de IPGr con el efecto observado para IPG nativa sobre la germinación de esporas de *F. solani*. Si bien se registró un mínimo porcentaje de esporas germinadas (~5%), el porcentaje de esporas cuya germinación se vio inhibida fue del ~90%, tras el tratamiento con 0,24 µg/µl IPGr. Los resultados obtenidos en cuanto al efecto inhibitorio de IPGr y de IPGr70° sobre la germinación de esporas de *F. solani* indica que la proteína IPG obtenida de manera recombinante posee un efecto antifúngico comparable al observado con IPG (Marchetti, 2013 Tesis de Grado).

#### **OBJETIVO 5**

Teniendo en cuenta las múltiples actividades biológicas asociadas a la proteína IPG, lo cual la convierte en un modelo de proteína multifuncional con alto potencial en biotecnología, se comenzó a explorar el efecto de esta proteína sobre cultivo de células de mamíferos. Para esto, IPG se expresó en sistemas heterólogos (**rIPG, ver objetivo anterior**). En el período informado, junto con la Dra. Mansilla, se pudieron obtener evidencias preliminares que demuestran que la proteína rIPG promueve la proliferación de células C2C12 (mioblastos de ratón), pero no de las células tumorales de melanoma de ratón B16, indicando una alta especificidad de acción hacia células no diferenciadas (aún no publicado). Las células C2C12, se utilizan en estudios de respuesta celular

hacia compuestos con potencial capacidad regeneradora de cartílago, ya que poseen la facultad de diferenciarse a progenitores osteoblásticos (Katagiri y col, 1994; Rauch y col, 2002; Smith y col, 2005).

Estos antecedentes resultan prometedores y sientan las bases para proponer nuevos experimentos tendientes a evaluar las respuestas celulares de la proteína rIPG sobre células C2C12, estudiando su posible aplicación en la regeneración de tejido osteocondral.

Por otro lado, en este se publicó un trabajo con el laboratorio de la Dra. Mirta Menone (Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras de la Universidad Nacional de Mar del Plata). El manuscrito recientemente publicado se denominada "Oxidative stress and genotoxicity in the South American Cichlid, *Australoheros facetus*, after short-term sublethal to endosulfan" Crupkin AC, Carriquiriborde P, Mendieta JR, Panzeri AM, Ballesteros ML, Miglioranza KSB, Menone ML. (2013) *Pesticide Biochemistry and Physiology* 105: 102-110. La colaboración con la Dra. Menone continúa y en este momento estamos realizando ensayos en conjunto.

#### AVANCES EN EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN DE BASE CIENTÍFICO-TECNOLÓGICA

Se han realizado experimentos en el marco de un proyecto en colaboración con la Dra. Casalangué (directora del grupo de investigación "Fisiología del estrés en plantas" del IIB-UE-CONICET-Universidad Nacional de Mar del Plata). La Dra. Casalangué se encuentra desarrollando un proyecto ANPCyT PICT-Bicentenario 0746 sobre Temas Prioritarios de Impacto Regional denominado "*Valoración de desechos pesqueros para la obtención de derivados de quitina y su aplicación como compuestos bioactivos en plantas*". La colaboración con nuestro grupo se estableció por el interés de evaluar el efecto de los quitosanos, compuestos inocuos, biodegradable y con un gran potencial de aplicación en el campo de la agronomía, sobre el trigo, un cultivo de sumo interés agronómico en nuestra región. Los resultados hasta el momento son prometedores ya que indican que el tratamiento con quitosano de las semillas de trigo, acelera significativamente la germinación y potencian el crecimiento de plántulas de trigo. Estos datos fueron publicados en un capítulo del libro Vinculación Tecnológica, Vol III, De la Universidad al Medio Socio Productivo titulado "**Desarrollo de innovación tecnológica a escala de laboratorio con proyección a su aplicación en el cultivo de trigo**" (ver sección 7.1 PUBLICACIONES). El objetivo general del trabajo fue la puesta en valor del quitosano como compuesto bioactivo en plantas de trigo, obtenido a partir de residuos de la comercialización de camarones y langostinos provenientes de las costas marítimas de la Provincia de Buenos Aires. Se espera proporcionar una alternativa ambientalmente sustentable para las prácticas agrícolas del cultivo de trigo utilizando quitosanos como biofertilizante y biopesticida para su aplicación en plantas de interés agronómico u hortícola. Dicho proyecto cuenta con el apoyo del Ministerio de Ciencia, Técnica e Innovación Productiva a través de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica (PICT Bicentenario-Temas de Impacto Regional) y la UNMDP (EXA 540/11). El trabajo realizado ha generado las bases para desarrollar una actividad de vinculación tecnológica establecida con la Chacra Experimental Miramar dependiente del Ministerio de Asuntos Agrarios de la Provincia de Buenos (MAA), ubicada en Estación Yraizoz, partido de General Alvarado, Provincia de Buenos Aires (38°10'S 58°0'W). La vinculación con la Chacra Experimental Miramar constituye una excelente oportunidad para generar experiencia a escala piloto sobre prácticas agrícolas innovadoras. Además se firmó un convenio de cooperación entre las instituciones participantes (ver sección 8.3: PROYECTOS POTENCIALMENTE TRANSFERIBLES). Durante al año 2011, 2012 y 2013 se llevaron a cabo dos campañas, con el fin de evaluar la acción de quitosano y oligoquitosano como biofertilizantes en ensayos de trigo realizados en condiciones de campo. Se aplicó quitosano en semilla y hojas de trigo (*Triticum aestivum* var. Biointa 3004) según las condiciones optimizadas en el laboratorio. Los ensayos de trigo se aleatorizarán en un diseño experimental de parcela dividida. En total se trabajó con 32 parcelas sembradas por la Chacra Experimental Miramar dependiente del Ministerio de Asuntos Agrarios de la Provincia de Buenos Aires. Los resultados a campo obtenidos hasta esta instancia confirman lo obtenido en el laboratorio respecto a la capacidad del quitosano de potenciar la germinación de semillas de trigo y favorecer el rendimiento de este cultivar.

