

**CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y
TECNOLÓGICO**
Informe Científico¹

PERIODO ²: 2007-2008

Legajo N°:

1. DATOS PERSONALES

APELLIDO: CAFFINI

(Legajo 173.311)

NOMBRES: Néstor Oscar

Dirección Particular: Calle: N°:

Localidad: CP: Tel:

Dirección electrónica (donde desea recibir información): caffini@biol.unlp.edu.ar

2. TEMA DE INVESTIGACION

“Aplicación Industrial de Enzimas Proteolíticas de Vegetales Superiores”

3. DATOS RELATIVOS A INGRESO Y PROMOCIONES EN LA CARRERA

INGRESO: Categoría: Independiente Fecha: 07/1988

ACTUAL: Categoría: Principal desde fecha: 28/12/2006

4. INSTITUCION DONDE DESARROLLA LA TAREA

Universidad y/o Centro: Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales (LIProVe)

Facultad: Ciencias Exactas

Departamento: Ciencias Biológicas

Cátedra:

Otros:

Dirección: Calle: 47 y 115 N°: s/n

Localidad: La Plata CP: B1900AJL Tel: 0221 423 0121

Cargo que ocupa: Director

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

Apellido y Nombres:

Dirección Particular: Calle: N°:

Localidad: CP: Tel:

Dirección electrónica:

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

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

Firma del Director (si corresponde)

Firma del Investigador

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

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

El suscripto es Director del Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales (LIProVE) desde su creación por el Consejo Superior de la Universidad Nacional de La Plata en 1992. En el mismo se ha desarrollado una creciente tarea relacionada con el aislamiento, purificación y caracterización de proteasas vegetales, así como ensayar su posible aplicación en procesos industriales tales como su uso como coagulantes vegetales para la producción de quesos, la búsqueda y ensayo de la actividad de péptidos bioactivos y la síntesis enzimática de los mismos, así como el aislamiento de nuevos inhibidores de peptidasas de origen vegetal. También se realiza una creciente tarea de vinculación con el sector productivo, tanto en el dosaje de proteínas como en el desarrollo de procesos de purificación de proteasas. La formación de recursos humanos es uno de los principales objetivos del LIProVe, de allí la presencia de pasantes, becarios y tesis de grado y de posgrado.

Durante el período que abarca el presente informe se han intensificado los propósitos fundacionales. En este momento forman parte del LIProVe dos investigadores y un profesional de apoyo de CICPBA, cuatro investigadores de CONICET, tres docentes con dedicación exclusiva y uno con semidedicación, cinco becarios doctorales de CONICET y uno de la ANPCyT, tres estudiantes avanzados de Biotecnología que realizan su tesina de grado y cinco alumnos pasantes, lo que hace un total de veinticinco personas afectadas en distinto grado a tareas de investigación.

En cuanto a la producción científica individual, en el período se han publicado o se encuentran en prensa cinco (5) trabajos en revistas internacionales con referato y se han enviado otros dos, además de haberse presentado seis (6) comunicaciones en distintos congresos nacionales e internacionales.

En relación a la cooperación internacional, el suscripto fue Coordinador del Proyecto CYTED IV.22 entre junio de 2003 y diciembre de 2007, que incluyó catorce grupos de diez países iberoamericanos. Actualmente se encuentra en proceso de edición el libro ("Enzimas proteolíticas de vegetales superiores. Aplicaciones industriales"), del cual el suscripto es Editor y autor de un capítulo (Néstor O. Caffini, Claudia L. Natalucci y Carlos E. Salas Bravo "Tipos de proteasas, distribución y rol en los vegetales").

La formación de recursos humanos implicó la dirección de seis becarios y de un Profesional Asistente de CICPBA, además de la defensa de una tesis doctoral. la dirección de otra y la codirección de una tercera en la Univ. Nac. de San Luis. Finalmente, la vinculación con el medio productivo se ha concretado a través de la renovación de un convenio con Laboratorios Delver de La Plata para el desarrollo de un procedimiento de cuantificación de proteínas en proteínas de cereales y otros materiales y la generación de un nuevo convenio con la Empresa L'Escargot para el análisis del contenido proteico y de glicosilaminoglicanos de helicina de caracol, producto con propiedades antisépticas y regenerante de tejidos.

