



REVISTA DIGITAL

20 años de BIOTEC en la UNLP

1ra Jornada de Divulgación en Biotecnología

Compiladoras: Crespo Catalina - Serrano Emilia - Villagarcía Ailen



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA



Facultad
de Ciencias
Exactas
UNLP



CAB
Cámara Argentina
de Biotecnología



Fundación
Grupo Delsud

En nombre del comité organizador de la 1ra jornada de divulgación en biotecnología “20 años de Biotec en la UNLP”, llevada a cabo los días 20 y 21 de octubre de 2022, queremos agradecer a todos los que apoyaron nuestra visión para desarrollar este evento. Agradecemos a todo el personal de la Facultad de Cs. Exactas de la UNLP, a la Comisión Específica de la Carrera de Biotecnología y Biología molecular, el Departamento de Cs. Biológicas, y especialmente al Director de la UNLP, el Lic. Martín López Armengol, y al Decano de nuestra Facultad, el Dr. Mauricio Erben, por su apoyo institucional y su presencia en la inauguración. Además, tuvimos el honor de contar con la participación de autoridades académicas, como Nicolás M. Rendtorff (PHD), Secretario de Ciencia y Técnica de la UNLP, Dr. Hugo Valdez, Director de Vinculación Tecnológica de la Facultad de Ciencias Exactas, y Dra. María Antonieta Daza Millone, primer egresada de la Carrera en el año 2006.

Agradecemos también a los oradores, que compartieron sus conocimientos y experiencias con nosotros, enriqueciendo el debate y la reflexión. A María Delfina Cabrera y Fidel Baldi que con su esfuerzo y dedicación hicieron posible la logística. Al personal no docente, que nos brindó su colaboración y asistencia en todo momento. A la Fundación Grupo Delsud y a la Cámara Argentina de Biotecnología por patrocinar este evento. A Biosidus por sus donaciones. Y finalmente, a todos los asistentes, por su interés y participación.

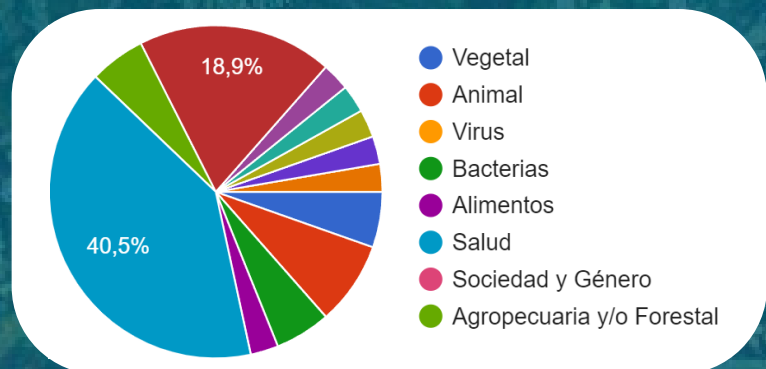
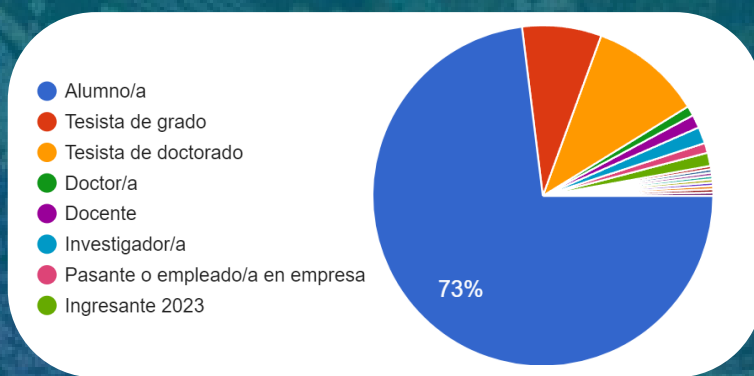
Esta jornada ha sido una oportunidad para celebrar los logros de la carrera de biotecnología, para reflexionar sobre los desafíos actuales y futuros, y para fortalecer los vínculos entre la academia, la industria y la sociedad. Esperamos que hayan disfrutado de las charlas, los debates y las exposiciones.

Gracias a todos por hacer de esta jornada un espacio de aprendizaje, intercambio y celebración de la biotecnología.

Comité Organizador

Esta jornada tuvo como objetivo conmemorar el aniversario de la creación de la carrera de Licenciatura en Biotecnología y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP y generar un espacio de divulgación, intercambio y reflexión sobre los avances y desafíos de la biotecnología en los diversos campos de aplicación que tiene.

Durante los dos días que duró la jornada, se presentaron trabajos de investigación realizados por alumnos, graduados e investigadores de diferentes instituciones y universidades, quienes compartieron sus experiencias y proyectos en el campo de la biotecnología. Los temas abordados incluyeron aspectos relacionados con la biotecnología roja (medicina y sanidad humana), biotecnología marrón (veterinaria), biotecnología dorada (bioinformática), biotecnología amarilla (alimentación) y biotecnología verde (agricultura y vegetales).



La jornada fue un éxito en términos de convocatoria y calidad académica, y demostró el compromiso y el entusiasmo de los estudiantes, graduados y docentes por la biotecnología. Se espera que este tipo de eventos se repitan en el futuro para seguir fortaleciendo el vínculo entre la universidad y la sociedad.

En esta revista se recopilan los distintos trabajos de investigación que se presentaron en la jornada. Esperamos que esta sea de interés y utilidad para todos los lectores que quieran conocer más sobre esta apasionante área del conocimiento.

PROGRAMA JUEVES 21



DRA. CECILIA MUGLIA



DR. MAURICIO ERBEN

Apertura Palabras de bienvenida

Charla: "Los comienzos y evolución de la carrera de Biotecnología en la UNLP".



DR. OSVALDO YANTORNO



DRA. CECILIA MUGLIA



DR. VICTOR ROMANOWSKI



DR. MARIANO PISTORIO



DR. ANDRÉS MC CARTHY



ESTEBAN SILVA

Charla: "De la idea a tu ropa: Cómo nació Protiva"

Sesión de Pósters - Edificio Química, Pasillo Pimer piso

Charla: "Emprendimientos de Base Tecnológica: La Asignatura de grado que marca una diferencia"



DRA. VALERIA E. BOSTO



DRA. GRACIELA CICCIA

Charla: "El mundo de las Startup"

Charla: "Genética forense: ADN en ámbito judicial"



LIC. M. PAULA VIETA

Mesa redonda. Intercambio de experiencias entre graduadxs y alumnx.

PROGRAMA VIERNES 22

Sesión de Pósters - Edificio Química, Pasillo Pimer piso

Charla: "IQVIA y El Mundo de los Ensayos Clínicos"



VIRGINIA GRIBAUDO



DR. GUIDO MASTRANTONIO



DRA. M ELENA MARSON

Charla: "Vinculación social de la ciencia - Proyectos de extensión"

Charla: "Políticas institucionales para el Ingreso, Permanencia y Egreso de la Carrera"



PROF. MYRIAM MIHDI



MG. CINTIA HERNANDEZ

Charla: "Aspectos profesionales del graduado de biotecnología."

Charla: "Experiencia profesional: Rol del biotecnólogo en asuntos regulatorios de productos biológicos/biotecnológicos"



LIC. GISELA SEVERINO



DRA. LINA MERINO

Charla: "Docencia, investigación y extensión: la producción de conocimiento como bien social"

Conversatorio: "Trámites para la presentación y defensa de tesina"

ÍNDICE DE TRABAJOS DE DIFUSIÓN

PAG.

5

6

7

8

9

10

11

12

1. ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS SOBRE ESTRUCTURAS NANOPOROSAS DE SILICA, UN ESTUDIO POR SIMULACIÓN

TARRAGA WILSON A. - WILSON14T17@GMAIL.COM

2. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UN NUEVO INHIBIDOR DE TRIPSINA DE MORRÓN AMARILLO, CON ACTIVIDAD INHIBITORIA DEL CRECIMIENTO DE CÁNDIDA ALBICANS

ROSSOTTI MARTINA - MARTINAROSSOTTI@BIOL.UNLP.EDU.AR

3. ALTERATIONS IN NHE1 OVEREXPRESSING MITOCHONDRIA

DE FAZIO RAYEN - RAYENDEFAZIO@GMAIL.COM

4. APLICACIÓN DE TÉCNICAS FOTÓNICAS AL ESTUDIO DEL TRANSPORTE ELECTRÓNICO ENTRE CITOCROMOS DE LA CADENA TRANSPORTADORA DE ELECTRONES Y COMPLEJOS DE METALES DE TRANSICIÓN

SERRANO EMILIA - EMI.SERRANO7@GMAIL.COM

5. BIODEGRADACIÓN DE FENOL Y FACTIBILIDAD DE PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS EN UN SBR GRANULAR AERÓBICO

BERRETTA INVERNIZZI GEORGINA - GEORGINAB90@GMAIL.COM

6. BIOMATERIALES Y SU APLICACIÓN EN INGENIERÍA DE TEJIDO PARA LESIONES ÓSEO-CARTILAGINOSAS

LASTRA MARIA LAURA - LMALaura@HOTMAIL.COM

7. CICATRIZACIÓN DE HERIDAS MEDIANTE TRASPLANTE ALOGÉNICO DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE CORDÓN UMBILICAL

IRIBARNE AILEN - AIRIBARNE@MED.UNLP.EDU.AR

8. DISEÑO Y OBTENCIÓN DE BIOMATERIALES PARA SU EMPLEO EN SALUD - PRESENTACIÓN DE LÍNEAS DE TRABAJO

BELLUZO MARIA SOLEDAD - SOLEDADBELLUZO@HOTMAIL.COM

- | | |
|--|-----------|
| 9.
DOWNREGULATION OF CARDIAC NBCN1 ISOFORM INCREASES BLOOD PRESSURE IN RATS
GALLO DELFINA - DELFINA.GALLO@OUTLOOK.COM | 13 |
| 10.
EFFECTO DEL ÁCIDO ALFA LIPOICO (AAL) SOBRE EL DESARROLLO Y LA CALIDAD DE EMBRIONES BOVINOS PRODUCIDOS IN VITRO
FABRA MARIANA - MARICFABRA@GMAIL.COM | 14 |
| 11.
EFFECTO TOXICOLÓGICO IN VITRO DEL ANTIPARASITARIO AMITRAZ (AMZ) SOBRE EL ESPERMATOZOIDE BOVINO Y SU IMPACTO EN EL DESARROLLO Y CALIDAD EMBRIONARIA
URRUTIA LUNA NAIARA - NAI.LUNAA@GMAIL.COM | 15 |
| 12.
EFFECTOS DE LA DIETA RICA EN FRUCTOSA EN HEMBRAS MURINAS DE EDAD REPRODUCTIVA: FALTA DE RESISTENCIA A LA INSULINA Y ALTERACIONES CARDÍACAS SISTÓLICAS
PALOMEQUE JULIETA - JPALOMEQUE@CICLAPLATA.ORG.AR | 16 |
| 13.
EFFECT OF OPN3 AND MC4R ON KIR7.1 MEDIATED CURRENTS
PINTO VICTORIA - VICPINTO98@GMAIL.COM | 17 |
| 14.
EL HONGO ENTOMOPATÓGENO BEAUVERIA BASSIANA ENDÓFITO EN SOJA COMO POTENCIAL BIOCONTROLADOR DE LA CHINCHE FITÓFAGA PLAGA EDESSA MEDITABUNDA
ESPÍN SÁNCHEZ DAYSI - DAYSI97ESPINSANCHEZ@GMAIL.COM | 18 |
| 15.
ENFERMEDADES METABÓLICAS Y SUS EFECTOS SOBRE TEJIDO ÓSEO Y SISTEMA VASCULAR: MECANISMOS, PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO
MARTINI NANCY - NANCYMARTINI2022@GMAIL.COM | 19 |
| 16.
ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DEL PILI TIPO TAD DE BRADYRHIZOBIUM DIAZOEFFICIENS USDA 110
SERRANGELI JUAN SIMÓN - JUANSERRANGELI@GMAIL.COM | 20 |
| 17.
EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA DEL FLUAZURÓN EN LA MADURACIÓN NUCLEAR Y CITOPASMÁTICA DE OVOCITOS BOVINOS IN VITRO
CAMPAGNA ANABELLA ANDREA - ANABELLA.CAMPAGNA@GMAIL.COM | 21 |
| 18.
EVALUATING MICROGLIA DIVERSITY THROUGHOUT RAT LIFESPAN
CERVELLINI SOFIA - SOFICERVELLINI@GMAIL.COM | 22 |

	PAG.
19. FABRICACIÓN DE UN NANOCOMPUESTO BASADO EN CELULOSA BACTERIANA COMO SOPORTE DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CARGADAS CON UN EXTRACTO DE PROPÓLEO HORUE MANUEL - MANUELHORUE@GMAIL.COM	23
20. FORMULACIONES ANTI-MICROBIANAS DE NANO-YERBA MATE: HACIA UN TRATAMIENTO TÓPICO DE LA QUERATITIS BACTERIANA GUERIN STABILE SOFIA - SGUERINST@GMAIL.COM	24
21. GENETICALLY ENCODED PH SENSORS TARGETING CELLULAR MICRODOMAINS CIARROCCHI SOFÍA - SOFIACIARROCCHI9@GMAIL.COM	25
22. IDENTIFICACIÓN DE GEN DE TANASA DE ASPERGILLUS AWAMORI CECT 2905 PARA SU CLONADO Y EXPRESIÓN EN PICHIA PASTORIS ORTEGA MARCOS - MARCOSORTEGA@INTI.GOB.AR	26
23. INGREDIENTES ENTOMOLÓGICOS PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE POLVO DE GRILLO (GRYLLUS ASSIMILIS) TORIBIO EZEQUIEL - EZEQUIELTORIBIO@BIOL.UNLP.EDU.AR	27
24. LOMBRICULTURA: UNA BIOTECNOLOGÍA PARA LA SUSTENTABILIDAD. EXPERIENCIA PEDAGÓGICA MARÍA TERESA CASTRO - MARIATCASTRO@ABC.GOB.AR	28
25. LOS CAMBIOS EN LA [GLUCOSA]E INDUCEN EVENTOS ARRITMOGÉNICOS EN CARDIOMIOCITOS AISLADOS Y CORAZONES ENTEROS DE ANIMALES SANOS: ROL SLGT1 ILLANES ALONZO - ILLANESALONZO123@GMAIL.COM	29
26. NANOVESÍCULAS CON CURCUMINA PARA TERAPIA FOTODINÁMICA ANTITUMORAL CAPUTO EZEQUIEL - EZEQUIEL.N.CAPUTO@GMAIL.COM	30
27. OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, ANTIHIPERTENSIVA Y ANTITROMBÓTICA MEDIANTE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE EXPELLER DE CHÍA VERA GONZÁLEZ SOFÍA MACARENA - SOFI0.SG73@GMAIL.COM	31
28. PARTICIPACIÓN DE APOLIPOPROTEÍNA A-I EN EL PERFIL ANTI-INFLAMATORIO EN MACROFAGOS THP1 ROA CRISTIAN - CRISTIANROA14@GMAIL.COM	32

- 29. PIGMENTOS FÚNGICOS DE METARHIZIUM ROBERTSII: MELANINAS TIPO DHN Y SU ROL EN LA FORMACIÓN DE MICROESCLEROCIOS**
HUARTE BONNET CARLA - CARLAHB@HOTMAIL.ES
- 30. PLASMA THERAPY TO REVERSE AGE-RELATED DECLINE**
PASQUINI CAMILA - DPASQUINI@MED.UNLP.EDU.AR
- 31. PRIMEROS APORTES EN LA DETECCIÓN DE WOLBACHIA EN INSECTOS VECTORES DE LENGUA AZUL.**
LEGUIZAMON ALAN AGUSTIN - AALEGUIZAMON.99@GMAIL.COM
- 32. REGULACIÓN DE CARGA EN PROTEÍNAS: EL ROL DEL EQUILIBRIO DE PROTONACIÓN**
CATHCARTH MARILINA - MCATHCARTH@INIFTA.UNLP.EDU.AR
- 33. ROL DE LA SINTESIS DE LACTATO EN LA DEFENSA AL ESTRÉS ACIDO EN SINORHIZOBIUM MELILOTI**
MOLFESA KACZORUK CARLOS ULISES - CARLOSMOLFESA1B@GMAIL.COM
- 34. ROL DEL ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO Y DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN LA DISFUNCIÓN DE LAS CÉLULAS B PANCREÁTICAS INDUCIDA POR DIETA RICA EN FRUCTOSA**
FARROMEQUE VÁSQUEZ SHERLEY CATHERINE - SHIRLEY_CFV@HOTMAIL.COM
- 35. SEPARACIÓN INMUNOMAGNÉTICA Y DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA DE BACTERIAS**
EMILIO IAN - IEMILIO@INTI.GOB.AR
- 36. SEPARACIÓN POBLACIONAL DE NANOPARTÍCULAS DE ORO MEDIANTE LA GENERACIÓN DE FUERZAS DE DEPLECIÓN PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS**
BOGGAN SIMAL GUILLERMINA - GUILLERMINABOGGAN@GMAIL.COM
- 37. SUPERFICIES NANOESTRUCTURADAS PARA BIOSENSADO Y ESTUDIO DE INTERACCIONES BIOMOLECULARES**
DAZA MILLONE MARÍA ANTONIETA - DAZAMILLONE@GMAIL.COM

33

34

35

36

37

38

39

40

41

ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS SOBRE ESTRUCTURAS NANOPOROSAS DE SILICA, UN ESTUDIO POR SIMULACIÓN

Tarraga WA; Picco, AS; Longo, GS

Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA)

PALABRAS CLAVE: adsorción de proteínas, nanoporos, simulación molecular.