Este trabajo en colaboración también recibió un Premio INNOVAR 2013 (ID 13834) (ver sección 17: DISTINCIONES Y PREMIOS RECIBIDOS)

Paralelamente, en el marco de este mismo proyecto en colaboración, y con el fin de establecer un proyecto en común con la Dra. Casalangué, se comenzó a estudiar la actividad sinérgica de la proteína IPG en combinación con los derivados de quitosanos disponibles en nuestro laboratorio. Así se estudió el efecto antimicrobiano de IPG sobre los patógenos de plantas, en presencia de distintas concentraciones de quitosano y oligoquitosano. Los resultados fueron presentados en un congreso específico del área de biopolímeros (Workshop: Polímeros Biodegradables y Biocompuestos, ver sección 7.5 COMUNICACIONES). Estos estudios permitieron dar cuenta de la acción sinérgica de IPG con los derivados de quitosano y se sentaron las bases para entablar una colaboración con la Dra. Viviana Ramos de la Universidad Complutense de Madrid a través del Proyecto

RAICES-SIEMBRA (ver sección 16 OTRAS FUENTES DE FINANCIAMIENTO). De esta manera, un integrante del grupo realizó una pasantía en dicha universidad con el fin de funcionalizar a IPG en nanopartículas de quitosano. Los resultados obtenidos fueron presentados en el congreso mencionado anteriormente (ver sección 7.5 COMUNICACIONES). Además, estos antecedentes permitieron formular un proyecto que será financiado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (periodo 2014-2015, PICT 2013-2693), del cual soy la investigadora responsable titulado **“Valoración y estudio de compuestos antimicrobianos de origen biológico con alto valor agregado para fines de aplicación en agrobiotecnología”** (ver sección 20 punto 4: Subsidios solicitados y adjudicados en el periodo informado que permitirán el financiamiento del próximo periodo)

## **7. TRABAJOS DE INVESTIGACION REALIZADOS O PUBLICADOS EN ESTE PERIODO.**

**7.1 PUBLICACIONES.** *Debe hacer referencia exclusivamente a aquellas publicaciones en las que haya hecho explícita mención de su calidad de Investigador de la CIC (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Toda publicación donde no figure dicha mención no debe ser adjuntada porque no será tomada en consideración. A cada publicación, asignarle un número e indicar el nombre de los autores en el mismo orden que figuran en ella, lugar donde fue publicada, volumen, página y año. A continuación, transcribir el resumen (abstract) tal como aparece en la publicación. La copia en papel de cada publicación se presentará por separado. Para cada publicación, el investigador deberá, además, aclarar el tipo o grado de participación que le cupo en el desarrollo del trabajo y, para aquellas en las que considere que ha hecho una contribución de importancia, deberá escribir una breve justificación.*

**1)** Crupkin AC, Carriquiriborde P, **Mendieta JR**, Panzeri AM, Ballesteros ML, Miglioranza KSB, Menone ML (2013). Oxidative stress and genotoxicity in the South American cichlid, *Australoheros facetus*, after short-term sublethal exposure to endosulfan. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 105 (2013) 102-110.

Short-term responses at the antioxidant enzymatic systems, together with genotoxic effects were studied in the freshwater fish *Australoheros facetus*, exposed to endosulfan (ES) (0.02, 0.5, 5, 10 lg/L) for 24 h. Brain was the most responsive organ, showing inhibition of the enzymatic systems together with an increase of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) content. Concentration-dependent inhibition was observed for superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione reductase (GR) with IC<sub>25</sub> values of 0.012, 0.017, 0.018 lg/L, respectively. In liver, a similar behavior was observed for SOD with IC<sub>25</sub> values of 2.22 lg/L. In addition, increased thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) at 5 lg/L and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 5 and 10 lg/L were observed. No effects were evidenced on ethoxyresorufin O-deethylase (EROD), glutathione- S-transferase (GST), GR and CAT activities. In gills, only H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decreased at 0.5 and 5 lg/L ES. Genotoxic effects were detected by the increase of the frequency of both, nuclear abnormalities (NA) at 0.02 lg/L and micronucleus (MN) at 5 lg/L. Environmentally realistic concentrations of ES exerted toxic responses in *A. facetus*, encouraging the further field validation of the observed pattern (tissue specificity, sensitiveness and concentration-response relationship) as a potential suit of biomarkers for assessing acute sublethal effects in *A. facetus* under short-term pulsed exposure to ES.

La experiencia existente en nuestro grupo de investigación relacionada con el estudio de estrés oxidativo en hígado de ratones sometidos a dietas carentes de proteínas (tema en el cual desarrollé mi tesis postdoctoral), me permitió en el marco de una colaboración con la Dra. Mirta Menone, cuantificar peróxido de hidrógeno y la actividad de superóxido dismutasa en las muestras de distintos tejidos del pez *Australoheros facetus* sometido a estrés por endosulfán. Esta colaboración dio lugar al manuscrito publicado. Cabe destacar que dicha colaboración continúa y actualmente se están realizando nuevas mediciones de estrés oxidativo en muestras de peces sometidos a distintos tóxicos.