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

7.1 PUBLICACIONES. *Debe hacer referencia exclusivamente a aquellas publicaciones en las que haya hecho explícita mención de su calidad de Investigador de la CIC (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Toda publicación donde no figure dicha mención no debe ser adjuntada porque no será tomada en consideración. A cada publicación, asignarle un número e indicar el nombre de los autores en el mismo orden que figuran en ella, lugar donde fue publicada, volumen, página y año. A continuación, transcribir el resumen (abstract)*

tal como aparece en la publicación. La copia en papel de cada publicación se presentará por separado. Para cada publicación, el investigador deberá, además, aclarar el tipo o grado de participación que le cupo en el desarrollo del trabajo y, para aquellas en las que considere que ha hecho una contribución de importancia, deberá escribir una breve justificación.

1. Bruno, Mariela A., Sebastián Trejo, Néstor O. Caffini & Laura M. I. López (2008) Purification and Characterization of Hieronymain III. Comparison with Other Proteases Previously Isolated from *Bromelia hieronymi* Mez. *The Protein Journal* 27: 426–433.

Abstract

A new proteolytic enzyme, named hieronymain III, has been purified by ion-exchange chromatography from unripe fruits of *Bromelia hieronymi* Mez. The new peptidase belongs to the cysteine catalytic type, as well as hieronymain I and II, the other two peptidases previously isolated from this species. Hieronymain III showed optimum alkaline pH range (8.6–9.3) and the molecular mass (MALDI-TOF/TOF) was 23713 Da. The N-terminal sequence (AVPQSIDWRRYGAVTTSRNQG) exhibited a higher percentage identity with hieronymain II (93%) than with hieronymain I (71%). The three peptidases showed notable differences on synthetic substrates degradation: whereas hieronymain III was the only one able to hydrolyze Z-Arg-Arg-p-nitroanilide, hieronymain I and II could degrade Z-Phe-Arg-p-nitroanilide; on the other hand, PFLNA was only split by hieronymain I. Finally, the three proteases showed different preferences on N-CBZ-p-nitrophenyl amino acid ester substrates. From a biotechnological point of view, cleavage specificity differences are significant enough to use these enzymes as potential tools in that area.

Participación

El trabajo constituye un aspecto parcial de la tesis doctoral de Mariela A. Bruno, dirigida por el suscripto y aprobada en abril de 2007 con calificación sobresaliente (10).

2. Vallés, Diego, Mariela Bruno, Laura M. I. López, Néstor O. Caffini and Ana María B. Cantera (2008) Granulosain I, a cysteine protease isolated from ripe fruits of *Solanum granuloso-leprosum* (Solanaceae). *The Protein Journal* 27:267–275.

Abstract

A new cysteine peptidase (Granulosain I) was isolated from ripe fruits of *Solanum granuloso-leprosum* Dunal (Solanaceae) by means of precipitation with organic solvent and cation exchange chromatography. The enzyme showed a single band by SDS-PAGE, its molecular mass was 24,746 Da (MALDI-TOF/MS) and its isoelectric point was higher than 9.3. It showed maximum activity (more than 90%) in the pH range 7–8.6. Granulosain I was completely inhibited by E-64 and activated by the addition of cysteine or 2-mercaptoethanol, confirming its cysteinic nature. The kinetic studies carried out with PFLNA as substrate, showed an affinity (K_m 0.6 mM) slightly lower than those of other known plant cysteine proteases (papain and bromelain). The N-terminal sequence of granulosain I (DRLPASVDWRGKGVLLVKNQGQC) exhibited a close homology with other cysteine proteases belonging to the C1A family.

Participación

El Lic. Diego Vallés realizó una pasantía de tres meses en el LIProVe bajo la dirección conjunta de las Dras. Bruno y López, en el marco del Proyecto CYTED IV.22 del cual fui coordinador.

3. Saparrat M.C.N., P. Mocchiutti, C.S. Liggieri, M.B. Aulicino, N.O. Caffini, P.A. Balatti & M.J. Martínez (2008) "Ligninolytic enzyme ability and potential biotechnology applications of the white-rot fungus *Grammothele subargentea* LPSC no. 436 strain" *Process Biochemistry* 43: 368–375.

Abstract

To get a better insight into the ligninolytic system of *Grammothele subargentea*, extracellular ligninolytic enzyme activities and ability to degrade synthetic dyes as well as *Eucalyptus globulus* wood were assayed in cultures grown on an agar medium with Cu^{2+} or dyes and on *E. globulus* wood chips. Laccase was the only ligninolytic enzyme detected. The fungus was able to decolorize different dyes, being the highest levels of laccase activity in cultures with Brilliant Green. Cultures on wood showed both ligninolytic activity and degradative ability on lipophilic extractives. An extracellular laccase with pI 3.5 and maximal activity at pH 4.0 and 50–55 °C was detected on liquid cultures containing 0.6 mM Cu^{2+} . The enzyme extract was stable at pH 6.0–7.0 and up to 60 °C. A laccase-mediator system using a *G. subargentea* laccase crude extract and 1-hydroxybenzotriazole as mediator improved the tensile strength of a paper from recycled high-kappa-number pulp.

