

CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO Informe Científico¹

PERIODO ²: 2015

Legajo N°:

1. DATOS PERSONALES

APELLIDO: Mendieta

NOMBRES: Julieta Renée

Dirección Particular: Calle:

Localidad: Mar del Plata CP: 7600

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.

Se accedió a la categoría de Investigador ADJUNTO SIN DIRECTOR (2015, Acta de directorio: 1419), en espera del nombramiento (se adjunta carta).

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 "Fisiología del Estrés en Plantas"

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: Funes N°: 3550

Localidad: Mar del Plata CP: 7600 Tel: 4753030

Dirección electrónica: rdconde@mdp.edu.ar

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

.....
Firma del Investigado

¹ Art. 11; Inc. "e" ; Ley 9688 (Carrera del Investigador Científico y Tecnológico).

² 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.

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 2015. 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 realizado dentro de un proyecto mayor dirigido por la Dra. Casalougué.

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 de IPG sobre células de mamíferos.

Objetivo General: Analizar las propiedades de IPG sobre cultivo 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, han permitido caracterizar a IPG como una proteína antimicrobiana (objetivo presentado en informes anteriores). Con el propósito de avanzar en el proyecto de investigación se han planteado los siguientes objetivos:

OBJETIVO 1: Analizar los efectos biológicos de IPG sobre células de mamíferos.

OBJETIVO 2: Desarrollar nanocarcillas compuestas incorporando a la proteína IPG como modelo para aplicaciones biotecnológicas

Objetivo 1: 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**). En el período informado, junto con la Dra. Mansilla, se pudieron obtener evidencias 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. Las células C2C12, se utilizan en estudios de respuesta celular hacia compuestos con potencial capacidad regeneradora de cartilago, ya que poseen la facultad de diferenciarse a progenitores osteoblásticos.

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.

Estos resultados, dieron lugar a una presentación a congreso internacional (VII SIAQ, Simposio Iberoamericano de Quitina, abril 2015, ver sección 7.5: COMUNICACIONES).

Objetivo 2: Las propiedades múltiples de la proteína IPG la convierten en una molécula con potenciales aplicaciones nanobiotecnológicas. Las nanopartículas más utilizadas para la vehiculización de compuestos son los silicatos laminares denominados arcillas. La utilización de la bentonita es estratégica debido a su bajo costo, su abundancia natural y su alta resistencia tanto mecánica como química. La Argentina es uno de los pocos países del mundo que posee arcillas de tipo bentonita. Las enzimas inmovilizadas en nanopartículas también muestran una alta movilidad y actividad, sugiriendo que las moléculas no están unidas rígidamente a los materiales de apoyo. Un requerimiento importante para la inmovilización de las proteínas y otros compuestos

activo es que el soporte debe ser biocompatible e inerte para que no interfiera ni reaccione con los mismos, todo esto se da en el caso de la bentonita.

En una primera etapa y en el marco del proyecto de investigación de la Dra. Mansilla (investigadora CONICET), se estudió la factibilidad de intercalar la proteína IPG en los espacios interlaminares de una bentonita sódica de origen nacional (BENT) y de la misma modificada químicamente con bromuro de dimetil dioctadecil amonio (DDA-BENT). Para avanzar en los estudios funcionales, se analizó el efecto de IPG inmovilizada en las arcillas sobre la germinación de las esporas del hongo fitopatógeno *F. solani*, observándose la capacidad de los complejos arcillas-IPG de inhibir la germinación del hongo (estos resultados se describieron detalladamente en el informe anterior). Los datos hasta entonces obtenidos sentaron las bases para desarrollar un proyecto científico-tecnológico, dando lugar a una patente “**Sistema de liberación controlada de un principio bioactivo que contiene bentonita sódica como vehiculizador y método para su fabricación**”.

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. Casalengué (directora del grupo de investigación “Fisiología del estrés en plantas” del IIB-UE-CONICET-Universidad Nacional de Mar del Plata). La Dra. Casalengué 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.