2) Albertengo L, Casalengué CA, Gutheim F, Mansilla AY, **Mendieta JR**, Paris R, Rodríguez MS. Autores por orden alfabético. (2013). Desarrollos de innovación tecnológica a escala de laboratorio con proyección a su aplicación en el cultivo de trigo. En: Vinculación tecnológica. Volumen III. De la Universidad al Medio Socio Productivo. Subsecretaría de Transferencia-UNMDP. ISBN-978-987-544-494-2. 2013. **Autores por orden alfabético**

La práctica de una agricultura sustentable se basa en la implementación de técnicas y tecnologías innovadoras, entre ellas se destaca la identificación y caracterización de biofertilizantes y biopesticidas amigables con el medio ambiente. Es por esto que los biopolímeros basados en polisacáridos, tal como es el quitosano, se constituyen como productos de alto valor para su aplicación en agricultura. La ventaja de la utilización de estos materiales es que son naturales, no tóxicos, biodegradables y pueden ser extraídos de residuos de la industria pesquera relacionada con el pelado de langostinos y camarones. Dicha ventaja es doble, ya que además de significar un aporte positivo al medio ambiente, le confiere también valor añadido a un residuo pesquero con bajo costo industrial.

En la provincia de Buenos Aires el trigo constituye uno de los cultivos extensivos más importantes y es a su vez el segundo cultivo alimenticio del mundo luego del arroz. El presente proyecto ofrece evidencias experimentales acerca de la acción de quitosanos en el rendimiento y fitosanidad del cultivo de trigo. Las acciones desarrolladas comprenden la experimentación a escala de laboratorio e iniciación de ensayos a campo. De esta forma, se generará el conocimiento necesario para impulsar el desarrollo de emprendimientos de comercialización tecnológica, ofreciendo a la industria de agroquímicos una alternativa factible y real de quitosanos de origen local para aplicaciones en cultivos de interés regional.

Participé activamente en el diseño y ejecución de los ensayos de laboratorio con el objetivo de conocer el efecto de los quitosanos sobre la germinación de semillas de trigo. Además, colaboré en las dos campañas a campo, en el marco de un convenio de vinculación tecnológica con la Chacra Experimental Miramar dependiente del Ministerio de Asuntos Agrarios de la Provincia de Buenos Aires, realizadas en 2011 y 2012 con el fin de validar los datos obtenidos en el laboratorio. Durante el año 2013 se realizó una nueva campaña, cuyos datos fueron tomados y están siendo analizados.

**7.2 TRABAJOS EN PRENSA Y/O ACEPTADOS PARA SU PUBLICACIÓN.** *Debe hacer referencia exclusivamente a aquellos trabajos en los que haya hecho explícita mención de su calidad de Investigador de la CIC (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Todo trabajo donde no figure dicha mención no debe ser adjuntado porque no será tomado en consideración. A cada trabajo, asignarle un número e indicar el nombre de los autores en el mismo orden en que figurarán en la publicación y el lugar donde será publicado. A continuación, transcribir el resumen (abstract) tal como aparecerá en la publicación. La versión completa de cada trabajo se presentará en papel, por separado, juntamente con la constancia de aceptación. En cada trabajo, el investigador deberá aclarar el tipo o grado de participación que le cupo en el desarrollo del mismo y, para aquellos en los que considere que ha hecho una contribución de importancia, deberá escribir una breve justificación.*

**7.3 TRABAJOS ENVIADOS Y AUN NO ACEPTADOS PARA SU PUBLICACION.** *Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo, indicando el lugar al que han sido enviados. Adjuntar copia de los manuscritos.*

**7.4 TRABAJOS TERMINADOS Y AUN NO ENVIADOS PARA SU PUBLICACION.** *Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo.*

1) "A multifunctional germin like protein purified of wheat intercellular fluid exerts antimicrobial activity against plant pathogens"

Marchetti MF, Mansilla AY, Conde RD, **Mendieta JR**

*Abstract:* The wheat leaf apoplast contains a protein that inhibits trypsin and belongs to the family of germin-like proteins called GLPI. Since it was first described in our laboratory, the objective of this work was to determine the antimicrobial activity of GLPI against plant pathogens. It was found that GLPI restrains the growth of *F. solani* and *P. infestans*. The IC<sub>50</sub> (dose needed to reduce the reproductive structures germination by 50 %) were 720 µg/ml and 130 µg/ml for *F. solani* and *P. infestans*, respectively. Also, GLPI restrained the growth of *Peudomona syringae* cells taken at exponential growth and incubated in fresh medium for 24 h at 30 °C. Assessed by optical density, GLPI IC<sub>50</sub> was 52 µg/ml, which is 13.8 and 2.5 lower than those of *F. solani* and *P. infestans*, respectively. Then these data reveal that GLPI has an important antimicrobial capacity against different plant pathogens. Additionally, GLPI exerts its microbicide ability by interacting with plasma membrane since the fluorogenic dye SYTOX Green was up taken and fluoresced on binding to DNA. This study contributes to the characterization of the emerging family of germin-like protein that inhibits trypsin and emphasizes their role in plant resistance against fungal attack.

Este manuscrito será enviado a la brevedad para su publicación a International Journal of Macromolecules

2) "Liver damage and caspase dependent apoptosis is related to protein malnutrition in mouse. Effect of methionine".

Caballero VJ, **Mendieta JR**, Lombardo D, Saceda M, Ferragut JA, Conde RD, Giudici AM.