A lo largo de las últimas décadas la adsorción de proteínas sobre superficies sólidas ha tomado relevancia tanto en la industria como en la medicina. Mientras que la adsorción sobre superficies planas ha sido ampliamente estudiada, la interacción con materiales nanoporosos representa un campo de investigación relativamente nuevo, donde su mecanismo permanece poco explorado.

El objetivo central del presente trabajo consiste en estudiar el proceso de adsorción de proteínas sobre estructuras nanoporosas de SiO_2 utilizando técnicas de simulación molecular. Distintas proteínas (citocromo c, lisozima y mioglobina) se emplearon como modelos de grano grueso basados en sus estructuras cristalográficas. Mientras que el material nanoporoso fue modelado mediante un único poro cilíndrico con propiedades que asemejan al SiO_2 . Nuestro enfoque teórico-computacional al problema permite el estudio de sistemas macromoleculares en función de las condiciones del medio, logrando alcanzar escalas espaciales del orden de decenas de nanómetros, considerando el tamaño, la forma, la distribución de carga, las configuraciones y los estados químicos de las diferentes especies químicas presente en el sistema.

La interacción efectiva entre las proteínas y la superficie de silica fue analizada a través del potencial de fuerza media (*pmf*, por sus siglas en inglés), observándose diferencias de adsorción entre la superficie plana y la del poro. Por otro lado, se caracterizaron perfiles de adsorción proteica por unidad de longitud de poro en función del pH, donde esta incrementa con el radio de poro (ejemplo con citocromo c). Además, estos perfiles mostraron diferencias en el valor de pH al cual se alcanza la adsorción máxima, observándose corrimientos en estos valores. Finalmente, evaluando el efecto que posee la concentración salina del medio, esta afectó de manera negativa la adsorción con cada una de las proteínas.

El enfoque teórico propuesto en este trabajo nos permitió estudiar un proceso complejo como lo es la adsorción de proteínas a superficies sólidas nanoporosas. Se evaluaron y determinaron como distintas variables afectan a este proceso, tales como: la concentración salina, el pH y el radio de poro del material. De esta manera, los resultados obtenidos en este trabajo permiten el diseño racional de estructuras nanoporosas con fines aplicables tanto en la industria como en la medicina donde es necesario una adsorción controlada de proteínas.

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UN NUEVO INHIBIDOR DE TRIPSINA DE MORRÓN AMARILLO, CON ACTIVIDAD INHIBITORIA DEL CRECIMIENTO DE CÁNDIDA ALBICANS

Rossotti, M; Ozón, B; Geier, F; Vera González, SM; Claver, S; Obregón, WD; Cotabarren, J

Centro de Investigación de Proteínas Vegetales (CIProVe), FCEX – UNLP.

PALABRAS CLAVE: inhibidor de proteasas, antifúngico, productos naturales, *Capsicum annuum* L, YBPTI.

En este trabajo se informa el aislamiento, purificación y caracterización de un nuevo inhibidor de tripsina aislado a partir de semillas de morrón amarillo (*Capsicum annuum* L.) sobre el cual se evalúa actividad antifúngica frente a diversas cepas de Cándidas.

Dicho inhibidor (al que denominamos YBPTI) presentó una estabilidad fisicoquímica muy alta, manteniendo un 60% de la actividad inhibitoria de tripsina residual luego de ser incubado durante 60 min a pHs extremos (pH 2 y pH 12) y un 74,65% luego de 1 hora a 100°C. Ensayos cinéticos permitieron determinar una constante cinética de inhibición (K_i) de $1,7 \times 10^{-6}$ M y una IC₅₀ (concentración de inhibidor que produce 50% de inhibición de tripsina) de 3,9 µg/ml. Otro hallazgo interesante para su potencial uso biomédico fue la evidencia de una fuerte capacidad inhibitoria de la enzima α-1,4-glucosidasa con una IC₅₀ de 75,33 ng/ml, resultado muy prometedor para la potencial aplicación de YBPTI como agente hipoglucemiante natural. Finalmente se evaluó su actividad antifúngica frente a diversas levaduras. Fue posible observar que 5 µg de inhibidor provocaron inhibición del crecimiento de *Cándida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*, mientras que no hubo efecto sobre el crecimiento de *Cándida tropicalis*, *Cándida krusei*, *Cándida glabrata* y *Rhodotorula spp.* Mediante el ensayo de dilución en placa fue posible determinar una Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de 5,7 µg/ml y una Concentración Fungicida Mínima (CFM) de 17,03 µg/ml, valores que se corresponden con un efecto fungicida del YBPTI sobre *C. albicans* (CFM/CIM<4). Por microscopía óptica fue posible evidenciar los cambios morfológicos producidos por YBPTI sobre las células de *C. albicans* así como también se pudo evaluar su efecto sobre la membrana plasmática mediante la adición de SYTOX Green. Este resultado es de especial importancia ya que promueve al inhibidor de tripsina de *Capsicum annuum* L., como una molécula con el potencial de convertirse en un fármaco natural contra la infección causada por *C. albicans*, muy eficiente y potente a muy bajas concentraciones.

Estos resultados son prometedores para profundizar el estudio del efecto antifúngico de YBPTI y su caracterización molecular, permitiendo el descubrimiento de nuevas moléculas de origen natural con potencial para su empleo en la industria farmacéutica. Se propone continuar estudiando cuál el mecanismo de inhibición de crecimiento sobre Cándidas que ejerce YBPTI.

ALTERATIONS IN NHE1 OVEREXPRESSING MITOCHONDRIA

De Fazio, R; Ciano, MC; Orlowski, A; Aiello, EA; Jaquenod De Giusti, C

Centro de Investigaciones Cardiovasculares – CONICET – UNLP – Facultad de Ciencias Médicas,

Mitochondria are not only implicated in energy production but also in pathological events. Mitochondrial dysfunction has been related to the development of several pathologies including heart failure and diabetes. The Na^+/H^+ exchanger 1 (NHE1) is one of the main alkalizing mechanisms in the heart and its hyperactivity has been observed in several heart conditions, including diabetic cardiomyopathy. In obese and diabetic mice mitochondria NHE1 expression is increased despite similar cardiac levels, together with altered calcium handling reverted in the presence of an NHE1 inhibitor.

AIM: understanding the consequences of increased mitochondrial NHE1 expression.

MATERIALS AND METHODS: HEK293T cells were transfected with a mitochondrial-targeted NHE1 expression vector (pmitoNHE1). Mitochondrial membrane potential was expressed as JC-1 aggregate/monomer fluorescence. Mitochondrial pH was measured using a mitochondrial-targeted pH sensor. Data are expressed as means $\pm$ SEM and are compared with Student's t-test.

RESULTS: Mitochondrial NHE1 overexpression resulted in increased mitochondrial membrane potential, similar to our observations in obese and diabetic mitochondria (0,6140 in control vs 0,7561 in pmtoNHE1 cells, $p < 0,05$). Cells overexpressing pmtoNHE1 had increased H^+ flux after an acid load (0,07798 in control vs 0,1302 -dpH units/min in pmtoNHE1 cells, $p < 0,05$) and reduced mitochondrial pH (7,062 in control vs 6,946 in pmtoNHE1 cells, $p < 0,05$) confirming its H^+ pumping activity into the mitochondrial matrix. However, pmtoNHE1 overexpressing cells had increased H^+ flux into mitochondria after CCCP treatment (1,265 in control vs 2,213 in pmtoNHE1 cells, $p < 0,05$), probably due to the increased membrane potential.

CONCLUSIONS: our results show a correlation between increased mitochondrial NHE1 expression with altered mitochondrial potential and pH control. Measuring mitochondrial Ca^{2+} content is essential to understanding the role of mitochondrial NHE1.

APLICACIÓN DE TÉCNICAS FOTÓNICAS AL ESTUDIO DEL TRANSPORTE ELECTRÓNICO ENTRE CITOCROMOS DE LA CADENA TRANSPORTADORA DE ELECTRONES Y COMPLEJOS DE METALES DE TRANSICIÓN

Serrano, ER; Gara, D; Pedro, M

Centro de Investigaciones Ópticas (CIOp), CONICET - CIC - UNLP.

PALABRAS CLAVE: fotoquímica, fotofísica, fotoacústica, transporte de electrones, cadena transportadora, citocromo c, citocromo c oxidasa, complejos de coordinación, metales de transición, renio, rutenio.

La fotofosforilación es la culminación del metabolismo productor de energía en los organismos fotosintéticos, sintetizando ATP a partir de la energía solar absorbida. Este proceso se lleva a cabo mediante una serie de complejos supramoleculares anclados en membranas, los cuales forman la cadena transportadora de electrones. Para nuestro estudio centramos el análisis en la transferencia de carga (TC) entre los complejos concatenados III y IV mediante métodos fotoacústicos (LIOAS), espectrofotométricos y computacionales. Analizamos la cinética y termodinámica de TC entre un complejo de Ru(II) y Re(I), los cuales se oxidan, y el Citocromo c, el cual se reduce ganando electrones. La transferencia es iniciada por un pulso láser que genera cambios volumétricos en la muestra de reacción: una contracción seguida de dos expansiones volumétricas para el Citocromo c y el complejo de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$. Posteriormente, considerando un modelo biológico análogo, estudiamos la transferencia de carga entre el Citocromo c y el centro Cu de la Citocromo c Oxidasa (CcO), donde el Citocromo c se oxida y la CcO se reduce. Luego de la experiencia, definimos los 4 intermediarios de reacción formados: el complejo proteico excitado Citocromo c - centro Cu de la CcO; especies ferrosas del complejo proteico; especies oxiferrosas del complejo proteico; y finalmente, la transferencia electrónica de corto rango entre el oxígeno y el grupo hemo.

Concluimos que las técnicas utilizadas nos permitieron obtener información de los cambios conformacionales sufridos por las proteínas durante los procesos de transferencia de carga medidos en función del cambio de presión inducido en una muestra líquida luego de la excitación con un pulso láser, directamente relacionados con un cambio de volumen estructural. Además, el análisis nos permitió obtener el tiempo de vida de las especies transientes durante la transferencia de carga, y la medida de los cambios energéticos sufridos por el sistema de estudio.

REFERENCIAS: [1] Abriata, L. A., & Vila, A. J. (2014). Redox-state sensing by hydrogen bonds in the Cu center of cytochrome c oxidase. *Journal of inorganic biochemistry*, 132, 18-20. [2] Gensch, T., & Viappiani, C. (2003). Time-resolved photothermal methods: accessing time-resolved thermodynamics of photoinduced processes in chemistry and biology. *Photochemical & photobiological sciences*, 2(7), 699-721.

BIODEGRADACIÓN DE FENOL Y FACTIBILIDAD DE PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS EN UN SBR GRANULAR AERÓBICO

Berretta Invernizzi, G¹; Zaritzky, N¹; Ferro Orozco, M²; Caravelli, A¹

¹Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA). ²Instituto de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de Materiales (INTEMA). Av. Colón 10850, Mar del Plata, 7606, Argentina.

PALABRAS CLAVE: fenol, biogránulos aeróbicos, polihidroxialcanoatos.

INTRODUCCIÓN: Los compuestos fenólicos presentes en diversos efluentes poseen alta toxicidad¹. Una alternativa para su eliminación es el uso de biogránulos, los cuales pueden formarse a partir de lodos activados en reactores discontinuos secuenciales (SBR).

En los últimos años ha crecido el interés en revalorizar efluentes para generar productos con valor agregado como polihidroxialcanoatos (PHAs), polímeros con propiedades similares a plásticos petroquímicos². En el presente trabajo se estudió la eficiencia de un SBR granular aeróbico para remover fenol y la factibilidad de acumular PHAs.

MATERIALES Y MÉTODOS: El SBR consistió en una columna aireada alimentada con un efluente sintético: acetato de sodio y fenol como fuente de carbono y energía (FCE), DQO:N:P=100:5:2. Se operó en 4 condiciones: Aclimatación, carga baja de fenol (BF), media (MF) y alta (AF). Ciclos operativos=24 hs. Se determinó demanda química de oxígeno, concentración de fenol y biomasa (ST), microscopía y detección de PHA (tinción Sudan Black), índice de sedimentabilidad volumétrico (ISV) y velocidades volumétricas y específicas de remoción de fenol (r_{fenol} , mg/(L.h; q_{fenol} , mg/(gST.h)).

RESULTADOS: Se logró remoción completa de fenol. La reducción del tiempo de sedimentación y el aumento de la carga de fenol permitieron la selección de gránulos de sedimentación rápida y mayor velocidad de remoción. Se detectó la presencia de gránulos intracelulares de PHA.

CONCLUSIONES: Utilizando fenol como única FCE se logró un sistema estable con alta capacidad de degradación. La detección intracelular de PHA es prometedora para continuar en futuros estudios de revalorización de efluentes fenólicos.

REFERENCIAS: [1] Mahugo Santana, Cristina, et al. "Methodologies for the extraction of phenolic compounds from environmental samples: new approaches." *Molecules* 14.1 (2009): 298-320. [2] Serafim, Luisa S., et al. "Strategies for PHA production by mixed cultures and renewable waste materials." *Applied microbiology and biotechnology* 81.4 (2008): 615-628.

BIOMATERIALES Y SU APLICACIÓN EN INGENIERÍA DE TEJIDO PARA LESIONES ÓSEO-CARTILAGINOSAS

Lastra, ML; Bada, RA; Pérez, L; Hurtado Cuba, A; Marotta, V; Wanionok, NE; Fernández, JM; Molinuevo, MS; Cortizo, AM; McCarthy, AD

Laboratorio de Investigación en Osteopatías y Metabolismo Mineral (LIOMM). Facultad de Cs Exactas, UNLP-CIC PBA, La Plata, Bs. As., Argentina.