Por otra parte, los avances en este proyecto han permitido presentar un plan de trabajo al PREMIO SENASA a la INVESTIGACION, TRANSFERENCIA Y COMUNICACIÓN 2014-2015. El objetivo de dicho proyecto se basa en que el uso excesivo de agroquímicos fuertemente tóxicos conlleva a un impacto ambiental negativo tanto en zonas semi-urbanas como rurales ocasionando además, complicaciones sanitarias a la población. El proyecto promueve el desarrollo de conocimiento y resultados científicos referidos tanto a la obtención como aplicación de quitosano (Q) y oligoquitosano (OQ) como fuente de elicitores o inductores de defensa frente a hongos o bacterias fitopatógenas. Las potencialidades de dichos compuestos para el desarrollo de nanopartículas (NPQ) que permitan el encapsulamiento de la proteína antimicrobiana denominada IPG, mejorando y potenciando su disponibilidad y efectividad en los sistema biológicos, constituirá además, un resultado altamente original. Este reconocimiento nos permitió escribir un trabajo en la Revista SNS “*Assessment of the effectiveness of chitooligosaccharide from the argentine sea resources to control Fusarium eumartii*”, donde se describe la acción antifúngica de un derivado de quitosano de bajo peso molecular sobre las esporas del hongo fitopatógeno *F. solani*.

Además, los avances en el laboratorio en el desarrollo de un protocolo para la obtención de manera sencilla de quitina a partir de exoesqueletos de camarones y langostinos, permitió escribir un capítulo en el libro Vinculación tecnológica. Volumen IV. De la Universidad al Medio Socio Productivo (ver sección 7.2 TRABAJOS EN PRENSA Y/O ACEPTADOS PARA SU PUBLICACIÓN), el cual ha sido aprobado y está en prensa.

Paralelamente, estos antecedentes permitieron formular un proyecto que está siendo financiado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (periodo 2014-2015, PICT 2013-2693), “**Valoración y estudio de compuestos antimicrobianos de origen biológico con alto valor agregado para fines de aplicación en agrobiotecnología**” y por la Universidad Nacional de Mar del Plata “Estudios y desarrollo de formulaciones basadas en recursos naturales para su utilización como agroinsumos.” (ver sección 15: SUBSIDIOS RECIBIDOS EN EL PERIODO y 16: OTRAS FUENTES DE FINANCIAMIENTO). El avance tecnológico de este proyecto se ve reflejado en varios convenios de investigación y desarrollo con empresas privada (ver sección 8.4: OTRAS ACTIVIDADES TECNOLÓGICAS CUYOS RESULTADOS NO SEAN PUBLICABLES).

Desde el punto de vista del avance científico, este proyecto de I+D a dado lugar a la presentación de dos trabajos en congresos nacionales e internacionales (ver sección 7.5: COMUNICACIONES).

Cabe destacar que el proyecto de investigación de base científico-tecnológica presente importancia regional y así quedó demostrado en el reconocimiento otorgado por la CIC en el marco del PREMIO EDUARDO

USUNOFF 2015: Mención especial, área actividad productiva por el trabajo “Valoración de productos de origen biológico para su aplicación en agronomía” otorgado por la **Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires.**

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)

Acta Histochemica 117 (2015) 126–135

Liver damage and caspase-dependent apoptosis related to protein malnutrition in mice: Effect of methionine

Verónica J. Caballero, Julieta R. Mendieta, Daniel Lombardo, Miguel Saceda, José Antonio Ferragut, Rubén D. Conde, Ana M. Giudici

This study aimed to determine whether the effects on the mouse liver caused by three periods of feeding a protein-free diet for 5 days followed by a normal complete diet for 5 days (3PFD-CD) are prevented by a constant methionine supply (3PFD + Met-CD). The 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 reactions. The liver redox status was examined by measuring the activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), as well as protein carbonylation. Because oxidative stress can result in apoptosis, the activity and content of caspase-3, as well as the x-linked inhibitor of the apoptosis protein (XIAP) and mitochondrial caspase-independent apoptosis inducing factor (AIF) contents were assessed. In addition, the liver histomorphology was examined. Compared to the controls fed a normal complete diet throughout, feeding with 3PFD-CD increased the FAS content, decreased the CAIII content, decreased both the SOD and CAT activities, and increased protein carbonylation. It also activated caspase-3, decreased the XIAP content, decreased the AIF content, increased the number of GSTP1-positive foci and caspase-3-positive cells, and caused fatty livers. Conversely, the changes were lessened to varying degrees in mice fed 3PFD + Met-CD. The present results indicate that a regular Met supply lessens the biochemical changes, damage, and caspase-dependent apoptosis provoked by recurrent dietary amino acid deprivation in the mouse liver.

Participé activamente en el diseño y ejecución de los ensayos de laboratorio con el fin de evaluar el efecto de la malnutrición proteica sobre la apoptosis de hepatocitos dependiente de caspasas. Entre las variables estudiadas se determinó el aminoácido metionina. Además colaboré en la redacción y corrección del manuscrito.