*Abstract:* This study aimed to further know the effects of three periods of feeding a protein-free diet for 5 days followed by a complete diet for 5 days (3PFD-CD) on mouse liver. Also, it intended to compare these effects with those caused by a constant methionine supply (3PFD+Met-CD). Then, expressions of carbonic anhydrase III (CAIII), fatty acid synthase (FAS), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and glutathione S-transferase P1 (GSTP1) were assessed by proteomics and reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Liver redox status was examined by measuring the activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), and protein carbonylation. Since an oxidative stress can result in apoptosis, activity and content of caspase-3, as well as contents of x-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) and mitochondrial caspase-independent apoptosis inducing factor (AIF) were assessed. Also, the liver histoarchitecture was examined. Compared to control under complete diet, fed with 3PFD-CD increased FAS content, decreased CAIII content, decreased both SOD and CAT activities, and increased protein carbonylation. Also, it activated caspase-3, increased XIAP content, decreased AIF content, increased GSTP1-positive foci and caspase-3-positive cells, and caused fatty liver. On the other hand, the changes caused by 3PFD-CD were lessened to varying degrees in mice subjected to 3PFD+Met-CD. Present results suggest that three alternated cycles of amino acids dietary deprivation cause oxidative stress, which provokes liver damage and apoptosis. Conversely, a constant intake of Met partially prevents these changes.

Este manuscrito será enviado a la brevedad para su publicación a Open Journal of Apoptosis

**7.5 COMUNICACIONES.** *Incluir únicamente un listado y acompañar copia en papel de cada una. (No consignar los trabajos anotados en los subtítulos anteriores).*

## Comunicaciones presentadas a congresos científicos

- 1- Marchetti MF, Mansilla AY, Conde RD, **Mendieta JR**. The antifungal activity of a wheat germin-like protein that inhibits trypsin involves the inhibition of extracellular fungal proteinases. SAMIGE IX Congreso Argentino de Microbiología General. Rosario 5,6 y 7 de agosto de 2013.
- 2- Mansilla AY, **Mendieta JR**, Martínez Campos E, Ramos V, López Lacomba JL, Casalongué CA. (2013). “Vehiculización de la proteína multifuncional de trigo IPG en micropartículas de Quitina”. Workshop: Polímeros Biodegradables y Biocompuestos, Mar del Plata, 5 y 6 de Diciembre de 2013.
- 3- **Mendieta JR**, Rodriguez MR, Albertengo L, Casalongué CA. (2013). “Capacidad sinérgica de quitosanos y la proteína IPG de trigo sobre la germinación de esporas fúngicas”. Workshop: Polímeros Biodegradables y Biocompuestos, Mar del Plata, 5 y 6 de Diciembre de 2013.
- 4- Marchetti MF, Mansilla AY, Conde RD, **Mendieta JR**. El inhibidor de tripsina tipo germina (IPG) posee actividad antimicrobiana. Primer Congreso Internacional Científico Tecnológico de la Provincia de Buenos Aires. La Plata, Argentina, 19 y 20 de septiembre de 2013.
- 5- Mansilla, AY, Terrile MA, **Mendieta JR**, Tonon CV, Albertengo L, Rodriguez S, Casalongue C. Estudio comparativo de la acción del quitosano proveniente de recursos marítimos para su aplicación en agricultura. VIII Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología REDBIO. Mar del Plata, Argentina. 18 al 22 de noviembre de 2013.

**7.6 INFORMES Y MEMORIAS TECNICAS.** *Incluir un listado y acompañar copia en papel de cada uno o referencia de la labor y del lugar de consulta cuando corresponda.*

## 8. TRABAJOS DE DESARROLLO DE TECNOLOGÍAS.

**8.1 DESARROLLOS TECNOLÓGICOS.** *Describir la naturaleza de la innovación o mejora alcanzada, si se trata de una innovación a nivel regional, nacional o internacional, con qué financiamiento se ha realizado, su utilización potencial o actual por parte de empresas u otras entidades, incidencia en el mercado y niveles de facturación del respectivo producto o servicio y toda otra información conducente a demostrar la relevancia de la tecnología desarrollada.*

**8.2 PATENTES O EQUIVALENTES.** *Indicar los datos del registro, si han sido vendidos o licenciados los derechos y todo otro dato que permita evaluar su relevancia.*

**8.3 PROYECTOS POTENCIALMENTE TRANSFERIBLES, NO CONCLUIDOS Y QUE ESTAN EN DESARROLLO.** *Describir objetivos perseguidos, breve reseña de la labor realizada y grado de avance. Detallar instituciones, empresas y/o organismos solicitantes.*

Convenio de Cooperación CONICET-Chacra Experimental de Miramar dependiente del Ministerio de Asuntos Agrarios de la Provincia de Buenos Aires. Evaluación de quitosano en ensayos de trigo. Aprobado por CONICET y en circuito administrativo en la Provincia de Buenos Aires.

Este acuerdo, comenzó en el 2011 y continúa en la actualidad y tiene por objeto llevar adelante tareas que permitan evaluar la acción de quitosanos y oligoquitosanos provistos por CONICET como biofertilizantes en ensayos de trigo realizados en condiciones de campo en 32 parcelas (247 m<sup>2</sup>) provistas por CHACRA EXPERIMENTAL. El plan de trabajo lleva por título "Evaluación del efecto de quitosano y oligoquitosano en cultivos de trigo" y se espera conocer los efectos del quitosano y oligoquitosano sobre parámetros de crecimiento (emergencia 1-2 hojas desarrolladas, macollo y espiga) y rendimiento (peso seco y fresco del grano) en plantas de trigo a lo largo del ciclo de cultivo a campo. Hasta el momento se realizaron tres campañas a campo, una proveniente al año 2011, otra al



2012 y otra al 2013. En todos los casos los resultados confirman los datos obtenidos previamente en el laboratorio indicando que los quitosanos son capaces de potenciar el desarrollo y mejorar el rendimiento de cultivos de trigo.