Participación

El Dr. Mario Saparrat, quien realizó oportunamente un curso de posgrado sobre aislamiento y purificación de proteínas organizado por el LIProVe, estuvo desarrollando junto con la Dra. Constanza Liggieri, profesional de apoyo de CIC y miembro de este laboratorio, los ensayos sobre actividad enzimática vinculados con el trabajo, bajo la coordinación del suscripto.

4. Abreu Payrol, J., W.D. Obregón, S.A. Trejo & N.O. Caffini (2008) "Purification and Characterization of Four New Cysteine Endopeptidases from fruits of *Bromelia pinguin* L. grown in Cuba". *The Protein Journal* 27: 88-96

Abstract

Bromelia pinguin L. is a plant broadly distributed in Central America and Caribbean islands. The fruits have been used in traditional medicine as anthelmintic, probably owed to the presence of a mixture of cysteine endopeptidases, initially termed pinguinain. This work deals with the purification and characterization of the four main components of that mixture, two of them showing acid pI and the other two alkaline pI. Molecular masses (SDS-PAGE and MALDI-TOF), N-terminal sequence and the reactivity and kinetic parameters versus synthetic substrates (p-nitrophenyl-N-a-CBZ-amino acid esters, PFLNA, Z-Arg-Arg-p-NA, and Z-Phe-Arg-p-NA) of the studied peptidases are given, as well as the N-terminal sequences of the enzymes and the homology degree with other plant endopeptidases.

Participación

El trabajo constituye parte de la tesis doctoral de Juan Abreu Payrol, presentada en la Universidad de La Habana, Cuba, cuya parte experimental fue realizada en el LIProVe merced a una pasantía realizada en el marco del Proyecto CYTED IV:22 del cual el suscripto fue coordinador.

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

Sebastián A. Trejo, Laura M.I. López, Néstor O. Caffini, Claudia L. Natalucci, Francisc Canals and Francisc X. Avilés. "Sequencing and characterization of asclepain f: the first cysteine peptidase cDNA cloned and expressed from mRNA isolated from plant latex". Planta, DOI:10.1007/s00425-009-0942-2

Abstract

Asclepain f is a papain-like protease previously isolated and characterized from latex of *Asclepias fruticosa*. This enzyme is a member of the C1 family of cysteine proteases that are synthesized as preproenzymes. The enzyme belongs to the alpha + beta class of proteins, with two disulfide bridges (Cys22-Cys63 and Cys56-Cys95) in the alpha domain, and another one (Cys150-Cys201) in the beta domain, as was determined by molecular modeling. A full-length 1,152 bp cDNA was cloned by RT-RACE-PCR from latex mRNA. The sequence was predicted as an open reading frame of 340 amino acid residues, of which 16 residues belong to the signal peptide, 113 to the propeptide and 211 to the mature enzyme. The full-length cDNA was ligated to pPICZ α vector and expressed in *Pichia pastoris*. Recombinant asclepain f showed endopeptidase activity on pGlu-Phe-Leu-p-nitroanilide and was identified by PMF-MALDI-TOF MS. Asclepain f is the first peptidase cloned and expressed from mRNA isolated from plant latex, confirming the presence of the preprocysteine peptidase in the latex.

Participación

El Dr. Sebastián Trejo realizó su tesis doctoral en el LIProVe merced a una beca doctoral mixta de CONICET, bajo la dirección conjunta del Dr. Xavier Avilés (IBB, Barcelona) y el suscripto.

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

1. Bruno, M.A., C.M. Lazza, M.E. Errasti, L.M.I. López, N.O. Caffini & M.F. Pardo "Milk Clotting and Proteolytic Activity of an Enzyme Preparation from of *Bromelia hieronymi* Fruits". Enviado a LWT-Food Science and Technology (LWT-D-09-00013)

Abstract

A new enzyme preparation (hieronymain), obtained from unripe fruits of *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae), was assayed for its ability to clot milk and to hydrolyze bovine casein and milk whey proteins. Caseinolytic activity at 30 °C and pH 6.5 (milk clotting conditions) was 3.3 Ucas/mL and milk clotting activity was 40 \pm 0.2 IMCU/mL. The κ -casein fraction, involved in clotting formation, began to be degraded after 10 min of reaction, while the degradation of the other casein fractions

proceeds enough slowly as to guarantee the production of a firm curd, with no evidence of extensive hydrolysis, a necessary condition for cheesemaking. In the case of whey proteins, bovine seroalbumin and α -lactalbumin were quickly degraded after 30 min, while β -lactoglobulin was considerably degraded only after 60 min at 50 °C. Hieronymain might be appropriate for cheesemaking, as well as for the production of milk protein hydrolysates.