PALABRAS CLAVE: ingeniería de tejidos, biomateriales, biocompatibilidad, lesiones óseo- cartilaginosas.

El tejido óseo se caracteriza por poseer capacidad de auto reparación; sin embargo, frente a grandes fracturas o situaciones fisiopatológicas que lo afectan (como la osteoporosis, osteonecrosis, tumores, entre otras) es necesario considerar la intervención médica cuyos tratamientos poseen diversas limitaciones. La ingeniería de tejidos emplea biomateriales con o sin el agregado de células y/o moléculas bioactivas para promover el crecimiento tisular, siendo una alternativa promisorio a los tratamientos convencionales. La función primaria de los biomateriales es mantener el balance de las funciones mecánicas mientras que favorecen la adhesión, migración, proliferación, diferenciación celular y la síntesis de la matriz propia del tejido. El comportamiento de las células sobre los materiales es, en última instancia, quien determina el destino de las células y la capacidad de regeneración tisular. Entonces, se postula que regulando sus propiedades (físicoquímicas, características estructurales, mecánicas, etc.) se lograría que los biomateriales respondieran mimetizando la matriz extracelular y modulando el desarrollo celular de manera de lograr una reparación más eficiente del tejido.

En el LIOMM (liomm.exactas.unlp.edu.ar) se estudian polímeros sintéticos y naturales para su posible uso en ingeniería de tejidos. Para ello se sintetizan y caracterizan los materiales poliméricos empleando técnicas como cromatografía de exclusión molecular, resonancia nuclear magnética, viscosimetría, etc. Se emplean distintas técnicas de modelado como *solvent-casting*, liofilización, *electrospinning* y formación de micro y nanoestructuras. Una vez caracterizados los distintos *scaffolds*, se estudia su biocompatibilidad *in-vitro*, empleando líneas celulares (osteoblastos, macrófagos) y cultivos primarios (células progenitoras, condrocitos, odontoblastos). Para ello, se utilizan técnicas de cultivo celular, ELISA, inmunofluorescencia, *western-blot*, PCR, etc. También contamos con un modelo de lesión ósea quirúrgica en rata para evaluar los biomateriales *in-vivo*. Para llevar a cabo estos trabajos y entendiendo que la ingeniería de tejidos es un área interdisciplinaria, trabajamos en colaboración con varios grupos de investigación nacionales e internacionales de reconocida trayectoria.

CICATRIZACIÓN DE HERIDAS MEDIANTE TRANSPLANTE ALOGÉNICO DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE CORDÓN UMBILICAL

Iribarne, A¹; Palma, MB¹²; Seoane Rocha, C¹²; Andrini, L¹; Riccillo, F¹; Buero, G³; Rodriguez, D⁴; Pelinski, P⁵; Miriuka, S²; Carosella, ED⁶⁷; Garcia, MN¹

¹Catedra de Citología, Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, Bs. As., Argentina. ²LIAN-CONICET, FLENI Escobar, Bs. As., Argentina. ³Sanatorio Mater Dei, CABA, Argentina. ⁴Centro de Reproducción Equina La Adela, Chascomús, Bs. As., Argentina. ⁵Hospital Español, La Plata, Bs. As., Argentina.

⁶Commissariat a l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA), Service de Recherche en Hemato-Immunologie (SRHI), Saint-Louis Hospital, Paris, France. ⁷Universite Paris Diderot, Sorbonne Paris Cite, IUH, Hospital Saint-Louis, Paris, France.

En condiciones fisiológicas normales, la restauración de una barrera epidérmica funcional es eficaz; sin embargo, algunas patologías pueden interferir generando un defecto cutáneo ulcerativo crónico, una de las complicaciones reconocidas de la diabetes. La mayoría de estas úlceras venosas crónicas no cicatrizan con los tratamientos convencionales aprobados, generando infecciones y complicaciones en el paciente. Los tratamientos basados en el uso de células madre mesenquimales (CMM) autólogas han tenido éxito; sin embargo, su implementación conlleva complicaciones.

La gelatina de Wharton de cordón umbilical ofrece una fuente ilimitada de CMM adultas (CMMcu) con las mismas características relevantes para la aplicabilidad clínica. El presente trabajo tiene como objetivo demostrar la seguridad, eficacia y potencial terapéutico del uso de CMMcu humanas y equinas en la cicatrización de heridas dérmicas crónicas. Para ello se realizaron una serie de ensayos in vitro e in vivo. En el co-cultivo de CMMcu y células mononucleares de sangre periférica (CMSP), se observó la inhibición de la proliferación de las CMSP, demostrando que las CMMcu tanto humanas como equinas son capaces de generar un entorno tolerogénico. Por otro lado, se llevaron a cabo trasplantes xenogénicos de las CMMcu en ratones inmunocompetentes, en los cuales se realizó una lesión dérmica y, en sus bordes, se inyectaron las CMMcu murinas, equinas y humanas. El análisis de la evolución de la lesión permitió demostrar que las CMMcu de las 3 especies mejoran la cicatrización de heridas y recuperación de la pilosidad. Además, el trasplante alogénico de las CMMcu y aún más el xenogénico, no generaron rechazo ni signos de inflamación. El HLA-G es un punto de control inmunitario (CI) que se expresa ampliamente en CMMcu humanas, tiene un ortólogo funcional Q2a en ratón y hallamos que los equinos tienen una proteína CI similar. Como es sabido, el HLAG y sus ortólogos generan una inhibición del sistema inmune local, lo cual podría explicar la aceptación al trasplante de CMMcu. De esta manera, las CMMcu podrían jugar un papel importante en medicina regenerativa, aportando una nueva y eficaz alternativa terapéutica, no solo en humanos con lesiones dérmicas crónicas, sino también en otras especies como los caballos, que presentan frecuentes lesiones cutáneas en las patas.

DISEÑO Y OBTENCIÓN DE BIOMATERIALES PARA SU EMPLEO EN SALUD – PRESENTACIÓN DE LÍNEAS DE TRABAJO

Cortizo, MS; Peruzzo, PJ; Oberti, TG; Belluzo, MS.

Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), Universidad Nacional de La Plata, CC 16
Suc. 4, CONICET, CCT-La Plata, Bs As., Argentina.

PALABRAS CLAVE: biomateriales; síntesis de polímeros a medida, nanorefuerzos.

Nuestro grupo (Macromoléculas) trabaja desde hace muchos años en el diseño y desarrollo de biomateriales poliméricos (sintéticos y/o naturales) que puedan emplearse en el área de la salud, en aplicaciones tales como regeneración de tejidos y/o sistemas de liberación de drogas de interés farmacológico. El objetivo de este trabajo es dar a conocer nuestras líneas de investigación, las cuales engloban la síntesis a medida de polímeros sintéticos por diversas técnicas (RAFT, ATRP, GTP, etc.), la obtención de polímeros naturales a partir de su fuente de origen nacional y la preparación de nanorefuerzos que mejoren las propiedades finales de los materiales obtenidos. Asimismo, nuestro grupo posee gran experiencia en los métodos de obtención de estos biomateriales según la aplicación buscada, entre los que se pueden citar membranas por electrodeposición o casting para generar parches transdérmicos de liberación de drogas, esponjas por liofilización con porosidad adecuada para regeneración de tejido óseo, membranas semiinterpenetradas tipo gel para regeneración de cartílago, entre otros. Finalmente, nuestro grupo lleva a cabo todos los estudios para la caracterización de los materiales obtenidos, sus propiedades finales y su posible compatibilidad biológica para la aplicación biomédica buscada (éstos últimos en colaboración con el Laboratorio de Investigación en Osteopatías y Metabolismo Mineral -LIOMM- perteneciente a la Facultad de Ciencias Exactas).

DOWNREGULATION OF CARDIAC NBCN1 ISOFORM INCREASES BLOOD PRESSURE IN RATS

Gallo, D¹; Di Mattia, R¹; Ciarrocchi, S¹; Blanco, P²; Portiansky, E³; Orlowski, A¹; Aiello, EA¹

¹Centro de Investigaciones Cardiovasculares "Dr. Horacio Cingolani", Facultad de Ciencias Médicas, UNLP-CONICET. La Plata, Argentina. ²Servicio de Cardiología, Facultad de Veterinaria, UNLP, La Plata, Argentina. ³Laboratorio de Análisis de Imágenes, Facultad de Veterinaria, UNLP-CONICET. La Plata, Argentina.

INTRODUCTION: Cardiac cells depend on specific sarcolemmal ion transporters to assure the correct intracellular pH regulation. The $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransporter (NBC) is one of the mayor alkalinizing transporters. In the heart, two different NBC isoforms have been described: the electroneutral NBCn1 ($1\text{Na}^+:1\text{HCO}_3^-$) and the electrogenic NBCE1 ($1\text{Na}^+:2\text{HCO}_3^-$).

AIMS: Preliminary results from our lab demonstrated that specific cardiovascular downregulation of NBCE1 induced cardiac hypertrophy (CH) without changes in blood pressure (BP). However, no clear reports about the role of the NBCn1 in these cardiovascular parameters are available. Thus, we developed an interference RNA cloned in a cardiotropic adeno-associated vector (AAV9-shNBCn1) to study the effect of the specific inhibition of NBCn1 in CH and BP.

MATERIALS AND METHODS: We delivered the virus through a lateral tail vein injection in male 3-4 months old Wistar rats and then performed a series of studies to assess CH, using an AAV9-shControl as control. Data is expressed as means $\pm$ S.E.M. and was compared with Student's t-test or two-way ANOVA test as was needed.

RESULTS: After 30 days of injection, we confirm a significant reduction on NBCn1 ventricular expression in Wistar rats. Furthermore, preliminary data suggest a compensatory increase in NBCE1 expression. Although rats injected with shNBCn1 exhibited a significant increase in systolic blood pressure (shControl: 132.1 ± 3.65 , n=6; shNBCn1*: 151.2 ± 4.29 , n=4; $p<0.05$ vs. shControl), no changes in left ventricular mass index obtained by echocardiography or cross-sectional area of cardiomyocytes were found.

CONCLUSION: These data suggest that vascular NBCn1 silencing provoked a sustained increase in blood pressure in rats. However, no differences were found in heart size. This apparent contradiction between vascular and cardiac data might be explained by the fact that the hypertension assessed in the model was modest or CH requires more time to develop.

EFECTO DEL ÁCIDO ALFA LIPOICO (AAL) SOBRE EL DESARROLLO Y LA CALIDAD DE EMBRIONES BOVINOS PRODUCIDOS IN VITRO

Fabra, M; Campagna, A; Carranza, A; Anchordoquy, JP; Farnetano, N; Anchordoquy, JM; Nikoloff, N; Furnus, C

Instituto de Genética Veterinaria "Ing. Fernando N Dulout" (IGEVET UNLP- CONICET LA PLATA), Facultad de Ciencias Veterinarias - UNLP, Calle 60 118, B1904AMA La Plata, Bs. As., Argentina.

La producción *in vitro* (PIV) de embriones es una biotecnología reproductiva que está en auge por su potencial en la producción ganadera, pero la calidad de los embriones producidos *in vitro* es inferior a los *in vivo*, manifestándose en alteraciones ultraestructurales, aumento de apoptosis, daño en el ADN, y detenimiento embrionario.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la suplementación con el antioxidante AAL (2,5 μ M) en el cultivo *in vitro* (CIV) de embriones bovinos durante 24 h, sobre la velocidad de desarrollo, tasa y calidad de los blastocistos. Se utilizaron ovocitos de ovarios de frigorífico sometidos a las etapas de PIV (maduración, fertilización y CIV) en una atmósfera gaseada (5% CO₂; 39 °C; 7% O₂). Se evaluaron tasa de clivaje 48 h post fertilización, clasificando clivados de 2 a 4 células (2-4c) y de más de 4 células (>4c); blastocistos al día 7-8 (B7-B8) y blastocistos totales (BT). La tinción con Hoechst 33342 se empleó para estudiar el número total de células (NTC) por embrión en B8. Además, se evaluó la calidad de los B7 y B8 siguiendo la clasificación propuesta por la *International Embryo Transfer Society* (IETS). De un total de 508 embriones: 263 fueron evaluados para velocidad y tasa de desarrollo, 50 para conteo de NTC, y 195 se clasificaron según IETS. El modelo estadístico incluyó un enfoque bayesiano utilizando una distribución previa normal y no informativa para calcular los ICB del 95 %. Se consideró diferencia cuando $p < 0,05$ y tendencia cuando $p < 0,1$. Los datos se analizaron con *Software RStudio*. Nuestros resultados indicaron que: a) no hubo diferencias en tasas de clivaje de 2-4c ($p=0.37$); b) hubo una tendencia en incrementar la tasa de clivaje >4c con AAL ($p=0.10$); c) la tasa de B7 fue AAL>Control ($p=0.0027$); d) no hubo diferencias en la tasa de B8 ($p=0.22$); e) la tasa de BT fue AAL>Control ($p=0.01$); f) el NTC fue AAL>Control ($p=0.05$); g) la calidad embrionaria fue AAL>Control ($p=0.001$). Los parámetros de tasa y calidad evaluados en los blastocistos se vieron incrementados con la suplementación con AAL al medio de CIV. El agregado de este antioxidante al medio de cultivo es una nueva herramienta para mejorar la *performance* de la PIV en bovinos.

EFFECTO TOXICOLÓGICO IN VITRO DEL ANTIPARASITARIO AMITRAZ (AMZ) SOBRE EL ESPERMATOZOIDE BOVINO Y SU IMPACTO EN EL DESARROLLO Y CALIDAD EMBRIONARIA

Urrutia Luna, N; Carranza-Martin, A; Campagna, A; Anchordoquy, JP; Anchordoquy, JM; Farnetano, N; Furnus, C; Nikoloff, N; Fabra, M

Instituto de Genética Veterinaria "Ing. Fernando N Dulout", (IGEVET, UNLP - CONICET LA PLATA), Facultad de Ciencias Veterinarias - UNLP.

Estudios realizados en animales y en humanos, han demostrado que la exposición a contaminantes ambientales puede causar cambios patológicos en el aparato reproductor masculino a nivel testicular y en la calidad seminal. El AMZ es una droga insecticida y acaricida de uso veterinario que se emplea para el control de ectoparásitos en abejas, animales de granja y domésticos. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de AMZ en el espermatozoide evaluando su impacto en la capacidad de desarrollo posterior y calidad de embriones bovinos producidos *in vitro*. Para ello, se utilizó un *pool* de semen de 3 toros de probada fertilidad *in vitro* y se dividió en grupo Control y grupo AMZ (25 µg/ml, 2 h de exposición). Los ovocitos fueron obtenidos a partir de ovarios de frigorífico, y se sometieron a las etapas consecutivas de maduración, fertilización (FIV) y cultivo (CIV) *in vitro* en condiciones controladas de laboratorio. Se analizaron tasas de: clivaje de 2 a 4 células (2-4c), de más de 4 células (>4c), de blastocistos de días 7 (B7) y 8 (B8) y blastocistos totales (BT). Luego, se evaluó la tasa de apoptosis de los embriones obtenidos al día 8 de CIV mediante la técnica de TUNEL. Se maduraron un total de 226 ovocitos y se realizaron tres replicas.