**8.4 OTRAS ACTIVIDADES TECNOLÓGICAS CUYOS RESULTADOS NO SEAN PUBLICABLES** (*desarrollo de equipamientos, montajes de laboratorios, etc.*).

- Exposición en la novena edición del Concurso Nacional de Innovaciones (realizada entre el 8 y el 13 de octubre de 2013) del proyecto: “**ID 13834-Obtención y valoración de quitosanos y derivados de quitosano recuperados de residuos pesqueros para su aplicación hortícola y agronómica**”. Premio: Selección de proyecto ID 13834 para participar en el catálogo INNOVAR 2013 (investigación aplicada). <http://galeria.innovar.gob.ar/13834>

**8.5 Sugiera nombres (e informe las direcciones) de las personas de la actividad privada y/o pública que conocen su trabajo y que pueden opinar sobre la relevancia y el impacto económico y/o social de la/s tecnología/s desarrollada/s.**

- 9. SERVICIOS TECNOLÓGICOS.** *Indicar qué tipo de servicios ha realizado, el grado de complejidad de los mismos, qué porcentaje aproximado de su tiempo le demandan y los montos de facturación.*

**10. PUBLICACIONES Y DESARROLLOS EN:**

**10.1 DOCENCIA**

**10.2 DIVULGACIÓN**

- 11. DIRECCION DE BECARIOS Y/O INVESTIGADORES.** *Indicar nombres de los dirigidos, Instituciones de dependencia, temas de investigación y períodos.*

1) Directora de Beca de entrenamiento de la CIC-BA de la estudiante María Fernanda Marchetti. Análisis de la actividad antimicrobiana del inhibidor de proteasas tipo germina (IPG) de trigo. Octubre 2012-septiembre 2013.

- 12. DIRECCION DE TESIS.** *Indicar nombres de los dirigidos y temas desarrollados y aclarar si las tesis son de maestría o de doctorado y si están en ejecución o han sido defendidas; en este último caso citar fecha.*

**Directora de Tesis de Grado** para optar por el título de Lic. en Ciencias Biológicas de la estudiante María Fernanda Marchetti. “Análisis de la actividad antimicrobiana del inhibidor de proteasas tipo germina (IPG) de trigo”. Defendida el 27/12/2014.

- 13. PARTICIPACION EN REUNIONES CIENTIFICAS.** *Indicar la denominación, lugar y fecha de realización, tipo de participación que le cupo, títulos de los trabajos o comunicaciones presentadas y autores de los mismos.*

**14. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC.** *Señalar características del curso o motivo del viaje, período, instituciones visitadas, etc.*

**15. SUBSIDIOS RECIBIDOS EN EL PERIODO.** *Indicar institución otorgante, fines de los mismos y montos recibidos.*

- Subsidio Institucional para Investigadores de **CIC-BA** (Resolución N° 2501/12). “Aplicaciones biotecnológicas del inhibidor de proteasas tipo germina (IPG). Análisis de su actividad antimicrobiana y antitumoral”. Monto recibido \$ 5600. Director: Julieta R. Mendieta.
- Subsidio para la organización de Reuniones Científicas y Tecnológicas a realizarse entre julio de 2013 y julio de 2014 otorgado por la **CIC-BA**. Reunión Científica: VIII Biólogos en Red. 14 y 15 de noviembre de 2013. Monto Otorgado: \$ 3000. Acta de Directorio N° 1386/13

**16. OTRAS FUENTES DE FINANCIAMIENTO.** *Describir la naturaleza de los contratos con empresas y/o organismos públicos.*

1) Título: “Proteínas con actividad antimicrobiana de arqueas y trigo”

Director: Dr. Rubén Conde.

Institución financiadora: Universidad Nacional de Mar del Plata

Período: 2012-2013

Código de Identificación: PIP 6046

Participa como: Miembro del equipo

2) Título: “Caracterización de la acción de derivados de quitina de diferentes fuentes en microorganismos y plantas para su utilización en prácticas agrícolas sustentables”

Director: Dra. Claudia Casalongué

Institución financiadora: Universidad Nacional de Mar del Plata

Período: 2012-2014

Código: EXA 629/13

Participa como: Miembro del equipo

3) Título “Estudios fisiológicos y biotecnológicos de productos innovadores y ecológicamente seguros para el manejo de cultivos hortícolas de interés regional”

Director: Claudia Casalongué

Institución financiadora: ANPCyT (PICT 0716)

Período: 2011-2013

Participa como: Miembro del equipo

**Proyectos colaboración extranjera bilateral.**

Integrante del Proyecto RAICES-SIEMBRA “**Funcionalización de matrices en base a quitosano para su aplicación biomédica y en agricultura a partir del sistema modelo de la proteína multifuncional IPG**”. MINCyT Argentina-España. Aprobado 2013.

**17. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO.**

- Integrante del Premio Innovar. Proyecto Seleccionado para participación en Catálogo INNOVAR 2013. ID 13834 Obtención y valoración de quitosano y derivados de quitosano recuperados de residuos pesqueros para su aplicación hortícola y agronómica

**18. ACTUACION EN ORGANISMOS DE PLANEAMIENTO, PROMOCION O EJECUCION CIENTIFICA Y TECNOLÓGICA.** *Indicar las principales gestiones realizadas durante el período y porcentaje aproximado de su tiempo que ha utilizado.*

**19. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO.** *Indicar el porcentaje aproximado de su tiempo que le han demandado.*

- Año 2011- actualidad: Jefe de Trabajos Prácticos regular desde 1 de septiembre de 2011 (OCA N° 539/11) Anatomía Humana (2° cuatrimestre) y Fisiología Humana (1° cuatrimestre). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata. Carga horaria: 10 horas semanales.