2. M. F. Pardo, M. A. Bruno, C. Sequeiros, S. A. Trejo, L. M. I. López, N. O. Caffini and C. L. Natalucci "New plant endopeptidases with potential application in cheesemaking". Enviado a Acta Alimentaria (Budapest)

Abstract

Results are given on the milk clotting properties and casein hydrolytic behaviour of partially purified extracts of four new cysteine plant endopeptidases: balansain, hieronymain, asclepain f, and philibertain g. Milk coagulation behaviour was different for the assayed proteases: balansain and hieronymain showed a similar performance, whereas asclepain f exhibited the lower clotting activity; philibertain g exhibited the highest one when was previously incubated with cysteine. According to the relative ratio of clotting activity to proteolytic activity, balansain, philibertain g and hieronymain appear as possible vegetable rennets. Casein hydrolysates were carried out with each enzyme and the hydrolysis pattern was analysed by tricine SDS-PAGE. The α 2- and α 1-casein fractions, associated with cheese texture, showed different degradation patterns: higher degradation kinetics was obtained for philibertain g, followed by balansain and hieronymain, while asclepain f showed the lower activity. The β -casein fraction, related to bitterness, showed similar initial degradation kinetics for balansain and asclepain f; degradation is faster in the case of philibertain g and slower for hieronymain. In the case of the κ -casein fraction, involved in milk clotting, the most remarkable behaviour is that of hieronymain, as this casein fraction is quickly degraded by the protease.

7.4 TRABAJOS TERMINADOS Y AUN NO ENVIADOS PARA SU PUBLICACION.

Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo.

Claudia L. Natalucci, Laura M.I. López, Adriana Brullo, Bruno Maras, Sebastián A. Trejo, Boris Turk and Néstor O. Caffini "Amino acid sequence and structural properties of macrodontan I, a protease from Pseudananas macrodantes".

Abstract

The present paper deals on the full sequencing of macrodontan I, the main peptidase present in unripe fruits of Pseudananas macrodantes (E. Morren) Harms (UniProtKB/Swiss-Prot entry P83443). The protein sequence of macrodontan I was compared with the published protein sequences of ananain, papain, chymopapain, fruit and stem bromelain using the the BLAST network service. Hydropathy plots for the same enzymes were generated using the hydropathy scale derived by Kyte and Doolittle.

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

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

8. TRABAJOS DE DESARROLLO DE TECNOLOGÍAS.

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

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

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

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

- Validación de un método colorimétrico para cuantificación de proteínas en granos de trigo. Laboratorios Delver, La Plata. Anualmente se elaboran soluciones reactivo, de referencia y de calibración para la empresa mencionada, así como validaciones del método para materiales de diverso origen.

- Desarrollo de técnicas para valoración de glicosilaminoglicanos y componentes proteicos en helicina. Empresa L'Escargot, La Plata. Setiembre de 2007.

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

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

10. PUBLICACIONES Y DESARROLLOS EN:

10.1 DOCENCIA

10.2 DIVULGACIÓN

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

Becarios

1. Dr. Marcelo Fabián Pardo. Tema: "Aislamiento, purificación y caracterización de proteasas vegetales destinadas a la obtención de proteínas modificadas para uso alimentario". Beca Posdoctoral de la UNLP desde el 1º de abril de 2005
2. Bioqco. Walter David Obregón. Beca Interna de Postgrado Tipo I del CONICET. Tema "Hidrolasas de Látex de Especies del Género Araujia. A partir del 1º de Mayo de 2004.
3. Bioqca. Mariela Anahí Bruno. Tema: "Aislamiento, purificación y caracterización de las proteasas de frutos Bromelia hieronymi Mez. (Bromeliaceae). Su aplicación en la industria alimentaria". Becaria de Formación Superior de la UNLP. Desde el 1º de abril de 2006.
4. Bioqca. María Eugenia Errasti. Beca de Entrenamiento de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires. Desde el 1º de septiembre de 2006. Beca

Interna de Postgrado Tipo I del CONICET. Tema “Aplicaciones biomédicas de proteasas de origen vegetal”. Desde el 1º de Abril de 2008..