El modelo estadístico incluyó un enfoque bayesiano, utilizando una distribución previa normal y no informativa, para calcular los ICB del 95%. Los datos fueron analizados mediante *Software RStudio*. Se identificaron diferencias cuando $P \leq 0.05$ y tendencias cuando $P < 0.1$. Los resultados indicaron: una tendencia a la disminución del clivaje de 2-4c ($P=0.07$) y diferencia de >4 c ($P=0.0009$) en el grupo AMZ respecto al Control. Además, se observó una disminución en la tasa de BT ($P=0.03$), dada por una menor tasa de B7 ($P=0.05$) del grupo AMZ respecto al Control. Se evidenció una tasa de apoptosis mayor con AMZ respecto a Control ($P=0.05$). Por lo expuesto, los medicamentos veterinarios requieren técnicas predictivas para la evaluación de su toxicidad en la reproducción. Nuestros estudios podrían ser indicadores de riesgo para especies no blanco y trabajadores expuestos si la aplicación del producto se realiza inadecuadamente. AMZ es liposoluble y aplicado como baño externo, por lo tanto, gran parte se dispersa en el ambiente y puede atravesar fácilmente piel y mucosas.

EFFECTOS DE LA DIETA RICA EN FRUCTOSA EN HEMBRAS MURINAS DE EDAD REPRODUCTIVA: FALTA DE RESISTENCIA A LA INSULINA Y ALTERACIONES CARDIACAS SISTOLICAS

Palomeque, J¹; Illanes, A¹; Lofeudo, J¹; Castro, C³; Blanco, P²; De Giusti, V¹

¹Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP, CONICET. ²Facultad de Cs. Veterinarias, Servicio de Ecocardiografía, UNLP. ³Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP, CONICET.

PALABRAS CLAVE: resistencia a la insulina, hembras, dieta rica en fructosa.

Previamente hemos visto que ratas y ratones machos, después de una dieta rica en fructosa (FRD), mostraron intolerancia a la glucosa (IGT), resistencia a la insulina (RI) y defectos cardíacos, como hipertrofia, disfunción sistólica y arritmias. En el presente trabajo pretendemos identificar los efectos de la misma dieta en hembras de rata y ratón.

Se utilizaron ratas y ratones Wistar hembra, alimentados con FRD o dieta control (CD) durante 21 días.

Los parámetros morfométricos no mostraron diferencia en peso corporal, grasa abdominal o retroperitoneal (normalizados por peso corporal, CW, o longitud tibial, LT). Sin embargo, el peso del corazón normalizado mostró un aumento significativo en los ratones FRD vs CD ($p: 0.05/PC$ o $0.03/LT$). El análisis bioquímico mostró que las ratas FRD no presentaban RI (índice de glucemia/triglicéridos) ni alteración de la prueba de tolerancia intraperitoneal a la glucosa con respecto a los animales CD. Por ecocardiografía, solo el diámetro del tabique interventricular en diástole y sístole ($p: 0,053$ y $0,053$), y la pared posterior en diástole y sístole ($p: 0,022$ y $0,030$), fueron significativamente diferentes, indicando una hipertrofia cardíaca en animales FRD vs CD. No hubo una diferencia significativa en el acortamiento fraccional, aunque hubo una marcada tendencia a la disminución en la relación E/A, lo que puede indicar una alteración en la relajación ventricular en los ratones FRD vs CD.

La FRD en hembras murinas, al contrario de los machos, no mostró IGT ni RI, aunque podemos observar hipertrofia cardíaca sin disfunción sistólica, indicando, quizás, una protección frente a dietas con exceso de hidratos de carbono, en edad reproductiva con respecto a los machos.

EFFECT OF OPN3 AND MC4R ON KIR7.1 MEDIATED CURRENTS

Pinto, V; Haddad, H; Portales, A; Oancea, E; Raingo, J

Instituto Multidisciplinario Biología Celular (IMBICE, CICPBA - CONICET - UNLP), La Plata, Bs. As., Argentina.

Enkephalin (OPN3) is part of the opsin family of light-sensitive G-protein coupled receptors. OPN3 was discovered in deep brain regions, specifically the arcuate nucleus and the paraventricular nucleus of the hypothalamus, however there have been limited research in the functionality of OPN3.

Oancea lab has discovered that OPN3 functions in a light independent manner and signals through Gai to negatively regulate the melanogenic G α s-coupled MC1R in human epidermal melanocytes.

Neuronal melanocortin receptors (MC3R and MC4R) are found in the arcuate nucleus and paraventricular nucleus of the hypothalamus and play non-redundant roles in mediating energy balance. Both MC3R and MC4R share similar structural identities to MC1R and have been found to couple to G α s. Additionally, Cone and his colleagues found that MC4R couples to *Kir7.1* in hypothalamic neurons independent of G-protein activity. Previous data in our lab has revealed that OPN3 colocalizes and forms a physical complex with MC4R. The goal of this study is to test the hypothesis that OPN3 functions to negatively modulate MC4R-mediated signaling. More specifically, we overexpress OPN3 and MC4R in HEK293 cells together with *Kir7.1* and measured the potassium current at different potentials. We only observed a significant amount of current in cells coexpressing OPN3 and this effect seems to be occluded by MC4R addition. More experiments are required to fully understand the signaling cascade involved and what is the effect of MC4R agonists.

20biotec

EL HONGO ENTOMOPATÓGENO *BEAUVERIA BASSIANA* ENDÓFITO EN SOJA COMO POTENCIAL BIOCONTROLADOR DE LA CHINCHE FITÓFAGA PLAGA *EDESSA MEDITABUNDA*

Huarte-Bonnet, C¹; Espín-Sánchez, D¹; Russo, L²; Scorsetti, AC²; Cingolani, F³; Dulbecco, A¹; Moriconi, D¹; Pedrini, N¹

¹Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata "Profesor Doctor Rodolfo R. Brenner" (INIBIOLP, CONICET-UNLP), La Plata, Argentina. ²Instituto de Botánica Carlos Spegazzini, FCNyM- UNLP, La Plata. ³Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores, CONICET-UNLP, La Plata.

PALABRAS CLAVE: control biológico, RNAseq dual, expresión génica.

La producción de soja es la principal actividad agrícola extensiva en la Región Pampeana (Mir *et al.* 2019). En la Argentina, una de las chinches plaga que más afectan el rendimiento y la calidad de las semillas de soja es *Edessa meditabunda* (Fab.) (Hemiptera: Pentatomidae)¹.

Los hongos entomopatógenos representan una alternativa atractiva para el control de insectos plaga. Pueden comportarse de manera endofítica, estableciéndose en el interior de uno o varios tejidos de las plantas. La ventaja de introducir hongos como endófitos es que podrían controlar insectos que se alimenten de esas plantas, iniciando el ciclo infectivo por vía oral (Mannino *et al.* 2019). El objetivo del presente trabajo fue estudiar el establecimiento de *Beauveria bassiana* endófito en plantas de soja, y evaluar su potencial rol como biocontrolador de chinches plaga de estos cultivos.

Se empleó el hongo entomopatógeno *B. bassiana* cepa ARSEF 2860. Las colonias de *E. meditabunda* se criaron sobre vainas verdes de poroto. Las plantas de soja variedad DM3810 se inocularon por aspersión foliar con una suspensión de conidios. A distintos tiempos post-inoculación se tomaron muestras de hoja, tallo y raíz para determinar la presencia del endófito. Además, se extrajo ARN total de hojas para medir el nivel de expresión de genes fúngicos dentro de este tejido, y secuenciar masivamente (RNAseq dual). Por otro lado, adultos de *E. meditabunda* se colocaron en jaulas con plántulas de soja inoculadas con el hongo, y sin inocular. Se estudiaron diversos aspectos biológicos y poblacionales según Russo (2016) y Vianna (2019). Adicionalmente, se extrajo ARN total de intestinos aislados de adultos de *E. meditabunda* de ambos tratamientos para la secuenciación masiva RNA-seq dual.

Se encontró que *B. bassiana* ARSEF 2860 coloniza hoja, raíz y tallo en distintas proporciones dependientes del tejido, y del tiempo post-inoculación. Se detectó la expresión endófito de genes fúngicos constitutivos como beta-actina, así como genes inducibles como marcadores de estrés oxidativo. Si bien no se observó una mortalidad aumentada en chinches alimentadas con el hongo endófito, se registraron diferencias en la fertilidad de los insectos. Se están realizando los análisis bioinformáticos de los RNA-seq dual para los sistemas hongo-planta y planta-hongo-insecto.

REFERENCIAS: [1] Giorda, Laura M., et al. "El cultivo de la soja en Argentina." (1997). [2] Constanza Mannino, M., et al. "Is the insect cuticle the only entry gate for fungal infection? Insights into alternative modes of action of entomopathogenic fungi." *Journal of Fungi* 5.2 (2019). [3] Productividad y calidad de la soja en la zona núcleo-sojera. Campaña 2018/19. EEA-INTA Marcos Juárez, CR Cba. Consultado el 10/11/2019. [4] Russo, María L., et al. "Endophytic fungi from selected varieties of soybean (*Glycine max* L. Merr.) and corn (*Zea mays* L.) grown in an agricultural area of Argentina." *Revista Argentina de microbiología* 48.2 (2016): 154-160. [5] Vianna, M.F., 2019. Capacidad biocida de hongos entomopatógenos para el control de plagas del tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) en la provincia de Jujuy, Rep. Argentina.

ENFERMEDADES METABÓLICAS Y SUS EFECTOS SOBRE TEJIDO ÓSEO Y SISTEMA VASCULAR: MECANISMOS, PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO

Martini, N; Streckwall, L; Wanionok, N; Gangoiti, MV; Molinuevo, MS; Schurman, L; Sedlisky, C; Cortizo, AM; McCarthy, AD

Laboratorio de Investigación en Osteopatías y Metabolismo Mineral (LIOMM). Facultad de. Cs Exactas, UNLP, La Plata, Bs. As., Argentina.

PALABRAS CLAVE: síndrome metabólico, drogas insulino-sensibilizantes, tejido óseo, calcificaciones vasculares, osteopatías.

En nuestro laboratorio abordamos aspectos de la fisiopatología del esqueleto, asociadas con enfermedades metabólicas de alta prevalencia como la Diabetes mellitus, Síndrome Metabólico (SM) y obesidad. Investigamos las posibles causas de estas osteopatías metabólicas, sus tratamientos con diferentes fármacos (ej. antiresortivos o insulino-sensibilizantes), así como terapia celular usando células progenitoras de médula ósea. Además, estudiamos los efectos de estas patologías sobre el sistema vascular y los posibles efectos sobre sus calcificaciones.

En los últimos años en particular, hemos trabajado con un modelo experimental murino de síndrome metabólico inducido por una dieta rica en fructosa. El síndrome metabólico se caracteriza por ser un desorden heterogéneo y multifactorial que constituye un factor de riesgo relacionado al desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2 y enfermedades cardiovasculares. Existen evidencias que lo asocian con una disminución en la densidad mineral ósea y con el surgimiento de calcificaciones vasculares, generando una mayor incidencia de fracturas osteoporóticas y aumentando el riesgo de sufrir un episodio cardiovascular. En el LIOMM, hacemos una evaluación integral abarcando diferentes aspectos funcionales y elucidando aquellos posibles mecanismos involucrados en cada patología estudiada. Para poder llevar a cabo estos estudios se combinan y complementan las experticias y metodologías existentes en nuestro laboratorio: modelos animales con o sin lesión ósea, modelos celulares utilizando tanto líneas establecidas así como cultivos primarios, biología molecular (PCR, *Western immunoblot*), histología, histomorfometría estática y dinámica, pruebas mecánicas, pQCT. A su vez trabajamos en colaboración con otros grupos de investigación nacionales e internacionales de reconocida trayectoria.

ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DEL PILI TIPO TAD DE *BRADYRHIZOBIUM DIAZOEFFICIENS* USDA 110

Serrangeli, JS; Falduti, O; Colla, D; Brignoli, D; Althabegoiti, MJ; Pérez Giménez, J; Mongiardini, E

Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM) – CCT La Plata CONICET – UNLP.

Bradyrhizobium diazoefficiens es una bacteria del suelo con un estilo de vida dual, pudiendo encontrarse en estado de vida libre, ya sea en forma planctónica o constituyendo un *biofilm*, o estableciendo interacciones simbióticas con su par simbiótico, la planta de soja. Durante esta interacción, la bacteria es capaz de invadir las raíces de la planta dentro de las cuales se diferencia a bacteroide, forma en la cual es capaz de captar el nitrógeno atmosférico y reducirlo a amonio. Esta capacidad ha hecho que estas bacterias sean utilizadas como herramienta biotecnológica para producir inoculantes para el cultivo de soja. En ambos estados, ya sea vida libre o durante su interacción simbiótica, los microorganismos deben interactuar con una superficie, comenzando por su reconocimiento y seguido por un proceso de adhesión, que puede involucrar diversos componentes bacterianos superficiales, como adhesinas, exopolisacáridos (EPS) y lipopolisacáridos (LPS), entre otros. Si bien el proceso de adhesión de *B. diazoefficiens* ha sido estudiado en varios aspectos, se han realizado pocos estudios genéticos para identificar los mecanismos involucrados. Anteriormente, hemos caracterizado un pequeño grupo de genes relacionados con un *pili* tipo *tad* (o *pili* tipo IVc), con funciones relacionadas a adhesión a raíces, pero no en la interacción con superficies abióticas. En ese estudio, otros dos cúmulos de genes fueron identificados mediante herramientas bioinformáticas, pero no fueron caracterizados experimentalmente. Con el objetivo de ampliar el estudio, en este trabajo realizamos una asignación funcional de cada gen presente en estos cúmulos mediante similitud de secuencia con otros *pili* bacterianos conocidos. Así, encontramos que cada cúmulo codifica las funciones necesarias para sintetizar un *pili* completo. Además, identificamos un nuevo cúmulo compuesto por un menor número de genes que podría codificar parcialmente algunas funciones repetidas. También encontramos otros genes aislados en el cromosoma que podrían codificar para pilinas, las subunidades proteicas que forman el filamento del *pili*. Para probar la funcionalidad de estas estructuras, obtuvimos un mutante mediante una delección cromosomal limpia de uno de los cúmulos, que incluye 6 de los 10 genes e iniciamos su caracterización fenotípica. Este mutante muestra una alteración en la formación de *biofilm* que depende del medio de cultivo y de la superficie de adhesión ensayada. Además, su capacidad para moverse nadando en un medio semisólido se vio alterada, en comparación con la cepa salvaje. Más estudios serán necesarios para determinar el rol de este cúmulo de genes en relación con la adhesión a la raíz, así como su comportamiento durante el establecimiento de la simbiosis fijadora de nitrógeno.

EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA DEL FLUAZURÓN EN LA MADURACIÓN NUCLEAR Y CITOPASMÁTICA DE OVOCITOS BOVINOS IN VITRO

Campagna, AA; Fabra, MC; Anchordoquy, JP; Anchordoquy, JM; Farnetano, NA; Nikoloff, N; Furnus, CC

Instituto de Genética Veterinaria "Ing. Fernando N Dulout", (IGEVET, UNLP - CONICET - CONICET LA PLATA), Facultad de Ciencias Veterinarias - UNLP. Calle 60 118, B1904AMA La Plata, Bs. As., Argentina.

La maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos bovinos es un proceso complejo que incluye procesos nucleares y citoplasmáticos que capacitan al ovocito para ser fertilizado. Una maduración exitosa se ve reflejada en la progresión de la meiosis hasta la metafase II con extrusión del primer corpúsculo polar (MII + CP) y una distribución periférica de los gránulos corticales (GC). Se ha estudiado que muchas drogas de uso veterinario afectan los gametos y procesos reproductivos, ocasionando daño genotóxico y citotóxico, sin embargo, son escasas las investigaciones en el área. El fluzarón (FLZ) es uno de los antiparasitarios más usados para controlar la garrapata que afecta el ganado. Se aplica sobre los animales por pulverización, inyección o vertido sobre la espalda; parte es absorbido por el metabolismo del animal, y sólo una pequeña fracción llega a la garrapata. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto toxicológico del FLZ durante la MIV de ovocitos bovinos. Para tal fin, se utilizaron ovocitos bovinos provenientes de ovarios de frigorífico. El medio de MIV fue TCM 199 con 10% de suero fetal bovino, hormonas y antibióticos, el cual fue tratado con 1% DMSO (control) y (50, 75 y 100) µg FLZ/ml. Además, se trabajó con un control positivo (0,10 µg cicloheximida/ml) para verificar la eficacia de las técnicas empleadas. Se maduraron 20 ovocitos por tratamiento durante 24 h a 39 °C con 5% de CO₂ y se realizaron 5 réplicas por punto experimental. Se estudió la maduración nuclear con tinción de Hoechst 33342 analizando la presencia de vesícula germinal (VG), metafase I (MI), MII + CP y ovocitos degenerados (D); y la maduración citoplasmática mediante la evaluación de los GC con tinción de FITC-PNA analizando su distribución como homogénea (H), transición (T), periférica (P) y degenerada (D). Luego del tratamiento, los ovocitos fueron fijados con formaldehído al 4% y analizados con un microscopio de fluorescencia a 20X. Los datos fueron analizados mediante una regresión logística utilizando el *software* GLIMIX (SAS Institute), registrándose diferencias significativas cuando $P < 0,05$. Los resultados demostraron que: 1) FLZ disminuyó la tasa de ovocitos MII+CP ($P < 0,002$) e incrementó los ovocitos D respecto al control ($P < 0,05$) con todas las concentraciones ensayadas; 2) Los ovocitos P disminuyen con 100 µg FLZ/ml respecto al control ($P < 0,05$). Estos primeros ensayos refuerzan la necesidad de seguir evaluando al FLZ como tóxico reproductivo.

EVALUATING MICROGLIA DIVERSITY THROUGHOUT RAT LIFESPAN

**Cervellini, S¹; Dolcetti Franco JC¹; Herrera, ML²; Falomir-Lockhart, E¹;
Bellini, MJ¹**

¹INIBIOLP-CONICET, Facultad de Medicina, UNLP, La Plata, Bs. As., Argentina. ²IFEC-CONICET, Universidad Nacional de Córdoba (UNC), Córdoba, Argentina.

During aging, the central nervous system (CNS) undergoes a variety of morphological and functional changes. We are interested in studying glia in their natural environment and how aging affects their numbers and functions. Although glial cells are critical for CNS development and maintenance, there is little published research addressing their distribution in different brain regions across the lifespan. Most studies involve mice, which limits the extrapolation of data to the rat.

Our aim was to investigate how the number and morphology of microglial cells changes in naïve rats at different ages and whether there is a relationship with behavior. Behavioral tests were performed with female Sprague-Dawley rats at 2, 6, 12, and 24 months of age to examine depression-like behavior, short- and long-term memory, exploratory and anxiety-like behavior. We also analyzed immunoreactive Iba1 cells.

We observed impaired spatial memory and anxiety- and depression-like behavior in 24-month-old rats compared with 6- and 12-month-old rats. As for microglia, there was a significant increase in the number of Iba1+ in the hippocampus and stratum radiatum in 24-month-old rats compared with 6-month-old rats. Morphology data showed a difference between young and old rats.

Our results suggest that the behavior of female rats is age-dependent, as is the distribution and morphology of microglia. Further studies are needed to explore the phenotype and functions of microglial cells.

FABRICACIÓN DE UN NANOCOMPUESTO BASADO EN CELULOSA BACTERIANA COMO SOPORTE DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CARGADAS CON UN EXTRACTO DE PROPÓLEO

Horue, M¹; Ladetto, MF¹²; Gambaro, RC³; Rodenak-Kladniew, B⁴; Cuestas, ML²; Islan, GA¹; Castro, GR⁵⁶

¹Laboratorio de Nanobiomateriales, CINDEFI, Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP-CONICET (CCT La Plata), Calle 47 y 115, B1900AJL La Plata, Argentina. ²Universidad de Buenos Aires. CONICET. Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (IMPaM), Bs. As., Argentina. ³Instituto de Genética Veterinaria (IGEVET, UNLP-CONICET La Plata), Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP, La Plata, Argentina. ⁴Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), CONICET-UNLP, CCT - La Plata, Facultad de Ciencias Médicas, B1900 La Plata, Argentina. ⁵Max Planck Laboratory for Structural Biology, Chemistry and Molecular Biophysics of Rosario (MPLbioR, UNR-MPIbpC). Partner Laboratory of the Max Planck Institute for Biophysical Chemistry (MPIbpC, MPG). Centro de Estudios Interdisciplinarios (CEI). Universidad Nacional de Rosario, Maipú 1065, S2000 Rosario, Santa Fe, Argentina. ⁶Nanomedicine Research Unit (Nanomed), Federal University of ABC (UFABC), Santo André, SP, Brazil.

En el marco del desarrollo de nuevos biomateriales con aplicaciones biomédicas, se pretende diseñar un dispositivo eficaz, capaz de vehiculizar un extracto natural con potentes propiedades farmacológicas. En el presente trabajo, se desarrollaron inicialmente dos tipos de nanopartículas poliméricas (NPs), sintetizadas por el método de nanoprecipitación usando *Poloxamer* 188 como surfactante. Por un lado, se utilizó el polímero aniónico Eudragit S 100 disuelto en etanol absoluto para producir nanopartículas (NPs-S) con un tamaño medio de $187,6 \pm 2,2$ nm (medidas por DLS). Por otro lado, se utilizó el polímero catiónico Eudragit E 100 disuelto en etanol absoluto para producir nanopartículas (NPs-E) de con un tamaño medio de $117,9 \pm 1,6$ nm. Paralelamente, se llevó a cabo la extracción del propóleo desde su material de partida con una solución de etanol al 70 %v/v, bajo agitación por 24 h. Posteriormente se centrifugó el extracto (10%, p/v) y el sobrenadante fue agregado a los polímeros antes mencionados. Así, al realizarse la nanoprecipitación se obtuvieron NPs-S conteniendo propóleo (NPs-S-P) de un tamaño medio de $217,2 \pm 1,6$ nm, y NPs-E conteniendo propóleo (NPs-E-P) de un tamaño medio de $349,2 \pm 3,3$ nm.

Luego, se utilizaron las NPs para la modificación de membranas de celulosa bacteriana (CB). Dichas membranas fueron producidas por la cepa *Komagataeibacter xylinus* (ATCC 23760) a 30°C en placas de 96 pocillos por durante 72 h. Una vez finalizada la incubación las membranas fueron purificadas y lavadas con agua destilada. Las membranas fueron colocadas en las distintas dispersiones de NPs (NPs-S, NPs-E, NPs-S-P y NPs-E-P) y se agitaron durante 24 h a 25°C para incorporarlas en la membrana de CB. Por medio del ensayo de difusión en agar contra diversos microorganismos, se encontró que las membranas que no contenían propóleo (CM-NPs-S y CB-NPs-E) no mostraron actividad contra ninguna cepa mientras que CB-NPs-S-P y CB-NPs-E-P mostraron ser activas contra bacterias Gram positivas (*Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*) y cepas fúngicas (*Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus*). Se realizan ensayos de hemotoxicidad para los nanocompuestos desarrollados y se encontró que todos mostraban un grado de hemólisis menor al 5% luego de 24 y 48 h de exposición, lo cual sugiere ser un material biocompatible y seguro (norma ISO/TR 7406). La biocompatibilidad de las formulaciones fue evaluada en la línea celular derivada de fibroblastos de piel de ratón (L929) mediante el ensayo de MTT (viabilidad celular). Las células (4.0×10^3 células/pocillo) fueron sembradas en placas de 96 pocillos e incubadas por 24 h en condiciones estándar. Posteriormente, fueron tratadas con medios condicionados (extractos) obtenidos a partir de la incubación de las membranas en medio de cultivo (DMEM) según normas ISO 10993-12. Los resultados obtenidos demostraron que tanto CB, como CB-NPs-S y CB-NPs-E no modificaron la viabilidad celular respecto a células control, mientras que las formulaciones CB-NPs-S-P y CB-NPs-E-P (30% de viabilidad con respecto al control).

FORMULACIONES ANTI-MICROBIANAS DE NANO-YERBA MATE: HACIA UN TRATAMIENTO TÓPICO DE LA QUERATITIS BACTERIANA

Higa, L; Guerin Stabile, S; Pérez, N; Pérez, AP; Morilla, MJ; Romero, EL

Centro de Investigación y Desarrollo en Nanomedicinas, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, Roque Sáenz Peña 352, Bernal, Bs. As., Argentina.

PALABRAS CLAVE: queratitis, antimicrobiana, antioxidante, nanopartículas, arqueolípidos.

La queratitis infecciosa es una afección de la superficie ocular constituyendo la quinta causa de ceguera en el mundo. La terapia convencional es con antibióticos de amplio espectro que ingresan en baja concentración y con farmacocinética inadecuada sobre sus blancos microbianos, lo que reduce su actividad generando resistencia.

El objetivo de nuestra propuesta es diseñar agentes antimicrobianos nanoparticulados preparados a partir de o conteniendo extractos de yerba mate (YM). Caracterizaremos estructuralmente tres nanoformulaciones: i) nanopartículas de plata biogénicas (npsAgYM), ii) liposomas (fosfatidilcolina de soja; LipYM) y iii) nanoarqueosomas salvajes (conteniendo lípidos polares, ligando scavenger de receptor clase A en macrófagos; y no polares como el antioxidante Bacterioruberina (BR); nanoArqYM) con actividad anti-microbiana, antiinflamatoria y/o antioxidante.

Las npsAgYM biogénicas obtenidas por síntesis verde presentaron pico de resonancia plasmónica de superficie a 426 ± 9 nm y un tamaño de $5,0 \pm 4,1$ nm. Los LipYM y nanoArqYM se prepararon por el método de hidratación de la película lipídica y sonicación; los tamaños y relaciones YM a lípido resultaron 248 nm-233 nm y 0,6-0,8 mg/mg respectivamente.

Todas las formulaciones al cabo de 24 h, resultaron no citotóxicas sobre células THP-1 diferenciadas a macrófagos y sobre SIRC (línea de epiteliales de córnea de conejo) hasta 200 µg/ml Fosfolípidos por MTT. Las nanoArqYM tuvieron máxima actividad antioxidante por DPPH y ABTS, además de actividad antimicrobiana sobre formas planctónicas y biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 y *Staphylococcus aureus*.

Estos resultados sugieren que la actividad antioxidante de nanoArqYM, combinada con npsAgYM, magnificaría la vida media de estas últimas, extendiendo su actividad antimicrobiana en el tiempo. Dicha combinación podría emplearse como poderoso antioxidante, antiinflamatorio y antimicrobiano tópico, en ausencia de corticoides y antibióticos convencionales.

GENETICALLY ENCODED PH SENSORS TARGETING CELLULAR MICRODOMAINS

Ciarrocchi, S; Gallo, D; Di Mattia, RA; Aiello, EA; Orlowski, A

Centro de Investigaciones Cardiovasculares "Dr. Horacio Cingolani", Facultad de Ciencias Médicas, UNLP-CONICET. La Plata, Argentina.

INTRODUCTION: Intra- and extracellular pH regulation is a key function of all cells and tissues and a prerequisite for normal physiological function. Spatial nonuniformity of intracellular pH is generated due to differential subcellular distribution of Na^+/H^+ exchanger (NHE1) and the $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransporter (NBC).

AIM: To study proton microdomains we generated a proton sensor fluorescent protein (pHluorin2) fused with canonical targeting signals to the endoplasmic reticulum, mitochondrial matrix and junctional cleft of cardiac myocytes (cleft-targeted pH sensor were generated by fusing pHluorin2 to FKBP12.6).

METHODS AND RESULTS: We initially corroborated the localization of the sensor in HEK cells with confocal microscopy. We used the ammonia-prepulse technique to create an intracellular acid load. pH recoveries were obtained from cytosol and endoplasmic reticulum lumen. NHE inhibition by amiloride drastically reduced the pH recovery suggesting the presence of NHE in reticulum (A.U. cito: 0.144 ± 0.004 , $n=24$; cito+amiloride: $0.066 \pm 0.005^*$, $n=23$; ER: 0.098 ± 0.005 , $n=24$; ER+amiloride: $0.011 \pm 0.005^*$, $n=24$; $*p<0.05$). Cytosolic, mitochondrial, and endoplasmic pH decreased during cytosolic Ca^{2+} elevation trigger by histamine (A.U. Cito: -0.70 ± 0.03 , $n=5$; ER: -0.43 ± 0.028 , $n=5$; Mito: -0.63 ± 0.03 , $n=5$). Next, we generated a cardiotropic adeno-associated virus (AAV9) to express the pH sensors into cardiac ventricular myocytes. AAV9-pHluorin2 and AAV9-pHluorin2-FKBP were injected in 3 months rats, after 28 days cardiac myocytes were isolated and pH sensors expression were corroborated by confocal microscopy. pHluorin2-FKBP12.6 express in a striated pattern with intensity maxima spaced $\sim 2 \mu\text{m}$ apart, this strongly supports the conclusion that the FKBP12.6- tagged sensors are targeted to cardiac ryanodine receptor (RyR) at the z-line.

DISCUSSION: Proton dynamics in cardiac cells are poorly understood. Thus, it is important to highlight that herein we generated for the first time a fluorescent pH sensor targeting different cellular microdomains as a tool for proton microdomains studies.

IDENTIFICACIÓN DEL GEN DE TANASA DE *ASPERGILLUS AWAMORI* CECT 2905 PARA SU CLONADO Y EXPRESIÓN EN *PICHIA PASTORIS*

Ortega, MS¹; Degrassi, G²; Catone, MV¹

¹Dto. Bioprocesos-DT Biotecnología-SOAC-GODTel-INTI, ²International Center of Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB), Trieste, Italia.

PALABRAS CLAVE: tanasas recombinante, *Pichia pastoris*, biotecnología industrial, expresión heteróloga.

Las tanasas, o tanino acil hidrolasas, son un tipo de enzima capaz de hidrolizar taninos, el cuarto componente natural más abundante en el planeta. Son enzimas versátiles, con diversas aplicaciones, principalmente en la industria alimentaria y farmacéutica, pero también en la industria del cuero y la alimentación animal [1]. Según lo reportado por la *Asociación de Productores y Formuladores de Productos Enzimáticos* (AMPEF, por sus siglas en inglés), la tanasa es una de las pocas enzimas industriales que no se producen mediante expresión heteróloga [2]. Por lo tanto, el objetivo fue identificar la secuencia codificante para el gen de tanasa perteneciente al hongo *Aspergillus awamori* CECT 2905 para su posterior clonado y expresión en *Pichia pastoris*. A partir de un análisis bioinformática de secuencias depositadas en el Centro Nacional de Información para la Biotecnología (NCBI), la secuencia codificante para el gen de tanasa tendría un tamaño de aproximado de 1,8 kb. Por lo tanto, en una primera etapa se realizó una PCR en gradiente de temperatura con cebadores reportados en bibliografía [3], y utilizando ADN genómico de *Aspergillus awamori* CECT 2905, como molde. Posteriormente, se diseñaron cebadores específicos para las secuencias flanqueantes al gen. Los productos de PCR obtenidos luego fueron purificados, secuenciados y alineados contra la base de datos del NCBI. Como resultado, se obtuvieron tres productos de PCR de tamaños diferentes 1,2 kb, 0,9 kb y 0,8 kb en sucesivos experimentos y finalmente un segmento de 2 kb. A fines de corroborar que el segmento obtenido sea el correspondiente a la secuencia codificante de la tanasa, se realizó una PCR utilizando como molde, el producto de 2 kb y los cebadores correspondientes a la región interna de la secuencia. Los resultados obtenidos confirman que el segmento de 2 kb, correspondería a la secuencia codificante completa del gen de la tanasa de *Aspergillus awamori* CECT 2905. Asimismo, esto permitirá avanzar hacia el clonado en el vector pGEM-t Easy, posterior subclonado en el vector de expresión pPIC9K y transformación de *P. pastoris*.