2)

SNS N°9 32-39

Assessment of the effectiveness of chitooligosaccharide from the argentine sea resources to control *fusarium eumartii*

Andrea Yamila Mansilla, Julieta Renée Mendieta, Claudia Virginia Tonón, María Susana Rodríguez, Liliana Albertengo, Claudia Anahí Casalengué

Our specific aim was to study the properties of chitooligosaccharide as a natural agent. The protective action of chitooligosaccharide against the pathogenic fungus *Fusarium solani* f sp *eumartii* (*F. eumartii*) in seedlings of tomato (*Solanum lycopersicum* cultivar Platense) was analyzed. We selected a tomato genotype of horticultural interest in the Province of Buenos Aires and a fungal isolated from the same region. Our results showed that tomato seedlings pretreated with chitooligosaccharide were protected against infection by *F. eumartii*, resulting in a significant decrease in the area of the fungal lesion detected in cotyledons. Moreover, antimicrobial properties by the chitooligosaccharide were demonstrated through a reduction of the mycelial growth and spore germination. The loss of spore viability exerted by the action of chitooligosaccharide revealed its fungicidal effect. Furthermore, the effect of the chitooligosaccharide as elicitor of the plant defense response was also proved. When plants were treated with 0.025% (*m/v*) chitooligosaccharide during 6 hours, an increase of about 40% in the abundance of chitinase as a defense marker protein was measured. Finally, we propose that the chitooligosaccharide represents a natural compound that brings promising biological activities for its use as a natural antimicrobial agent in the horticultural field.

Participé activamente en el diseño y ejecución de los ensayos de laboratorio con el fin de evaluar la actividad antimicrobiana del quitooligosacárido sobre el hongo fitopatógeno *F. solani*. Colaboré en los ensayos de actividad antifúngica y en el análisis de protección de infección en plantas de tomate. Además colaboré en la redacción y corrección del manuscrito.

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.*

1) Vinculación tecnológica. Volumen IV. De la Universidad al Medio Socio Productivo.

Valoración biotecnológica de quitina y quitosano para el desarrollo de películas con aplicación en agricultura

Claudia A. Casalongué, Ana Civatos, Juan Luis Lacomba, Andrea Y. Mansilla, Julieta R Mendieta, Viviana Ramos (Autores por orden alfabético)

La quitina es el polisacárido constitutivo más abundante en los exoesqueletos de insectos y crustáceos. Su derivado más tradicionalmente estudiado es el quitosano. En el presente trabajo se ha propuesto la obtención de quitina y la utilización de quitosano para el desarrollo de películas con potencial uso de aplicación en agricultura. La quitina fue obtenida a partir del desecho de exoesqueletos de langostinos asociados a su comercialización de las industrias pesqueras de la ciudad de Mar del Plata, Argentina. Si bien existen varios métodos de obtención de quitina, en el presente trabajo se utilizó una metodología sencilla en el laboratorio pero de fácil escalonamiento a escala piloto. Esta consistió en un proceso químico de hidrólisis de las proteínas y remoción del material inorgánico utilizando ácidos y álcalis a altas concentraciones pero, a diferencia de la mayoría de los métodos descriptos, el procedimiento se realiza a temperatura ambiente. Para la obtención de películas o filmes se partió de quitosanos de origen comercial y se utilizó la técnica de evaporación de solvente conocida como *casting*, descripta como altamente práctica y sencilla. Se optimizaron las condiciones para la utilización de dichos filmes en el recubrimiento de semillas de trigo.

Participé en la optimización del protocolo para la obtención de quitina en el laboratorio y en los ensayos de análisis de films de quitosano en semillas de trigo. Además colaboré en la redacción y corrección del artículo.

2) Vinculación tecnológica. Volumen IV. De la Universidad al Medio Socio Productivo

Hidrolizados proteicos de pescado a partir de residuos de la industria pesquera con aplicaciones biotecnológicas

Agueda E. Massa, Emilio A. Manca, Andrea Yamila Mansilla, Julieta R. Mendieta, Claudia A Casalangué

Durante las operaciones pesqueras destinadas al procesamiento de pescados y mariscos para consumo humano, se generan residuos (cabezas, vísceras, piel y espinas) que constituyen más del 40% del peso total de los desembarques pesqueros. Estos subproductos presentan compuestos con importantes propiedades nutricionales, funcionales y bioactivas que pueden ser utilizados en diversos sectores industriales. El objetivo del presente estudio fue elaborar hidrolizados proteicos a partir de residuos pesqueros y evaluar su aplicabilidad en la industria agrícola. La materia prima, que fue obtenida de industrias pesqueras marplatenses, se homogeneizó y se sometió a una hidrólisis enzimática. Finalizado dicho proceso, el hidrolizado proteico fue separado y caracterizado químicamente. La composición química de estos productos incluyó compuestos orgánicos (péptidos aminoácidos libres, ácidos grasos omega-3, vitaminas) y minerales (nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio y otros oligoelementos) altamente nutritivos para las plantas y microorganismos beneficiosos. En este contexto, el desarrollo de hidrolizados proteicos de pescado puede considerarse como una alternativa económicamente viable y ecológicamente sustentable para su potencial aplicación biotecnológica.