**20. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES.** *Bajo este punto se indicará todo lo que se considere de interés para la evaluación de la tarea cumplida en el período.*

**1) Organización de reuniones y congresos**

- Integrante del comité organizador de la VIII Encuentro Anual de Biólogos en Red. Universidad Nacional de Mar del Plata, 14 y 15 de noviembre de 2013. Publicación de acta de resúmenes ISSN 1853-3426 (versión electrónica).
- **Subsidio para la organización de Reuniones Científicas y Tecnológicas** a realizarse entre julio de 2013 y julio de 2014 **otorgado por la CIC.** Reunión Científica: Biólogos en Red. 14 y 15 de noviembre de 2013. Monto Otorgado: \$ 3000. Acta de Directorio N° 1386/13. **Responsable: Dra. Julieta Mendieta**

**2) Antecedentes de gestión:**

- Integrante de la Comisión de Seguridad e Higiene, Instituto de Investigaciones Biológicas, UNMdP. Desde marzo de 2013.

**3) Antecedentes de extensión:**

- Integrante del taller “AGUAcadabra: Química y Vida”. Universidad Nacional de Mar del Plata en el marco de la Semana Nacional de la Ciencia y la Tecnología 2013 organizada por el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la Nación

**4) Subsidios solicitados y adjudicados en el periodo informado que permitirán el financiamiento del próximo período:**

- Subsidio otorgado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (**PICT 2013-2693**). “Valoración y estudio de compuestos antimicrobianos de origen biológico con alto valor agregado para fines de aplicación en agrobiotecnología”. **Responsable: Dra. Julieta R. Mendieta.** Monto: \$84.000. Periodo: 2014-2015
- Proyectos financiados por la Universidad Nacional de Mar del Plata “Efecto del inhibidor de proteasas tipo germina (IPG) de trigo en la formación de biofilms bacterianos” **Director: Dra. Julieta R Mendieta.** Codirectora: Dra. Débora Nercessian. Periodo: 2014-2015. (EXA 700/14).

- Subsidio Institucional para Investigadores de CIC-BA (Resolución N° 243/13). “Aplicaciones biotecnológicas del inhibidor de proteasas tipo germina (IPG). Análisis de su actividad antimicrobiana y antitumoral”. Monto recibido \$ 6000. **Responsable: Julieta R. Mendieta.**
- Integrante del Proyecto financiado por la Dirección Nacional de Desarrollo Universitario y Voluntariado. “Productos fitosanitarios”. Director: Dra. Claudia Casalongué. Período: 2014. Resolución SPU N° 4016/13

**21. TITULO Y PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PROXIMO PERIODO.** *Desarrollar en no más de 3 páginas. Si corresponde, explicita la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.*

**TÍTULO:** Estudio y valoración de compuestos antimicrobianos de origen biológico con fines de aplicación en agrobiotecnología

La alta actividad agrícola tiene un importante efecto negativo sobre el cambio climático. A través del Manejo Integrado de Plagas (establecido por la FAO, organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) se intenta desarrollar el máximo beneficio económico para el productor con el mínimo efecto nocivo sobre la población humana y el medioambiente. Esto es importante en países como la Argentina y muy especialmente en la región de la **Provincia de Buenos Aires** donde la producción agrícola tiene gran incidencia económica. Es por esto que es imprescindible el desarrollo de alternativas que brinden calidad, efectividad e inocuidad a los productos que se aplican como pesticidas, atendiendo cuestiones fundamentales como la salud humana (baja toxicidad) y preservación del ambiente. En este sentido, la utilización de compuestos naturales constituye una alternativa de solución a la problemática actual.

Se ha descrito que algunos inhibidores de serina proteasa (ISP) de origen vegetal poseen actividad antifúngica y/o antimicrobiana inhibiendo la actividad de proteasas secretadas por el patógeno o permeabilizando la membrana plasmática de las células (Mosolov y col, 2001). Estos compuestos antimicrobianos presentan gran interés como alternativas naturales y más sustentables para su uso como biocidas o potenciadores de la respuesta de defensa de las plantas frente a estrés bióticos (Valueva & Mosolov, 2004). En nuestro laboratorio se ha aislado un ISP de hojas de trigo denominado Inhibidor de Proteasa tipo Gemina (**IPG**) (Segarra y col, 2003). Este inhibidor presenta además, otras actividades enzimáticas: superóxido dismutasa (SOD) y actividad de adenosina difosfato glucosa pirofosfatasa (AGPP) (Segarra y col, 2003; Mansilla y col, 2012). Por otra parte, recientemente se demostró la actividad antimicrobiana de IPG sobre patógenos de plantas (Marchetti, 2013).

El quitosano y sus derivados son compuestos inocuos y biodegradables con amplias potencialidades en el campo de la agricultura (Ghormade y col, 2011; El Hadrami y col, 2010). La capacidad de estos polímeros catiónicos de permeabilizar las membranas plasmáticas los convierten en compuestos ideales para actuar como antimicrobianos o citotóxicos según el blanco celular y como potenciadores de la respuesta de defensa de las plantas (El Hadrami y col, 2010).