REFERENCIAS: [1] Aharwar, Amitabh et al. Tannases: Production, properties, applications. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4, 322-334, 2018. [2] Amfep_List_of_Enzymes_update_May_2015. https://amfep.org/_library/_files/Amfep_List_of_Enzymes_update_May_2015.pdf. Accedido 24 de mayo de 2022. [3] Ps, Beena et al. Acidophilic Tannase from Marine *Aspergillus awamori* BTMFW032. *Journal of microbiology and biotechnology*, 20, 1403-14, 2010.

INGREDIENTES ENTOMOLÓGICOS. PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE POLVO DE GRILLO (*GRYLLUS ASSIMILIS*)

Toribio, E^{1,2}; Lenz, D³; Gallardo, G³; Correa, MJ¹; Ferrero, C¹; Arp, CG¹

¹Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos, CIDCA (UNLP-CIC-CONICET). ²Área Bioquímica y Control de Alimentos, Facultad de Ciencias Exactas (UNLP). ³Departamento Desarrollo de Ingredientes, Subgerencia Operativa de Tecnología de Alimentos (INTI).

PALABRAS CLAVE: ingredientes proteicos, entomofagia, polvo de insectos, caracterización nutricional.

El consumo de alimentos basados en insectos (entomofagia) se encuentra en alza a nivel global. Entre los beneficios de esta práctica se destacan la economía, la sustentabilidad y la nutrición. Si bien en Argentina esta actividad aún no ha sido suficientemente explorada y explotada, muchos países presentan ya una larga tradición de consumo de insectos como parte de su dieta ancestral, o la han adoptado como una nueva oportunidad de desarrollo económico dadas las perspectivas mundiales. Actualmente, se encuentran catalogadas miles de especies de insectos aptas para el consumo humano, entre las que resaltan los ortópteros (como los grillos y langostas) por su facilidad de cultivo en cautiverio. Este trabajo aborda la obtención de un ingrediente en polvo a base de grillos de la especie *Gryllus assimilis*, así como su caracterización nutricional.

Los grillos fueron criados en condiciones higiénico-sanitarias según recomendaciones de la EFSA en un establecimiento de cría controlada, y cosechados en su estadio joven-adulto para su procesamiento. La obtención del polvo a partir de especímenes vivos implicó: 1. separación de grillos del sustrato de cría (compuesto por alimento, además de polvillo y desechos derivados), 2. selección de grillos viables (descartando grillos muertos o defectuosos), 3. faena en agua caliente (100°C - 60s) de grillos seleccionados, 4. colado y escurrido, 5. disposición en bandejas, 6. deshidratación en estufa (130°C - 60 min - convección forzada), 7. molienda y cernido de los especímenes deshidratados. El producto en polvo obtenido presentó una actividad acuosa de 0,1259 (24,86°C), considerándose fisicoquímicamente estable y microbiológicamente seguro. El rendimiento en masa del proceso (relación porcentual entre masa de polvo y grillos vivos) fue de $28 \pm 1\%$, perdiéndose mayoritariamente agua (contenido de agua de grillos vivos ~30%). El polvo fue envasado herméticamente y conservado a -18°C durante la realización de las siguientes determinaciones: humedad (secado en estufa a 105°C hasta peso constante), cenizas (carbonización seguida de calcinación a 550°C), materia grasa (método Soxhlet), fibra dietaria total (método AOAC 985.29) y proteínas (método Kjeldahl, factor 6,25). Los hidratos de carbono fueron calculados por diferencia. En base húmeda ($1,3 \pm 0,1\%$ humedad), el contenido de cenizas del polvo fue $4,46 \pm 0,09\%$, el extracto etéreo $24,2 \pm 0,2\%$, el contenido proteico $60,4 \pm 0,8\%$, la fibra dietaria total $8,2 \pm 0,7\%$, y el contenido de carbohidratos $1,5 \pm 1,1\%$. Estos resultados muestran un perfil nutricional sumamente rico en proteínas y lípidos, y muy bajo en carbohidratos, sugiriendo que este nuevo ingrediente sería apto para obtener harinas proteicas y aceites. Sin embargo, aún no existe consenso en los valores de los factores de conversión de nitrógeno a proteína para estos productos debido en parte a que la cutícula del insecto, que constituye la mayor parte de la fibra, está compuesta por quitina (polisacárido nitrogenado) entrecruzada con proteínas de baja biodisponibilidad.

Por lo tanto, los valores presentados son aún provisorios en tanto deben realizarse más investigaciones con el fin de lograr una mayor exactitud en los resultados, y un consenso internacional para estos productos emergentes.

LOMBRICULTURA: UNA BIOTECNOLOGÍA PARA LA SUSTENTABILIDAD. EXPERIENCIA PEDAGÓGICA

Castro, MT

Azul y Blanca, SUTEBA, La Plata.

PALABRAS CLAVE: lombricultura, residuos compostables, lombricompost, multiplicadores sociales, experiencia pedagógica.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO: La lombricultura es una biotecnología que utiliza, a una especie domesticada de lombriz, como una herramienta de trabajo, para reciclar todo tipo de materia orgánica biodegradable. Los productos que se pueden obtener son lombricompost, carne y harina e lombriz y medicamentos. El reciclado de la materia orgánica biodegradable que compone los RSU y residuos agropecuarios, a través del lombricompostaje, constituye una alternativa sustentable para enmienda de suelos degradados. El lombricompost es un biofertilizante-bioregulador, que mejora la textura de los suelos. Esta experiencia (2007-2019 inclusive), tuvo como objetivo que los alumnos de la E.E.S. N° 9 (Olmos) adquieran formación en lombricultura, planteándose como hipótesis que se transformen en multiplicadores sociales.

MATERIALES Y MÉTODOS: Se trabajó con estudiantes del último año del secundario y de 1ro. del Bach. de Adultos. Se siguieron los criterios de Schuldt (2004). En algunos ciclos lectivos, alumnos seleccionados participaron del taller que dicté sobre preparación de muestras biológicas para MEB en la Fac. Cs. Exactas (UNLP), que se observaron y fotografiaron en el CINDECA.

EXPERIENCIA: CHARLAS Y VISITA A COMPOSTERAS. INSTALACIÓN, MANEJO Y COSECHA DE UNA UNIDAD DEMOSTRATIVA DE LOMBRICOMPOSTAJE: Se eligió como modelo de compostera un cajón de verdura que fue revestido internamente con bolsas plastilleras. Se usaron restos vegetales, cáscaras de huevo, papel y cartón sin tinta y en contadas ocasiones estiércol. Fue humedecido y cubierto. Luego se procedió a la siembra del lecho con "lombrices rojas californianas", *Eisenia foetida*.

ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO Y BIOLÓGICO DE MUESTRAS EN PROCESO DE COMPOSTAJE Y DEL LOMBRICOMPOST TRANSFERENCIA EDUCATIVA: un pequeño grupo de alumnas del último año, dieron clase en el J.I. N° 927. Diseñaron el plan de clase con objetivos, contenidos, actividades de inicio, desarrollo y cierre.

CONCLUSIONES: Haber instalado una unidad demostrativa de lombricompostaje. Experiencia adquirida por el grupo para ser multiplicadores sociales. Es urgente, profundizar la gestión de residuos de manera sustentable. La Ley de E.A.I. y el Pgm. Prov. de Compostaje, como políticas públicas, deben potenciar estas experiencias en los distintos ámbitos.

REFERENCIAS: Schuldt, M. 2004 Lombricultura fácil. Work Graf.

LOS CAMBIOS EN [GLUCOSA] INDUCE EVENTOS ARRITMOGÉNICOS EN MIOCITOS AISLADOS Y CORAZONES ENTEROS DE ANIMALES SANOS: ROL SGLT1

Illanes, A; Federico, M; Nuozzi, G; Lopez, S; Villa Abrille, C; Said, M; Palomeque, J

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP, CONICET

PALABRAS CLAVE: hiperglicemia, SGLT, arritmias.

Los cambios en la [glucosa] (Δ GE) alteran el manejo del Ca^{2+} , induciendo eventos arritmogénicos (EA) dependientes de Ca^{2+} -Calmodulina quinasa II (CaMKII), que activa el intercambiador Na^{+} - Ca^{2+} (NCX) en modo directo. La entrada de Na^{+} , generaría latidos ectópicos y este fenómeno estaría favorecido por la participación del cotransportador Na^{+} /glucosa 1 (SGLT1), que es la única isoforma en el corazón. En este contexto, los EA inducidos por Δ GE no ha sido estudiada, y este es nuestro objetivo del siguiente proyecto. Utilizamos miocitos aislados cargados con Fura-2-AM, a los que medimos Ca^{2+} por epifluorescencia (transitorio de Ca^{2+} intracelular, Ca_iT), y utilizamos corazón perfundido con la técnica de Langendorff donde medimos presión desarrollada. Usamos un inhibidor de SGLT, phlorozin 10 μM .

El Δ GE de 5,5 mM (glucosa baja, BG) a 11 mM (Glucosa normal, GN) y de GN a 25 mM (glucosa alta, AG), indujo mayormente alteraciones en el manejo del Ca^{2+} , como un aumento o una disminución del Ca_iT . Independientemente de los efectos sobre Ca_iT tras el Δ GE, observamos EA en un 100% de LG-GN y un 78% de GN-AG. En corazones enteros aislados, observamos el mismo patrón de EA que observamos en miocitos aislados con el Δ GE. Cuando usamos phlorozin, la aparición de EA se prolongó significativamente en ambas preparaciones.

En conclusión, el Δ GE agudo induciría EA dependiente de la actividad de SGLT1.

NANOVESÍCULAS CON CURCUMINA PARA TERAPIA FOTODINÁMICA ANTITUMORAL

Altube, MJ; Caputo, E; Morilla, MJ; Romero, EL

Centro de Investigación y Desarrollo en Nanomedicinas, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, Bs. As., Argentina.

PALABRAS CLAVE: curcumina, agentes fotosensibilizadores, cáncer pulmonar.

El cáncer de pulmón es una de las principales causas de muerte en Argentina. Uno de los tratamientos que se utiliza para tratar esta enfermedad es la terapia fotodinámica (TFD), que consiste en la activación de agentes fotosensibilizadores que generan especies reactivas de oxígeno (ERO) al ser irradiados con luz. La curcumina (Cur) es un polifenol hidrofóbico que tiene capacidad fotosensibilizante. Sin embargo, su uso terapéutico se ve limitado por su pobre biodisponibilidad. Previamente y con el objetivo de desarrollar una terapia inhalatoria de Cur se han diseñado nanovesículas con Cur utilizando arqueolípidos, denominadas nATC, resistentes a la nebulización y almacenamiento [1].

En este trabajo se busca analizar la capacidad de nATC de actuar como agente fotosensibilizador en la realización de una terapia fotodinámica antitumoral y comparar su efecto con liposomas convencionales con Cur (nLTC) y con Cur libre. Para llevar a cabo los ensayos, las células de adenocarcinoma pulmonar humano (línea celular A549) se incubaron con las formulaciones nATC, nLTC y Cur libre durante una hora y luego se irradiaron en un dispositivo con luces LED de 420 nm a diferentes fluencias. Mediante el ensayo de MTT y la determinación de la liberación de LDH se pudo observar que las muestras con Cur sólo ocasionan daño en las células luego de ser irradiadas. El ensayo de MTT arrojó que el IC50 de nATC era inferior al de nLTC y la Cur libre. La capacidad de las muestras de inhibir la migración celular se determinó mediante el ensayo de cierre de herida. nATC y Cur libre lograron inhibir el cierre de la herida durante 4 días, por su parte nLTC no mostró diferencias respecto del control sin tratar. Se determinó la actividad de las metaloproteinasas de matriz (MMP) liberadas por las células tratadas mediante zimografía y la utilización del péptido FS-6. Ambos resultados mostraron que, a diferencia de nLTC, nATC ocasiona una inhibición en la actividad de las MMP, independiente de la irradiación. La inhibición de la migración y la liberación de MMP son un indicativo de que nATC podría limitar la metástasis de las células tumorales. Buscando determinar el perfil de activación de los macrófagos asociados a tumores se realizó un ensayo donde se incubaron células THP-1, diferenciadas en macrófagos, con los medios condicionados de las células A549 tratadas con las distintas muestras. nATC y nLTC causaron una disminución de la aparición de células CD204+, marcador de macrófagos en perfil M2 protumoral, a su vez nATC también incrementó la liberación de IL-6 e IL-8 por parte de los macrófagos. Estos resultados sugieren una mayor aparición de macrófagos activados en perfil M1, antitumoral. Por los resultados expuestos se puede señalar que nATC muestra mejores características que nLTC y Cur libre para la realización de una terapia fotodinámica antitumoral.

REFERENCIAS: [1] Altube M.J., Caimi L.I., Huck-Iriart C., Morilla M.J. y Romero E.L. *Pharmaceutics* 13 (2021) 1033.

OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, ANTIHIPERTENSIVA Y ANTITROMBÓTICA MEDIANTE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE EXPELLER DE CHÍA

Ozón, B¹; Geier, F¹; Vera González, SM¹; Parisi, MG²; Obregón, WD¹; Cotabarren, J¹

¹Centro de Investigación de Proteínas Vegetales (CIProVe), Departamento de Ciencias Biológicas, FCEX – UNLP.

²Laboratorio de Química Biológica, Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Luján, Luján, Bs. As., Argentina.

PALABRAS CLAVE: expeller, *Salvia hispanica* L., péptidos bioactivos, péptidos antioxidantes, péptidos antitrombóticos.

INTRODUCCIÓN: Actualmente existe mucha preocupación en el sector agroalimentario por los problemas medioambientales causados por la eliminación de residuos y subproductos. Las industrias aceiteras, en particular la de chía, producen aproximadamente 650 kg de *expeller* de chía/tonelada. Por ello, se están desarrollando estrategias para reducir los desperdicios del sistema alimentario.

MATERIALES Y MÉTODOS: Se realizó una hidrólisis enzimática secuencial con Alcalasa (A) y Flavourzima (F), se evidenciaron los resultados determinando el grado de hidrólisis (GH) y electroforesis (SDS-PAGE). Se evaluaron actividades biológicas de los péptidos presentes en H-A90F90: actividad antioxidante mediante ABTS y DPPH, actividad antihipertensiva mediante actividad inhibitoria de la enzima convertidora de Angiotensina (ECA) y actividad antitrombótica mediante las vías intrínseca y extrínseca de coagulación.

RESULTADOS: El mayor GH obtenido con A-F (57.63 %) se observó durante 90 min con A seguidos por 90 min de F (H-A90F90). Mediante SDS-PAGE observamos que las proteínas mayores a 20 kDa fueron completamente digeridas para H-A90F90, sin evidenciar grandes modificaciones en las proteínas menores a 20 kDa. Se evaluó la actividad antioxidante para H-A90F90 encontrando una IC₅₀ de 56.23 µg/ml y 89.12 µg/ml para ABTS y DPPH respectivamente. Se encontró un 45% de actividad anti-ECA al ensayar 35 µg/ml de hidrolizado, superando el 25% observado para MSH. En cuanto a la actividad antitrombótica, 500 µg/ml de control produjeron un retraso en el tiempo de coagulación en la vía intrínseca de 33.2 s a 58.1 s, mientras que la misma concentración de H-A90F90 produjo un tiempo de coagulación de 101.7 s. Sobre la vía extrínseca se requirieron 800 µg/ml de H-A90F90 para producir un aumento de 3 veces en el tiempo de coagulación (de 16.5 s a 47.5 s), mientras que 1500 µg/ml del control produjeron el mismo efecto.