En este artículo colaboré en los ensayos de análisis del efecto de los hidrolizados de pescado sobre el crecimiento de plántulas de tomate y sobre el desarrollo de la levadura *Saccharomyces cereviceae*. Además colaboré activamente en la redacción, elaboración de figuras y corrección del artículo.

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 IC₅₀ (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 *Pseudomonas syringae* cells taken at exponential growth and incubated in fresh medium for 24 h at 30 °C. Assessed by optical density, GLPI IC₅₀ 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 Journal of Plant Pathology

2) "Salt stress activities and subcellular localization of a Germin-like Protein in wheat leaves"

Mendieta JR*, Mansilla AY*, Paris R, Lombardo C, Bartoli C, Casalangué CA. *Colaboraron de igual manera

Soil salinity impacts negatively on the yield of most crops. High concentrations of salts in the soil make it harder for roots to extract water and have an immediate effect on cell growth and its associated metabolism. Global genes expression analysis in different plant species has revealed that many genes belonging to the protein

multigenes family known as Germin-Like Proteins (GLPs) are regulated following abiotic and biotic stresses. A multifunctional and extracellular GLP from apoplast called GLPI has been characterized. GLPI has been postulated as a model of multienzymatic proteins since it displays at least three enzymatic activities likely linked to biotic/abiotic stress responses. These associated activities are adenosine diphosphate glucose phosphodiesterase (AGPPase), protease inhibitor (PI) and SOD. In order to decipher the physiological roles of GLPI we investigated the GLPI-associated activities and its regulated localization in the first and second leaves in salt-stressed seedlings. The results indicated that salt exposition does promote the localization of GLPI in the cell wall, which was also accompanied by the increase of SOD and PI activities.

Este manuscrito será enviado a la brevedad para su publicación a *Physiologia Plantarum*

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

Nacionales:

- Mansilla AY, Tonón CV, Mendieta JR, Albertengo L, Rodríguez MS, Claudia A Casalengué. “Estudio comparativo de oligoquitosano y celobiosa en el control del hongo fitopatógeno *Fusarium solani* f. sp. *eumartii*”. XI Congreso Argentino de Microbiología de General. Córdoba, Argentina 5, 6 y 7 de agosto de 2015.

Internacionales:

- Mansilla AY, Tonón CV, **Mendieta JR**, Terrile MC, Albertengo L, Rodríguez MS, Casalengué CA. “Chitosan oligomers (ChO) with high potential for a sustainable control of fusariosis in plants” VII SIAQ, Simposio Iberoamericano de Quitina, Nuevo Vallarta, México, 20 al 23 Abril 2015.
- Mansilla AY, Civantos A, Santos-Coquillat A, Martínez-Campos E, **Mendieta JR**, Ramos V, López-Lacomba JL, Casalengué CA. “Acción in vitro de la proteína multifuncional de trigo (IPG) en cultivos de células animales”. VII SIAQ, Simposio Iberoamericano de Quitina, Nuevo Vallarta, México, 20 al 23 Abril 2015.

7.6 INFORMES Y MEMORIAS TÉCNICAS. *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.*

Denominación de la Patente: “Sistemas de liberación controlada de un principio bioactivo que contiene bentonita sódica como vehiculizador y método para su fabricación”. (2015).

Entidades que participaron en la financiación y desarrollo: UNMDP-CONICET

Nº de acta: 20150103248

Autores (por orden alfabético): Chevalier M, Mansilla AY, Mendieta JR, Lanfranconi M, Casalengué CA, Alvarez V.

(Ver documento adjunto en la versión impresa).

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.*

1) PREMIO SENASA (3° premio) a la INVESTIGACION, TRANSFERENCIA Y COMUNICACIÓN 2014-2015: “Innovación de fitosanitarios con inocuidad agroalimentaria y ambiental”. Participa como: Coordinadora del Proyecto.