Teniendo en cuenta los antecedentes para la proteína IPG, se pretende ahondar en las propiedades biológicas de los quitosanos combinados con esta proteína y su potencial impacto sobre patógenos vegetales. En este sentido, la ventaja es doble ya que dicho producto se puede obtener de un residuo pesquero con bajo costo industrial

El objetivo del presente proyecto es caracterizar la actividad antimicrobiana del quitosano y sus derivados (DQ) sobre diversos patógenos vegetales de importancia agronómica con el fin de proyectar su interés agrobiotecnológico en combinación con la proteína IPG.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO

Objetivo 1: Estudiar la actividad antimicrobiana de los DQ sobre patógenos vegetales.

- a) Analizar la actividad antimicrobiana de los DQ
- b) Analizar el mecanismo de acción los DQ sobre patógenos vegetales.
- c) Comparar el efecto combinado de IPG/IPGr y los DQ sobre los patógenos estudiados

**Material biológico:** Se dispone de suspensiones de micelio y esporas de aislamientos locales de *Phytophthora infestans*, (razas compatibles), cepas patógenas fúngicas de *Fusarium solani f sp eumartii* y suspensiones bacterianas de *Pseudomonas syringae* (Mendieta y col, 2006; Mansilla y col, 2013).

Se dispone de derivados de quitosanos (DQ) de diferente peso molecular y grado de deacetilación y derivados con sustituciones químicas, como por ejemplo, derivado hidrosoluble N-metilén fosfónico (NMPC), quitosano N-lauril-metilén fosfanato (LMPC), quitosano N-propil-N-metilén fosfonato (PNMPC), y quitooligómeros solubles de bajo peso molecular. Dichos compuestos son provistos por el Laboratorio de Investigaciones Básicas y Aplicadas de Quitina (LIBAQ, INQUISUR-UE, UNS-CONICET) de la Universidad Nacional del Sur a través de un proyecto en colaboración con la Dra. Casalongué.

### **Análisis de la actividad antimicrobiana de los DQ**

Se evaluará la actividad biológica de tipo antimicrobiana de los DQ sobre la germinación de estructuras reproductivas de los siguientes patógenos de plantas: *F. solani* y *P. infestans*. Para tal fin se incubarán suspensiones de estructuras reproductivas de cada patógeno con diferentes concentraciones de dichos compuestos. Se evaluará y cuantificará la inhibición de la germinación de esporas con cámara de Neubauer y bajo observación microscópica (NIKON Eclipse E2100) (Mendieta y col, 2006). La actividad antibacteriana sobre *P. syringae* se evaluará incubando cultivos celulares en etapa exponencial con distintas concentraciones de los DQ. A distintos tiempos se tomarán alícuotas y se cuantificará la Abs en 600 nm como medida del crecimiento bacteriano (Mendieta y col, 2006; Mansilla y col, 2013). Se obtendrán los valores de IC50 que indican la dosis que causa un 50% de inhibición del crecimiento del patógeno.

### **Análisis del mecanismo de acción de los derivados de quitosano sobre patógenos vegetales.**

#### **Efecto biocida de los DQ**

Las propiedades biocidas de los compuestos se determinará incubando una suspensión de las estructuras reproductivas con distintas cantidades de cada uno de los compuestos y luego de días de cultivos en medios frescos se cuantificarán las unidades formadoras de colonia (Mendieta y col, 2006). La actividad bactericida sobre cultivos bacterianos de *P. syringae* se analizará en la etapa exponencial. Alícuotas de cultivo bacteriano se incubarán con distintas concentraciones de cada compuesto a estudiar y se cuantificarán las UFC (Muñoz y col, 2010). Los valores de dosis letal media (LD50) (concentración requerida para reducir el 50% de la viabilidad) se determinarán a partir de las curvas dosis-respuesta (Mendieta y col, 2006). También se evaluará el efecto microbiocida en curvas de tiempo para cada uno de los patógenos y compuestos. (Mendieta y col 2006). Para validar el efecto biocida se analizará también la viabilidad celular a través de la tinción con el colorante azul de Evans y con las sondas fluorescentes de yoduro de propidio (Muñoz y col, 2010).

#### **Interacción y permeabilización de la membrana celular.**

Los DQ se marcarán con la sonda fluorescente rodamina, según describen Ma y col (2008). Los ensayos de interacción con la superficie celular se realizarán incubando una suspensión de esporas (*F. solani* y *P. infestans*) o de cultivos celulares de *P. syringae* con distintas concentraciones de quitosanos-FITC/rodamina y se observará al microscopio de fluorescencia (NIKON Eclipse E2100) y al microscopio confocal (Nikon Eclipse C21 Plus, Laboratorio de microscopía, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata). La cuantificación de la fluorescencia se

realizará con un equipo Fluoroskan Ascent (Thermo Electron Company, Vantaa, Finland) (Mendieta y col, 2006). La evaluación de la integridad de las membranas plasmáticas de los patógenos estudiados se realizará utilizando el marcador fluorescente SYTOX Green (Molecular Probe) (Mendieta y col, 2006).

### **Detección y cuantificación de especies reactivas de oxígeno (ROS)**

Para entender parte del mecanismo antimicrobiano, se propone estudiar la presencia de ROS en las estructuras reproductivas de los patógenos tratados con DQ. La detección endógena de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se llevará a cabo mediante la tinción histoquímica dependiente de peroxidasas utilizando el reactivo 3,3'-diaminobenzidina (DAB) según se describe en Mendieta y col, 2006.