CONCLUSIONES: Los resultados demostraron una capacidad antioxidante mayor en el H-A90F90 respecto a la MSH. Se observó un 20% de actividad anti-ECA mayor para el H-A90F90 respecto a las MSH. En cuanto a la actividad antitrombótica, H-A90F90 mostró un incremento en los tiempos de coagulación para ambas vías. Éste trabajo representa el primer reporte de la actividad anti-ECA y antitrombótica producida por hidrolizados de *expeller* de chía.

PARTICIPACIÓN DE APOLIPOPROTEÍNA A-I EN EL PERFIL ANTI-INFLAMATORIO EN MACRÓFAGOS THP1

Roa, C¹²; Gonzalez, MC¹

¹Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata "Profesor Doctor Rodolfo R. Brenner" (INIBIOLP), Facultad de Ciencias Médicas, UNLP. ²Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, La Plata, Bs. As., Argentina.

En este proyecto de tesina, trabajaremos sobre la hipótesis del rol protector que ejerce apolipoproteína A-I (apoA-I), la proteína mayoritaria de las HDL, al remover lípidos celulares y posibilitar el cambio hacia un fenotipo anti-inflamatorio en macrófagos.

Los desórdenes en el metabolismo de lipoproteínas constituyen una de las principales causas de enfermedad cardiovascular prematura, siendo la deficiencia de colesterol en HDL, así como los niveles elevados de colesterol en LDL, las anormalidades más frecuentes.

La aterogénesis involucra la unión de lipoproteínas plasmáticas, principalmente LDLs oxidadas, en la pared arterial, lo que induce el reclutamiento de macrófagos, que fagocitan progresivamente las LDLox, adoptando el fenotipo espumoso; éstos se acumulan en el endotelio formando la placa ateromatosa inicial y promueven la respuesta inflamatoria.

El fenotipo de macrófagos M1 es el tipo pro-inflamatorio; mientras que el fenotipo M2 está involucrado en la resolución de la inflamación. Sin embargo, no hay datos referentes sobre la caracterización fenotípica del estado inflamatorio (M1/M2) como consecuencia de las respuestas que podría causar una proteína típica antiaterogénica como es apoA-I.

Así proponemos:

Purificar apoA-I WT recombinante expresada en bacterias BL21(DE3).

Obtener LDLs de plasma humano por ultracentrifugación en gradiente de densidad de NaBr y posterior cromatografía de exclusión molecular en columna de Sephacryl 300.

Obtener LDL oxidadas por tratamiento con sulfato de cobre.

Evaluar la polarización hacia un perfil pro/anti inflamatorio en macrófagos en presencia de LDLox y/o de apoA-I WT, mediante citometría de flujo; empleando anticuerpos anti- CD86 para M1 y anti-CD206 para M2, marcados con fluoróforos (AF488 y PE). Para lo cual, monocitos humanos de la línea THP1 serán diferenciados a macrófagos con ésteres de forbol, posteriormente transformados en células espumosas por incubación con LDLox, y finalmente tratados con apoA-I WT.

Es probable que la exposición de macrófagos a LDLox determine la aparición del fenotipo M1, y en presencia de apoA-I, del fenotipo M2, lo cual aportará información para caracterizar a los distintos subtipos celulares.

PIGMENTOS FÚNGICOS DE METARHIZIUM ROBERTSII: MELANINAS TIPO DHN Y SU ROL EN LA FORMACIÓN DE MICROESCLEROCIOS

Huarte-Bonnet, C¹; Mazzolenis, R¹; Santana, M¹; Saparrat, M²; Pedrini, N¹

¹Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata "Profesor Doctor Rodolfo R. Brenner" (INIBIOLP, CONICET-UNLP), La Plata, Argentina. ²Instituto de Fisiología Vegetal, INFIVE.

PALABRAS CLAVE: hongos entomopatógenos, inhibidores.

Los hongos entomopatógenos resultan atractivos para el control de insectos plaga en la agricultura por no dejar residuos nocivos para el hombre y el medio ambiente y no generar fenómenos de resistencia en los insectos (Lacey et al., 2015). Los microesclerocios (ME) son propágulos fúngicos tolerantes a la desecación formados por agregados de hifas melanizadas de 200-600 µm de diámetro (Jackson y Jaronski, 2012). Actualmente no se conoce la identidad ni el rol de las melaninas en ME de hongos entomopatógenos. El agregado en concentraciones subletales de inhibidores de la síntesis de melaninas en los medios de cultivo es una técnica ampliamente utilizada en la caracterización de estos pigmentos, y los resultados derivados de ese tipo de experimentos suelen ser suficientes para determinar la presencia y el tipo de melanina en las células estudiadas (Butler y Day, 1998).

Se cultivó el hongo entomopatógeno *Metarhizium robertsii* cepa ARSEF 2575 en medios líquidos en presencia y ausencia de triclazole (inhibidor de melaninas tipo DHN) a distintas concentraciones. Se analizaron distintos parámetros del cultivo como pH, biomasa seca, concentración y tamaño de propágulos producidos, concentración de pigmentos, tolerancia al secado y a la temperatura, de acuerdo a Saparrat et al. (2009), Huarte-Bonnet et. al (2019), Babitskaya et al. (2000), y Paixao et. al (2021).

Se halló que el triclazole en concentraciones mayores o iguales a 600 ppm inhibe el crecimiento de *M. robertsii* ARSEF 2575 en cultivos líquidos. Concentraciones subletales (250 a 400 ppm) impiden la diferenciación de conidios a ME, produciendo otros propágulos de forma esférica y de tamaño significativamente más pequeño. Si bien no se observan cambios en la biomasa seca ni concentración de propágulos para cultivos con 250 a 350 ppm, se registraron disminuciones de pH al final del cultivo respecto de cultivos control. Adicionalmente, se cuantificaron pigmentos totales y se estudió la capacidad de estos nuevos propágulos para tolerar la desecación y la temperatura. Estos resultados muestran que la vía de síntesis de melaninas tipo DHN está involucrada a la diferenciación a ME, y se propone a futuro hacer análisis químicos y moleculares para caracterizar sobre estas melaninas y evaluar su rol en la diferenciación y tolerancia a estrés ambiental de los ME de *M. robertsii*.

REFERENCIAS: [1] Babitskaya, V. G., et al. "Melanin pigments from the fungi *Paecilomyces variotii* and *Aspergillus carbonarius*." *Applied Biochemistry and Microbiology* 36 (2000): 128-133. [2] Butler MJ, Day a W, 1998. Fungal melanins: a review. *Canadian Journal of Microbiology* 44: 1115-1136. [3] Huarte-Bonnet, Carla, et al. "The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* produces microsclerotia-like pellets mediated by oxidative stress and peroxisome biogenesis." *Environmental microbiology reports* 11.4 (2019): 518-524. [4] Jackson MA, Jaronski ST, 2012. Development of pilot-scale fermentation and stabilisation processes for the production of microsclerotia of the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum* strain F52. *Biocontrol Science and Technology* 22: 915-930. [5] Mannino, M. Constanza, et al. "Is the insect cuticle the only entry gate for fungal infection? Insights into alternative modes of action of entomopathogenic fungi." *Journal of Fungi* 5.2 (2019): 33. [6] Paixão, Flávia RS, et al. "Tolerance to abiotic factors of microsclerotia and mycelial pellets from *Metarhizium robertsii*, and molecular and ultrastructural changes during microsclerotial differentiation." *Frontiers in Fungal Biology* 2 (2021): 654737. [7] Saparrat Mario CN, et al. "Pseudocercospora griseola causing angular leaf spot on *Phaseolus vulgaris* produces 1, 8-dihydroxynaphthalene-melanin." *Mycopathologia* 168 (2009): 41-47.

PLASMA THERAPY TO REVERSE AGE-RELATED DECLINE

Pasquini, DC; Canatelli Mallat, MC; Chiavellini, P; Gallardo, MD; Sosa, Y; Morel, G; Goya, R

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata "Profesor Doctor Rodolfo R. Brenner" (INIBIOLP), Facultad de Ciencias Médicas, UNLP, La Plata, Argentina.

There is extensive evidence that young blood and plasma possess revitalizing properties in old animals of the same species. In parabiosis experiments, where the circulatory systems of two animals of different ages are joined, a phenotypic change from old animals to the phenotype of a young animal, and vice versa, has been observed. Later works managed to elucidate that the factors responsible for these changes were in the plasmatic fraction of the blood.

In our work, inspired by parabiosis experiments, plasma extracted from the blood of young rats was injected into elderly rats, achieving appreciable phenotypic improvements compared to control animals. In this work, we report that repeated injections of young rat plasma to females, initially 25 months old, prolongs the half-life of the animals by almost 2.5 months (about 10 % of their natural lifespan).

Treated rats maintained a more youthful appearance than untreated controls. Blood methylation analysis revealed that treated rats remained epigenetically younger than controls.

20biotec

PRIMEROS APORTES EN LA DETECCIÓN DE WOLBACHIA EN INSECTOS VECTORES DE LENGUA AZUL

Leguizamón, AA; Ayala, MM

Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE) CONICET - UNLP, Boulevard 120 S/N, La Plata, Bs. As., Argentina.

PALABRAS CLAVE: detección, *Wolbachia*, PCR, *Culicoides insignis*.

INTRODUCCIÓN: El género *Wolbachia*, bacterias Gram-negativas intracelulares obligadas, infecta a artrópodos y nemátodos. Su amplia distribución, así como la capacidad de manipular la reproducción de sus hospedadores las convierten en una buena candidata como potencial herramienta de control biológico. *Culicoides Latreille* es el género más diverso de la familia Ceratopogonidae e incluye especies que actúan como vectores de protozoos, nemátodos y virus. El virus de la Lengua Azul es una enfermedad que ataca al ganado silvestre y de cría causando pérdidas económicas importantes, cuyo principal vector es *Culicoides insignis* Lutz.

OBJETIVO: Detectar la presencia de *Wolbachia* en *C. insignis* mediante la técnica de PCR.

MATERIALES Y MÉTODOS: se trabajó con *pooles* de *C. insignis* colectados en la provincia de Misiones. La extracción de ADN se realizó con la técnica de la resina Chelex y la amplificación del gen *wsp* (*Wolbachia surface protein*) fue mediante cebadores específicos utilizando como molde los alelos *coxA* y *fbpA*. La PCR se optimizó en un volumen final de 12,5 µl, y las condiciones fueron las siguientes: una incubación inicial de 2 minutos a 94°C, seguido de 37 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 56°C, y 72°C por 1 minuto para el caso de la amplificación del gen *coxA*, y 1 minuto 30 segundos para el caso del gen *fbpA*; en ambos casos se realizó una extensión final a 72°C por 5 minutos. Los amplicones fueron evidenciados en un gel de agarosa 1.0% teñido con Bromuro de Etidio.

RESULTADOS: No se detectó presencia de *Wolbachia* en los ejemplares de *C. insignis* analizados, lo cual es congruente con el análisis realizado en bases de datos existentes para *Wolbachia*.

CONCLUSIÓN: Recomendamos seguir estudiando la presencia de éstas bacterias en *Culicoides* y considerarlos como un posible método de control de vectores.

REGULACIÓN DE CARGA EN PROTEÍNAS: EL ROL DEL EQUILIBRIO DE PROTONACIÓN

Cathcarth, M; Picco, AS; Longo, GS

Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), UNLP-CONICET.

PALABRAS CLAVE: Punto isoeléctrico de proteínas, equilibrio de protonación, regulación de carga, teoría molecular.

INTRODUCCIÓN: La estructura, estabilidad, solubilidad y función de las proteínas dependen de su carga neta, la cual está determinada por el estado de ionización de los residuos individuales. Alrededor del 25% de los residuos de las proteínas contienen cadenas laterales ionizables que son de gran importancia para el mecanismo de acción de las enzimas y para la unión de las proteínas a otras moléculas pequeñas y grandes.¹

La carga neta de la proteína no solo depende del pH sino también de las moléculas vecinas, el potencial electrostático de una superficie cercana perturba los residuos titulables. Cuando las proteínas se acercan a superficies cargadas los protones migran hacia y desde sitios ionizables cambiando su estado de protonación de manera de disminuir la energía libre, como consecuencia, la distribución de carga cambia.

MÉTODOS: Desarrollamos una teoría termodinámica molecular para estudiar la interacción de proteínas con superficies planas cargadas, modelamos una superficie de carga fija negativa y dos superficies que regulan carga con diferente densidad superficial de grupos OH. Las proteínas se describen utilizando un modelo de grano grueso basado en su estructura cristalográfica tridimensional y el pKa experimental promedio de los residuos de aminoácidos.²

RESULTADOS: Primero calculamos el número de carga de las proteínas en una solución bulk diluida, el cual solo es función del pH. El punto isoeléctrico (pI) es el pH al cuál la proteína tiene carga neutra, los valores de pI calculados para citocromo c, GFP, lisozima y mioglobina son 9.6, 6.2, 10.9 y 7.1, respectivamente; están de acuerdo con los valores experimentales. Este modelo calcula el estado de carga, tanto de la superficie como de la proteína, de manera autoconsistente en función a las condiciones locales del medio. La carga de la proteína aumenta cerca de la superficie debido a los cambios de pH local. Para GFP en una solución 10 mM de NaCl a pH 7, cerca de la superficie de carga fija ($-1e/nm^2$) la proteína gana 7.5 protones, y cerca de las superficies que regulan carga (pKOH= 6.5) gana 5 protones para la de 1 OH/nm² y 6 para la de 4.6 OH/nm². Sobre esta última superficie evaluamos el efecto del pH, cerca de la superficie la proteína gana aproximadamente 3, 4 y 6 protones a pH 6, 6.5 y 7 respectivamente. También evaluamos el efecto de la concentración de sal a pH 7, la proteína gana aproximadamente 9, 6 y 2 protones a 1, 10 y 100 mM respectivamente. En mezclas binarias a 1 mM de NaCl, la presencia de citocromo c o lisozima modifica la carga de GFP cerca de la superficie, en cambio, la presencia de mioglobina no la afecta en gran medida.

CONCLUSIONES: Nuestros resultados muestran que el equilibrio de protonación juega un rol crítico en las interacciones de las proteínas con este tipo de superficies.

REFERENCIAS: [1] Grimsley, G. R., et al. Protein Science 2009, 18(1), 247-251. [2] Cathcarth, M., et al Journal of Physics: Condensed Matter 2022, 34, 364001.

ROL DE LA SÍNTESIS DE LACTATO EN LA DEFENSA AL ESTRÉS ÁCIDO DE SINORHIZOBIMUM MELILOTI

Molfesa Kaczoruk, CU; Melamed, A; Draghi, W

Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM). Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

INTRODUCCIÓN: En el marco de una agricultura sustentable la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) en los cultivos de leguminosas es un factor importante para mantener la sustentabilidad de los agrosistemas. En el caso particular de alfalfa es ampliamente reconocido que la condición ácida de muchos suelos limita la asociación con su simbiote fijador de nitrógeno *Sinorhizobium meliloti* (*Sme*). Estudios realizados en el laboratorio han permitido observar que *Sme* desarrolla una respuesta de adaptación a la acidez (respuesta ATR(+)). Los cultivos que presentan dicho fenotipo muestran una respuesta mejorada al estrés ácido y, principalmente, un mejor comportamiento en simbiosis con la planta, lo que los convierte en un blanco de estudio para la generación de biofertilizantes mejorados en condiciones de bajo pH. A través del uso de herramientas ómicas se observó un aumento en la síntesis de ácido láctico en cultivos con fenotipo ATR, por lo que el presente plan pretende dilucidar el rol de este metabolito en la generación de los cultivos ATR.