El uso de biopesticidas y fitosanitarios como productos agronómicos de bajo impacto ambiental constituye una innovación en los modelos productivos actuales. Los cambios ambientales asociados a las condiciones climáticas altamente dinámicas traen consigo el desarrollo de enfermedades y problemas fitosanitarios tal como, es el caso de las enfermedades fúngicas en los cultivos de la región. El uso excesivo de agroquímicos fuertemente tóxicos conlleva a un impacto ambiental negativo tanto en zonas semi-urbanas como rurales ocasionando además, complicaciones sanitarias a la población. El proyecto promueve el desarrollo de conocimiento y resultados científicos referidos tanto a la obtención como aplicación de quitosano (Q) y oligoquitosano (OQ) como fuente de elicitores o inductores de defensa frente a hongos o bacterias fitopatógenas. Las potencialidades de dichos compuestos para el desarrollo de nanopartículas (NPQ) que permitan el encapsulamiento de la proteína antimicrobiana denominada IPG, mejorando y potenciando su disponibilidad y efectividad en los sistemas biológicos, constituirá además, un resultado altamente original. El presente desarrollo de agroinsumos innovadores le confiere alto valor agregado a productos naturales y de origen nacional contribuyendo a su vez, a la producción sustentable de productos hortícolas a través del i) menor uso de agroquímicos tóxicos ii) al consumo de alimentos más saludables y de mejor calidad comercial iii) y a la disminución del impacto ambiental negativo a partir de la recuperación de residuos pesqueros proveniente de los exoesqueletos de langostinos y camarones para la obtención de Q y OQ.

2) Acuerdo de Tránsito de Material (MTA) con Empresa “Diagnóstico Vegetal”. 2014-2015 (ver documento adjunto en la versión impresa).

3) Acuerdo de Tránsito de Material (MTA) con Empresa “AGROFINA S.A.”. 2014-2015 (ver documento adjunto en la versión impresa).

4) RN Ghion. Investigador integrante del proyecto “Desarrollo y Obtención de Biopolímeros Naturales a partir del descarte pesquero y organismos del ambiente marino”. ANR 022/n FONTAR, Lab Químicos Ghion SRL. 2016-2017

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

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.*
- 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.*
- 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° 833/14). “Aplicaciones biotecnológicas del inhibidor de proteasas tipo germina (IPG). Análisis de su actividad antimicrobiana y antitumoral”. Monto recibido \$ 7000. **Responsable: Julieta R. Mendieta.** Período: 2015

- 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.** Período: 2014-2015

- Subsidio otorgado 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. Período: 2014-2015. (EXA 700/14).

- “Estudios y desarrollo de formulaciones basadas en recursos naturales para su utilización como agroinsumos.” Dirección: Dra. Claudia Casalongué. Codirección: **Dra. Julieta R. Mendieta.** Período 2015-2016 EXA 726/15

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

1- Título: “Innovación de materiales y su aplicación para la obtención de recipientes biodegradables adecuados para su utilización en viveros”
Director: Dra. Gavazzo Graciela Beatriz
Institución financiadora: PDTS (proyecto de desarrollo tecnológico y social) - CIN (Consejo interuniversitario nacional)
Período: 2015
Código de Identificación: Resol. P. N° 271/14
Participa como: Miembro del equipo

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

- **2015.** Mención especial, área actividad productiva por el trabajo “Valoración de productos de origen biológico para su aplicación en agronomía” otorgado por la **Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires.**
- **Subsidio para la organización de Reuniones Científicas y Tecnológicas** a realizarse entre julio de 2014 y julio de 2015 **otorgado por la CIC.** Reunión Científica: Biólogos en Red. 15 y 16 de noviembre de 2015. Monto Otorgado: \$ 12000. Acta de Directorio N° 1828/15

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). Faculta 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) Formación de Recursos Humanos:

Director de Prácticas de Investigación realizada por el Sr. Carlos Norberto Rodríguez Simón. Título: “Efecto del inhibidor de proteasas tipo germina (IPG) de trigo en la formación de biofilms bacterianos.” OCA 563/15. Agosto 2015-diciembre 2015.

2) Organización de reuniones y congresos

- Integrante del comité organizador de la X Encuentro Anual de Biólogos en Red. Universidad Nacional de Mar del Plata, 14 y 15 de noviembre de 2015. Publicación de acta de resúmenes ISSN 1853-3426 (versión electrónica).

3) Antecedentes de gestión:

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

4) 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 2015 organizada por el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la Nación
- Integrante de proyecto de Extensión AGUAcadabra: Química y Vida, financiado por la Universidad Nacional de Mar del Plata. OCS N° 823/14

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 H₂O₂ 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 agregando 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). Además desde el 1 de abril de 2016, comenzó a desarrollar su tesis de grado, la estudiante de la carrera de biología, la Srta. Florencia Mesas, quien es beneficiaria de una Beca de Estudiante Avanzado otorgada por la Universidad Nacional de Mar del Plata.

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 (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.