Personal de Apoyo

Dra. Constanza Silvina Liggieri. Profesional Asistente de la CICPBA. Desde septiembre de 2005.

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

Dra. Mariela Anahí Bruno. Tesis para optar al Doctorado de la Facultad de Ciencias Exactas. Tema: “Aislamiento, purificación y caracterización de las proteasas de frutos Bromelia hieronymi Mez. (Bromeliaceae)”. Abril de 2007. Calificación sobresaliente (10).

Bioquímica María Eugenia Errasti. Tesis para optar al Doctorado de la Facultad de Ciencias Exactas. Tema “Aplicaciones biomédicas de proteasas de origen vegetal”. Año 2008. En ejecución.

Farm. Marta Elisa Petenatti. Tesis para optar al Doctorado en Farmacia de la Universidad Nacional de San Luis. “Estudios Farmacognósticos y Químicos en Cinco Plantas Medicinales con Probada Acción sobre el Sistema Nervioso Central”. Codirección. En ejecución.

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

1. Errasti, M.E., Bruno M.A., and Caffini N.O. “Obtaining and characterization of casein hydrolysates using proteases from Bromelia hieronymi”. XLIV Reunión Anual SAIB, Carlos Paz, Córdoba 8-11 de Noviembre 2008
- 2.. Bruno, Mariela Anahí; Trejo, Sebastián Alejandro, Errasti, María Eugenia; Caffini, Néstor Oscar y López, Laura María Isabel. “Detección de actividad inhibitoria de carboxipeptidasa A en un extracto acuoso de Bromelia hieronymi Mez (Bromeliaceae), con posible aplicación terapéutica en la Enfermedad de Chagas” Congreso SAIC/SAFIS 2008, Mar del Plata, noviembre de 2008.
3. Marta E. Petenatti, Elisa M. Petenatti, Luis A. Del Vitto, Néstor O. Caffini & Eduardo J. Marchevsky. “Composición mineral en cinco plantas medicinales silvestres y exóticas con probada acción sedativa sobre el sistema nervioso central”. XXVII Congreso Argentino de Química. Tucumán, octubre de 2008.
4. Bruno, M. A.; Trejo, S. A.; Avilés, F. X.; Caffini, N. O.; López, L. M .I., “Cloning and sequencing of a cysteine protease from fruits of Bromelia hieronymi Mez.” 43th Annual Meeting Argetnine Society for Biochemistry and Molecular Biology Research. Mar del Plata, Argentina, noviembre de 2007. Biocell 31 (Suppl.): 138.
5. Bruno Mariela A, Lazza Cristian M., Errasti María E., López Laura M.I., Caffini Néstor O & Pardo Marcelo F. “Obtención De Miniquesos Utilizando Una Proteasa Aislada Del “Chaguar” (Bromelia Hieronymi Mez), Planta Empleada En Artesanías Por La Comunidad Wichí”. XVI Congreso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina, La Plata, septiembre de 2007
6. Cristian M. Lazza, Gastón Vaghi, María J. Torres, Susana Morcelle del Valle, Walter D. Obregón, Néstor Caffini y Laura M.I. López. “Detección De Actividad Inhibitoria De Proteasas En Extractos De Semillas”. XVI Congreso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina, La Plata, septiembre de 2007

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

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

Proyecto: "Proteasas Vegetales. Aplicaciones Biotecnológicas". Proyecto X-445, acreditado por la Universidad Nacional de La Plata. Años 2006-2009. Monto recibido \$ 12.000

Proyecto: "Endopeptidasas Vegetales Con Aplicaciones Biotecnológicas". Otorgado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica. Programa FONCYT. PICT 38088. Año 2007. Monto recibido \$ 260.145.

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

17. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO.

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

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

Dictado de la asignatura Biología (tercer semestre del Ciclo Básico de la Facultad de Ciencias Exactas, destinada a alumnos de Farmacia, Bioquímica, Química, Física Médica y las Licenciaturas en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Óptica Ocular, Biotecnología y Biología Molecular y Química y Tecnología Ambiental). El tiempo insumido fue de 18 horas semanales en el segundo semestre de 2007 y 2008.