### **Evaluación de la toxicidad selectiva**

La capacidad antimicrobiana de tipo selectiva por parte de los DQ, de IPG e IPGr sobre los patógenos microbianos versus células de origen vegetal, se evaluará según Muñoz y col, 2010. Se utilizará como sistema modelo, cultivos celulares de tabaco BY2 disponibles y mantenidas en el laboratorio. Las células serán tratadas con distintas concentraciones de IPG o IPGr. Se determinará la viabilidad celular mediante el agregado de azul de Evans o el marcador fluorescente SYTOX Green. Las células se observarán al microscopio (Nikon Eclipse E200) y se cuantificará la fluorescencia por Fluoroskan Ascent (Thermo Electron Company, Vantaa, Finland) (Muñoz y col, 2010).

### **Comparación del efecto combinado de IPG/IPGr y los quitosanos sobre los patógenos estudiados**

Para evaluar la posible acción sinérgica del quitosano y la proteína IPG/IPGr se realizarán ensayos de medición de la actividad antimicrobiana según se detalló anteriormente incubando las esporas fúngicas y cultivos celulares de *P. syringae* con concentraciones de cada una de las proteínas bioactivas y se combinarán con concentraciones de los DQ en órdenes de magnitud significativamente menores a las que mostraron individualmente efectos biocidas. De esta manera, la capacidad aditiva de los DQ permitirá identificar las concentraciones combinadas más efectivas. La estimación de la actividad sinérgica se realizará según la ecuación de Limpel, como describen Romanazzi y col (2006). La fórmula con la que se determinará la interacción sinérgica entre dos tratamientos es la siguiente:  $E_e = X + Y - (XY/100)$ , en la cual  $E_e$  corresponde al efecto de la respuesta aditiva de los dos tratamientos y X e Y corresponden al efecto obtenido para los tratamientos individuales. De esta manera se describirá sinergismo, si la combinación de los dos agentes produce un valor de inhibición mayor que el calculado para  $E_e$ .

Para el próximo período se cuenta con tres subsidios de los cuales soy el investigador responsable (PICT 2013-2693; EXA 700/14, CIC RN° 243/13) (ver sección 20, punto 4: Subsidios solicitados y adjudicados en el periodo informado que permitirán el financiamiento del próximo período)

### **Referencias bibliográficas**

- Mosolov VV, Grigor'eva LI, Valueva TA. (2001). Plant proteinase inhibitors as polyfunctional proteins (a review). Applied Biochemistry and Microbiology 37: 545-551.
- Valueva TA, Mosolov VV. (2004). Role of Inhibitors of Proteolytic Enzymes in Plant Defense against Phytopathogenic Microorganisms. Biochemistry (Moscow) 6: 1305-1309.
- Segarra C, Casalagué C, Pinedo M, Ronchi V, Conde RD. (2003). A germin-like protein of wheat leaf apoplast inhibits serine proteases. Journal of Experimental Botany 54: 1335-1341.
- Mansilla AY, Albertengo L, Rodríguez MS, Debbaudt A, Zúñiga A, Casalagué CA. (2013) Evidence on antimicrobial properties and mode of action of a chitosan obtained from crustacean exoskeletons on *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. Applied Microbiology and Biotechnology en prensa.
- Mansilla AY, Segarra CI, Conde RD. (2012). Structural and functional features of a wheat germin-like protein that inhibits trypsin. Plant Molecular Biology Reporter 30: 624-632 (2012).
- Ghormade V, Deshpande MV, Paknikar KM. (2011). Perspectives for nano-biotechnology enabled protection and nutrition of plants. Biotech Adv 29: 792-803.
- El Hadrami A, Adam LR, El Hadrami I, Daayf F. (2010). Chitosan in Plant Protection. Mar Drugs 8: 968-987.
- Mendieta JR, Pagano MR, Muñoz FF, Daleo GR, Guevara MG. (2006). Antimicrobial activity of potato aspartic proteases (StAPs) involves membrane permeabilization. Microbiology 152: 2039-2047.
- Muñoz FF, Mendieta JR, Pagano MR, Paggi RA, Daleo GR, Guevara MG. (2010). The swaposin-like domain of potato aspartic protease (StAsp-PSI) exerts antimicrobial activity on plant and human pathogens. Peptides 31: 777-85.

- 
- Romanazzi G, Mlikota Gabler F, Smilanick JL (2006). Preharvest chitosan and postharvest UV irradiation treatments suppress gray mold of table grapes. Plant Disease 90: 445-450.
  - Marchetti, 2013. Tesis para optar al título de Lic en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Mar del Plata.
- 

**Condiciones de la presentación:**

- A. El Informe Científico deberá presentarse dentro de una carpeta, con la documentación abrochada y en cuyo rótulo figure el Apellido y Nombre del Investigador, la que deberá incluir:
  - a. Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 21).
  - b. Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, en otra carpeta o caja, en cuyo rótulo se consignará el apellido y nombres del investigador y la leyenda "Informe Científico Período .....".
  - c. Informe del Director de tareas (en los casos que corresponda), en sobre cerrado.
- B. Envío por correo electrónico:
  - a. Se deberá remitir por correo electrónico a la siguiente dirección: [ininvest@cic.gba.gov.ar](mailto:ininvest@cic.gba.gov.ar) (puntos 1 al 21), en formato .doc zipeado, configurado para papel A-4 y libre de virus.
  - b. En el mismo correo electrónico referido en el punto a), se deberá incluir como un segundo documento un currículum resumido (no más de dos páginas A4), consignando apellido y nombres, disciplina de investigación, trabajos publicados en el período informado (con las direcciones de Internet de las respectivas revistas) y un resumen del proyecto de investigación en no más de 250 palabras, incluyendo palabras clave.

---

**Nota:** El Investigador que desee ser considerado a los fines de una promoción, deberá solicitarlo en el formulario correspondiente, en los períodos que se establezcan en los cronogramas anuales.