MATERIALES Y MÉTODOS: A través la técnica de *Gene splicing by Overlapping PCR* (SOEing) se generaron deleciones en los tres genes implicados en la síntesis de L-lactato en *Sme* 2011 (SMc01740 o *lldD1*, SMc01712 o *lldD2*, y SMb20850 o *lldD3*). Dichas construcciones se clonaron sobre el vector pG18. Una vez generados los mismos se subclonaron dichas construcciones en el vector pK18mobSac, el cual facilita la selección de los doble recombinantes. Dichas cepas mutantes serán evaluadas en condiciones de acidez letal, y se determinará el D10 a través de recuentos bacterianos durante 8 hs *post shock* ácido.

RESULTADOS PARCIALES: Al momento se han obtenido dos de las tres cepas de *Sme* mutantes por interrupción del alelo (*lldD2* y *lldD3*), restando confirmar la interrupción del gen *lldD1*. Una vez obtenidos los mismos se procederá a realizar ensayos de muerte a pH ácido (pH 4.0) y la variación en la tasa de muerte de cada uno de las cepas alteradas en la síntesis de lactato. De esta manera se pretende dilucidar si existe un rol preponderante de dicho metabolito en la respuesta de tolerancia a la acidez de *Sme*.

ROL DEL ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO Y DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN LA DISFUNCIÓN DE LAS CÉLULAS β PANCREÁTICAS INDUCIDA POR DIETA RICA EN FRUCTOSA

Farromeque Vásquez, SC; Román, CL; Flores, LE; Maiztegui, B

Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (CENEXA, UNLP-CONICET-CeAs CICPBA), Facultad de Ciencias Médicas, UNLP.

PALABRAS CLAVE: prediabetes, disfunción pancreática, estrés del retículo endoplasmático.

La administración de una dieta rica en fructosa (DRF) a ratas normales induce cambios endocrino-metabólicos similares a los de la prediabetes (PD) humana, donde el estrés del retículo endoplasmático (RE) tendría un rol crucial. Nuestro objetivo fue estudiar el rol del estrés del RE y de la respuesta inflamatoria en la disfunción de las células β pancreáticas inducida por DRF. Para ello, ratas macho normales se alimentaron 21 días con una dieta comercial estándar y agua corriente (C), o con el mismo alimento y una solución acuosa de fructosa al 10% p/v (DRF). Al sacrificio se midieron los niveles séricos de glucosa, triglicéridos (TG), col-total, col-HDL y se calculó el índice de insulinoresistencia (IR) dado por la relación TG/col-HDL. Se extrajo el páncreas y se aislaron los islotes para medir secreción de insulina estimulada por glucosa (SIEG) y los niveles de expresión génica (qPCR) de marcadores de estrés del RE, autofagia, inflamación y apoptosis. Las ratas DRF aumentaron significativamente los niveles de TG, col-HDL y el índice IR, y no tuvieron cambios en col-total y col-HDL. En ellas también aumentó la SIEG (con glucosa 16,7 mM) y los niveles de ARNm de los marcadores de estrés del RE (CHOP, ATF4 y XBP1s), autofagia (HSc70), apoptosis (Casp-3, Casp-12, Bcl-2 y Bad) e inflamación (TNF- α , IL-1 β y PAI-1); $p < 0,05$. En conclusión, la DRF induce dislipemia, IR, sobrecarga funcional de las células β , estrés del RE, apoptosis y la respuesta inflamatoria, contribuyendo a promover la disfunción y disminución de la masa de células β . Una alternativa prometedora para desarrollar nuevas herramientas terapéuticas de prevención y tratamiento de la DT2 podría ser la atenuación del estrés del RE a través de chaperonas químicas.

SEPARACIÓN INMUNOMAGNÉTICA Y DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA DE BACTERIAS

Emilio, I; Longinotti, G; Ybarra, G

Nanomateriales Funcionales, Micro y Nanotecnologías – Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI)

Actualmente existen distintos métodos para la detección de bacterias patógenas en agua de consumo. Los procedimientos convencionales para detección de bacterias requieren mucho tiempo y son costosos, necesitan equipos especializados, usuarios capacitados, y, en su mayoría, el enriquecimiento previo de la cepa a detectar. En este trabajo, se propone el desarrollo de biosensores para la detección de bacterias en estas aguas basados en la combinación de magnetoseparación para la preconcentración de los microorganismos (mediante del uso de partículas magnéticas conjugadas con anticuerpos) seguido de detección mediante técnicas electroquímicas.

Se requirió una etapa inicial de síntesis de estas partículas magnéticas, la cual fue realizada mediante el método de sol-gel, obteniendo partículas con un tamaño promedio de 700 nm de diámetro, las cuales fueron recubiertas con un *shell* de sílice para su posterior funcionalización con grupos carboxílicos. Estos grupos funcionales fueron de utilidad para la inmovilización de un anticuerpo específico contra la bacteria diana (*E. coli*, cepa ATCC 25922), empleando el método de la carbodiimida. Una vez conjugado, nuestro sistema partícula-anticuerpo fue utilizado para la captura de bacterias, incubando estas partículas con una suspensión de bacterias, seguidas de lavados sucesivos utilizando imanes permanentes. Luego, se realizó una segunda incubación utilizando anticuerpos secundarios conjugados con la enzima peroxidasa de rábano picante. Finalmente, después de otra etapa de lavado, las partículas fueron concentradas en la superficie de un electrodo serigrafiado, donde se determinó la actividad enzimática, relacionada con el contenido de bacterias, mediante la técnica cronoamperométrica.

Las partículas sintetizadas, la inmovilización del anticuerpo y el ensayo con el segundo anticuerpo con la enzima HRP conjugada han dado resultados positivos al momento de capturar y detectar bacterias en cultivos *in vitro* de *E. coli*, con señales cercanas a $100 \mu\text{A cm}^{-2}$, comparándola con la señal $20 \mu\text{A cm}^{-2}$ que arrojó el ensayo en ausencia de bacterias. En perspectiva, se procederá mejorar la señal generada por el sistema a fin de tener una sensibilidad mucho mayor y así poder detectar bacterias en concentraciones menores.

REFERENCIAS: [1] Referencia 11. Mostafaie, M. (2017). Protein Expression and Purification. 145. [2] Wang, Z (2020). Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.

SEPARACIÓN POBLACIONAL DE NANOPARTÍCULAS DE ORO MEDIANTE LA GENERACIÓN DE FUERZAS DE DEPLECIÓN PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS

Boggan Simal, G; Borzi MA; Otero, C; Prieto, ED; Huergo, MA; Vericat, C

Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), UNLP-CONICET, La Plata, Argentina.

PALABRAS CLAVE: nanopartículas de oro, nanomedicina, separación poblacional.

INTRODUCCIÓN: Dentro de las nanopartículas de oro (AuNPs), los nanotriángulos de oro (AuNTs) con absorbancia en el infrarrojo cercano (IRC) son de gran interés para aplicaciones biomédicas, tanto para diagnóstico como para tratamiento gracias a sus propiedades ópticas singulares.

Es común que las síntesis de AuNTs den lugar a más de una población de formas y/o tamaños diferentes, como por ejemplo, una población extra de AuNPs esféricas, generalmente indeseada. Recientemente se han propuesto métodos de separación basados en la generación de fuerzas de depleción empleando surfactantes. En este trabajo hemos puesto a punto el método usando un surfactante aniónico no tóxico ampliamente usado en la industria farmacéutica, el dodecilsulfato de sodio. El método se ha ensayado para el caso de AuNTs recubiertos con especies de azufre (S) reducido, o bien modificados superficialmente con ácido mercaptoundecanoico y ácido tióctico.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES: Los AuNTs se sintetizaron por reducción de HAuCl_4 con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Esta síntesis produce AuNTs y una población importante de AuNPs esféricas (pequeñas y grandes). Primero se procede con una centrifugación, lo que permite decantar los AuNTs y las AuNPs esféricas grandes y eliminar las AuNPs esféricas pequeñas. Luego, los precipitados se resuspendieron en soluciones de SDS (0.1 - 0.5 M) y a las 24 hs se observó un pellet oscuro que al resuspender en agua se obtiene una dispersión color verde. Empleando condiciones ligeramente diferentes fue posible separar los AuNTs recubiertos con especies de S reducido, con MUA y también aquellos con ácido lipoico. Los AuNTs separados pudieron ser purificados para eliminar el SDS y las dispersiones coloidales resultaron ser estables.

REFERENCIAS: [1] Scarabelli, L; et. al. ACS Nano 2014, 8, 5833–5842. [2] Huergo, M. A.; et. al. Appl. Surf. Sci. 2019, 464, 131-139. [3] Otero, C. M.; et. al. ACS Applied Nano Materials 2022 5 (1), 341-350.

SUPERFICIES NANOESTRUCTURADAS PARA BIOSENSADO Y ESTUDIO DE INTERACCIONES BIOMOLECULARES

Daza Millone, MA; Cisneros, JS; Ramirez, EA; Chain, CY; Vela, ME

Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), UNLP-CONICET, La Plata, Argentina.

PALABRAS CLAVE: SPR, EIS, biosensores, bicapas lipídicas soportadas, enfermedad de Chagas.

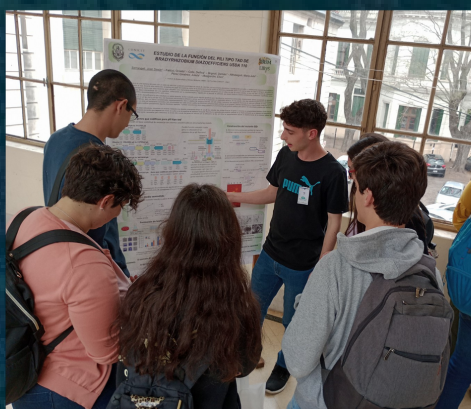
El grupo de “Superficies Nanoestructuradas para Biosensado y estudio de interacciones Biomoleculares” (SuNaBi) emplea técnicas ultrasensibles de caracterización y detección en diversos proyectos de interés en salud, medio ambiente y en el sector agroalimentario. En particular, técnicas como resonancia de plasmones superficiales (SPR) y microscopia de fuerzas atómicas (AFM) proveen información en tiempo real sin necesidad de marcado con sondas y con la posibilidad de estudiar sistemas en condiciones fisiológicas.

Podemos agrupar nuestros proyectos en las siguientes líneas de trabajo:

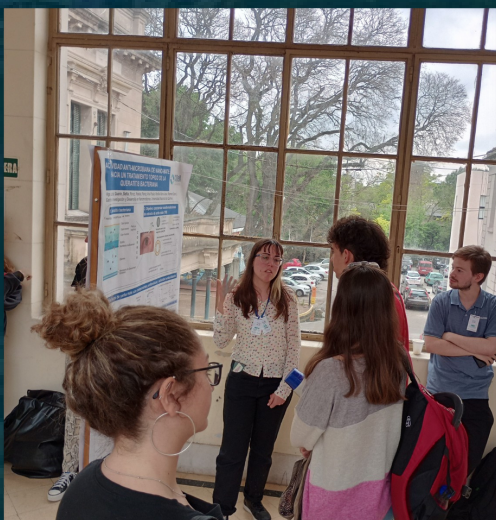
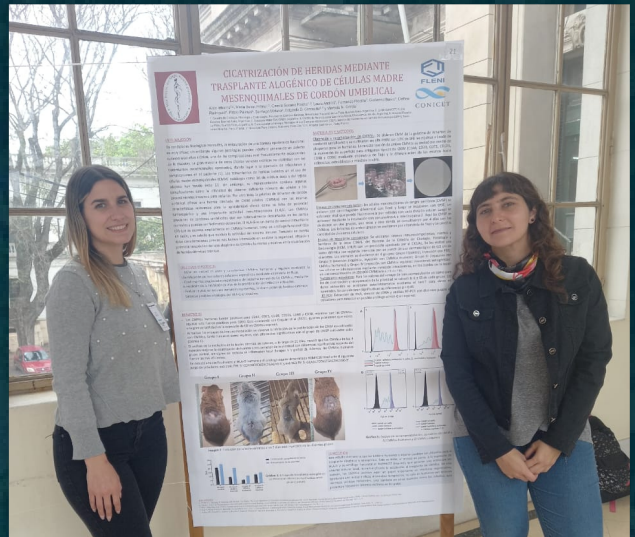
- Biosensores ópticos y electroquímicos con aplicaciones en medicina y sector agroalimentario: desarrollo de plataformas basadas en reconocimiento antígeno/anticuerpo para enfermedades desatendidas (Chagas, Dengue, Leptospirosis) o analitos de interés agroalimentario (micotoxinas, pesticidas) con tecnologías compatibles con dispositivos portátiles (detección en el punto de atención).
- Sistemas Biomiméticos y su interacción con fármacos, toxinas y nanomateriales: se emplean bicapas lipídicas soportadas (SLBs) como modelo de membranas biológicas para el estudio tanto de estructura, composición y dinámica de las fases lipídicas así como para el estudio de unión y distribución de componentes tanto endógenos como exógenos. Se busca correlacionar los resultados en estos modelos con estudios en sistemas más complejos (células y animales).
- Interacciones biomoleculares de nanovehículos de drogas con proteínas del plasma: estudio de las interacciones que experimentan los transportadores de drogas nanoparticulados con proteínas presentes en los fluidos biológicos, a fin de correlacionar con sus propiedades de *targeting* molecular y su *clearance* biológico.

En este resumen comentaremos algunos resultados publicados de las distintas líneas de trabajo así como los objetivos de los proyectos actuales.

Momentos...



Compartidos.



*Misión y Responsabilidad
del Investigador Científico
B. A. Houssay.*

INVESTIGADOR CIENTÍFICO ES QUIEN DEDICA CON PERSEVERANCIA SUS ESFUERZOS A LA INVESTIGACIÓN ORIGINAL CREADORA, EN FORMA INCESANTE Y PROGRESIVA, CON EL MÁXIMO DE SUS FUERZAS. INVESTIGACIÓN ORIGINAL ES LA QUE HAYA VERDADES NUEVAS, AÚN DESCONOCIDAS, AUNQUE NO SON SIEMPRE PREVISIBLES AL PRINCIPIO.



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA



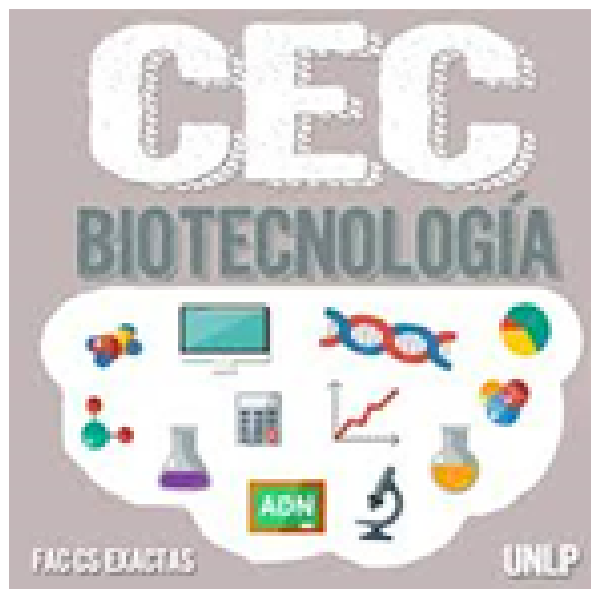
Facultad
de Ciencias
Exactas
UNLP



CAB
Cámara Argentina
de Biotecnología



**Fundación
Grupo Delsud**



Editoras de la revista digital:

**CRESPO CATALINA - SERRANO EMILIA
VILLAGARCÍA AILEN**