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

1. Dra. Martha Yajía. Mayo de 2007. Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.
2. Dra. Stella Maris Carpano. Mayo de 2007. Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata.
3. Dra. Elvira María Falzoni. Agosto de 2007. Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata.
4. Dr. Nadir de la Rocha. 13 de Diciembre de 2007. Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de San Luis.
5. Dra. Graciela Inés Ponessa. 21 de Diciembre de 2007. Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.
6. Dra. Mónica Alejandra Boeris. 27 de Diciembre de 2007. Secretaría General de Posgrado y Educación Continua. Universidad Nacional del Sur.
7. Dr. Walter David Obregón. Marzo de 2008. Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata.

8. Dr. Eduardo Daniel Prieto. Septiembre de 2008. Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata.
9. Dr. Arley David Zapata Zapata. Noviembre de 2008. Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata.
10. Dra. María Adelaida Rosella. Noviembre de 2008. Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata.
11. Dr. Juan María Luco, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis. Diciembre de 2008
12. Dra. María Eugenia Álvarez, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis. Diciembre de 2008
13. Dra. María del Rosario Fusco, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis. Diciembre de 2008.

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

TITULO: "Aplicación biotecnológica y biomédica de enzimas proteolíticas y de inhibidores de origen vegetal"

Objetivos Generales

- Ensayar la acción de peptidasas vegetales estudiadas en el LIProVe sobre proteínas alimentarias con la finalidad de obtener péptidos bioactivos.
- Aislar, purificar y caracterizar inhibidores de proteasas a partir de especies vegetales autóctonas y ensayar su acción sobre proteasas blanco responsables de patologías específicas en humanos.

Objetivos Específicos

1. Proteasas

- Preparación de hidrolizados de proteínas alimentarias empleando fitoproteasas obtenidas a partir de especies vegetales ya estudiadas en el LIProVe.
- Determinación de actividades biológicas (antioxidante, antimicrobiana y antihipertensiva) en los hidrolizados proteicos obtenidos.
- Identificación de los péptidos bioactivos responsables de las actividades biológicas detectadas.
- Clonación y expresión de las proteasas vegetales que resulten de importancia biotecnológica.

2. Inhibidores

- Detectar actividad inhibitoria de proteasas en extractos vegetales.
- Purificar y caracterizar bioquímicamente y estructuralmente los inhibidores detectados.
- Ensayar la acción de los inhibidores aislados frente a proteasas blanco responsables de patologías específicas en humanos.
 - Clonar y expresar los inhibidores de mayor interés.

MATERIAL Y METODOLOGÍA

1. Material Vegetal

Se empleará material vegetal de especies pertenecientes a las familias Bromeliaceae, Moraceae, Asteraceae y Asclepiadaceae.

2. Obtención de preparaciones crudas y parcialmente purificadas

2.1. Frutos de especies de la familia Bromeliaceae

Los frutos serán triturados en buffer fosfatos de pH 6, conteniendo sustancias reductoras y EDTA para evitar la acción de las fenoloxidasas. Luego de filtrar y

centrifugar a 10000 g los sobrenadantes (extractos crudos) serán almacenados en alícuotas a -20°C.

2.2. Flores de especies pertenecientes a la familia Asteraceae

Las flores serán trituradas en presencia de N₂ líquido hasta obtener un polvillo fino al cual se le agregará un volumen de buffer conteniendo protectores adecuados y se agitará en baño de hielo durante 30 min. Las suspensiones así obtenidas se centrifugarán durante 20 min a 5.000 g y 4 °C, separándose el sobrenadante. Los restos vegetales serán eliminados por centrifugación a 10.000 g. Para eliminar pigmentos se empleará un tratamiento con carbón activado o una cromatografía de exclusión molecular a bajas temperaturas.

2.3. Látex de especies pertenecientes a las familias Asclepiadaceae y Moraceae

El látex (conteniendo proteasas) será obtenido por exudación realizando incisiones del órgano vegetal que lo contenga y será colectado a temperatura 0-4°C sobre un buffer apropiado, y posteriormente congelado. La clarificación mediante una primera centrifugación en frío de la suspensión a 10.000 g y una posterior ultracentrifugación del sobrenadante a 100.000 g, permitirá eliminar gomas y otros materiales insolubles, obteniéndose así el extracto crudo. En caso en que las proteasas se encuentren localizadas en otros tejidos se procederá de la forma descrita para frutos.

3. Purificación

Los extractos crudos se purificarán en forma preliminar por precipitación etanólica fraccionada. Luego se determinará actividad proteolítica utilizando caseína como sustrato y contenido de proteínas totales por el método de Bradford. La purificación propiamente dicha de las peptidasas se realizará empleando distintas técnicas cromatográficas (FPLC).

4. Caracterización de las enzimas purificadas

La masa molecular determinará por SDS-PAGE y espectrometría de masas (MALDI-TOF-TOF). La aplicación de isoelectroenfoque permitirá establecer el valor del punto isoeléctrico de cada una de las fracciones obtenidas. Se determinarán los parámetros cinéticos K_m y k_{cat} empleando sustratos sintéticos. Se analizará la secuencia aminoacídica N-terminal y eventualmente de algunos fragmentos internos de la proteasa purificada.

5. Clonado de las proteasas vegetales

Se extraerá el RNA total del material seleccionado; si es necesario el mRNA será aislado por cromatografía de afinidad (oligo dT celulosa). Conociendo la secuencia correspondiente al extremo N-terminal de la proteasa y eventualmente de algunos fragmentos internos, se intentará la amplificación del cDNA específico por RT-PCR. La síntesis de la primera cadena de cDNA se realizará empleando el mRNA como molde, oligo-dT como cebador y transcriptasa reversa AMV. Diferentes cantidades del cDNA obtenido serán empleadas como molde en ensayos de PCR utilizando como cebadores el mismo oligo-dT empleado en la transcripción reversa (antisentido) y los oligonucleótidos cuyas secuencias hayan sido deducidas a partir del extremo N-terminal o de fragmentos internos de la proteasa. La existencia del producto de amplificación deseado (aproximadamente 1,6-1,7 kb) se analizará en geles de agarosa al 0,8 % en presencia de bromuro de etidio. En caso de obtener un producto de amplificación correspondiente al tamaño esperado para el mRNA de la proteasa, el mismo será clonado empleando un vector adecuado y posteriormente secuenciado. La secuencia obtenida será analizada empleando los algoritmos BLAST para establecer el grado de homología con otras fitoproteasas.

6. Hidrólisis controlada de proteínas alimentarias. Obtención de péptidos bioactivos

Las preparaciones parcialmente purificadas serán ensayadas en diferentes condiciones (pH, temperatura y tiempo de reacción) sobre caseinatos sódicos y proteínas séricas de diferente origen (bovino, caprino y ovino), sobre κ -caseína bovina comercial y α y β -caseínas bovinas purificadas a partir del respectivo caseinato, así como proteínas de soja y otras proteínas alimenticias. En todos los casos se realizarán los respectivos blancos (blanco de sustrato: en lugar de la enzima se agrega H₂O destilada y blanco de reactivos: se realiza hirviendo la enzima durante 5 minutos para inactivarla). Se analizarán en cada caso los péptidos resultantes por electroforesis en geles de poliacrilamida con urea, RT-HPLC y HPLC-MS.

7. Determinación de actividades biológicas a los productos de hidrólisis obtenidos

7.1. Determinación de la actividad antioxidante

Para evaluar la actividad antioxidante de los hidrolizados, éstos deben reaccionar con un radical estable, tal como el 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•). La reducción del DPPH• será monitoreada espectrofotométricamente midiendo el descenso de la absorbancia a 517 nm del reactivo, haciendo una curva patrón con ácido ascórbico.

7.2. Determinación de la actividad antihipertensiva

La actividad antihipertensiva de los hidrolizados será evaluada como la capacidad para inhibir la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA). Se utilizarán los hidrolizados proteicos como posibles inhibidores de la ECA, utilizando como sustrato la Hipuril-Histidil-Leucina. La actividad se determinará incubando la enzima con el sustrato sintético en presencia o ausencia de los hidrolizados con potencial capacidad inhibitoria. El producto de la reacción, ácido hipúrico, se determinará por absorbancia a 228 nm, estableciendo el porcentaje de inhibición de la reacción..

7.3. Determinación de la actividad antimicrobiana

Los hidrolizados serán evaluados como agentes antimicrobianos utilizando diferentes cepas de microorganismos (gram positivos, gram negativos y levaduras) determinándose la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM).

8. Detección de actividad inhibitoria de proteasas

Para detectar la presencia de actividad inhibitoria en los extractos vegetales obtenidos según lo indicado anteriormente, proteasas que han sido purificadas en el LIProVe o proteasas comerciales (proteasas blanco) serán incubadas en diferentes condiciones de pH, temperatura y fuerza iónica con dichos extractivos, determinándose luego la actividad proteolítica residual frente a sustratos sintéticos adecuados. Se variarán las concentraciones de enzima y los tiempos de incubación. Dichos extractos también serán analizados por zimograma reverso.

Alternativamente se utilizarán proteasas propias o comerciales para efectuar ensayos de inhibición-perturbación. Cuando en un extracto haya ciertas evidencias de hallarse estas actividades o inhibidores, se procederá a su análisis proteómico (interactómico) mediante la metodología de Intensity-fading MALDI-TOF MS, lo que permitirá identificar posibles dianas enzimáticas o especies proteicas (u orgánicas) con capacidad inhibitoria y su masa molecular.

9. Purificación de inhibidores de proteasas (IPs)

El análisis por isoelectroenfoque (IEF) de las fracciones que muestren actividad inhibitoria provenientes del extracto crudo permitirá definir la estrategia de purificación a adoptar. De acuerdo a los puntos isoeléctricos (pI) obtenidos, las preparaciones serán purificadas mediante FPLC (cromatografía de intercambio iónico o afinidad utilizando papaína-Sepharosa o tripsina-Sepharosa). Una vez separadas las fracciones con actividad inhibitoria serán sometidas a cromatografía de exclusión molecular o RP-HPLC. En cada etapa se establecerán el grado de purificación alcanzado y el porcentaje de recuperación de la actividad original. La presencia de actividad inhibitoria en cada una de las fracciones proteicas separadas se determinará también a través de la realización de zimogramas a partir de los geles provenientes de isoelectroenfoque y eventualmente de SDS-PAGE.

10. Caracterización de los IPs

El peso molecular relativo se estimará por SDS-PAGE y espectrometría de masas. La posterior aplicación de isoelectroenfoque permitirá establecer el grado de homogeneidad y el valor del punto isoeléctrico de cada una de las fracciones. Con el objeto de conocer la especificidad de los inhibidores en estudio, se determinarán parámetros cinéticos y mediante el empleo de distintos tipos de proteasas se determinará la K_i (app) para cada enzima. Se programa ensayar los inhibidores aislados frente a las proteasas blanco del HIV, plasmepsina II (malaria), cathepsinas B, H, L (cáncer), metalo carboxipeptidasas-matriz proteinasas (cáncer y fibrinólisis) y otras de interés farmacológico. La actividad inhibitoria se expresará en unidades de inhibición (UI), determinando en cada caso el valor de UI₅₀: cantidad de inhibidor que produce una disminución de actividad proteolítica del 50% en las condiciones de ensayo. Se determinará el extremo N-terminal de los inhibidores purificados, así como la secuencia aminoacídica completa en los casos de mayor interés. La secuencia obtenida será analizada empleando los algoritmos BLAST para establecer el grado de homología con otros IPs.

11. Obtención y secuenciamiento de cDNAs de IPs

Se extraerá el RNA total del material seleccionado; de ser necesario contar con mRNA, el mismo será aislado por cromatografía de afinidad. Conociendo la secuencia correspondiente al extremo N-terminal del IP, se intentará la amplificación del cDNA específico por RT-PCR. La síntesis de la primera cadena de cDNA se realizará empleando el mRNA como molde, oligo-dT como cebador y transcriptasa reversa AMV. Diferentes cantidades del cDNA obtenido serán empleadas como molde en ensayos de PCR utilizando como cebadores el mismo oligo-dT usado en la transcripción reversa (antisense) y el oligonucleótico cuya secuencia ha sido deducida a partir del extremo N-terminal del IP. La existencia del producto de amplificación deseado se analizará en geles de agarosa. En caso de obtener un producto de amplificación correspondiente al tamaño esperado para el mRNA del IP de interés, el mismo será clonado empleando un vector adecuado y posteriormente secuenciado. Se utilizarán los primers universales cuyos sitios de annealing están presentes en el vector de clonado y primers específicos que serán diseñados con tal fin. La secuencia obtenida será analizada empleando los algoritmos BLAST para establecer el grado de homología con otros IPs.

12. Clonado y Expresión de IPs

Una vez obtenida la secuencia del cDNA del inhibidor, éste podrá ser clonado en un vector de expresión bajo un promotor fuerte e inducible (Lac o T7) en *Pichia pastoris*, una levadura que ha sido ampliamente utilizada y que tiene mayores niveles de expresión que otros sistemas eucarióticos. En este sistema el gen de interés se integra al genoma, es de fácil inducción y de bajo costo y se obtienen altos rendimientos en la

producción de proteínas. Esta metodología ya ha permitido la expresión de la proteasa presente en el látex de *Asclepias fruticosa*.

Condiciones de la presentación:

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

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