

**Informe Científico-tecnológico
período 2016-2017**

Constanza S. Liggieri

INDICE INFORME PERIODO 2016-2017

	Página
1. Datos personales	1
2. Otros Datos	1
3. Proyectos de investigación en los cuales colabora	1
4. Director	3
5. Lugar de trabajo	3
6. Institución donde desarrolla tareas docentes u otras	3
7. Resumen de la Labor que desarrolla	3
8. Exposición sintética de la labor desarrollada en el período	3
8.1. Especie <i>Asclepias curassavica</i> (Asclepiadaceae)	3
8.2. Estudios moleculares de proteínas de la especie <i>Silybum marianum</i> (Fam Asteraceae)	5
8.3. Clonación y secuenciamiento de una proteasa cisteínica de la especie <i>Bromelia hieronymi</i> (Bromeliaceae)	7
8.4. Actividades biológicas en hidrolizados de soja empleando las especies <i>Bromelia hieronymi</i> (Bromeliaceae) y <i>Asclepias curassavica</i> (Asclepiadaceae)	8
8.5. Hidrolizados de proteínas de leche de cabra empleando las peptidasas de <i>Bromelia hieronymi</i> (Bromeliaceae)	11
8.7. Colaboración en ensayos de laboratorio para el grupo de trabajo que dirige la Dra. Sandra Vairo Cavalli	14
9. Otras Actividades	15
9.1. Publicaciones Científicas	15
9.2. Publicaciones de Abstracts con Referato	16
9.3. Manuscritos enviados para su evaluación para ser publicado en Revistas Científicas	16
9.4. Comunicaciones a Reuniones Científicas/Tecnológicas	16
10. Tareas Docentes desarrolladas en el período	17
11. Otros elementos de juicio no contemplados en los títulos anteriores	18
11.1. Dictado de Cursos de Postgrado	18
11.2. Co-Dirección de pasante de laboratorio	18
11.3. Miembro de Comisiones Asesoras para evaluar TF de Carrera de Especialización	18
11.4. Miembro de Comisiones Asesoras para evaluar Proyectos de Extensión de la UNLP	19
11.5. Finalización de la Carrera de Especialización en Docencia Universitaria	19
11.6. Subsidios recibidos o en ejecución en el periodo	20
11.7. Gestión Administrativa y Contable del Ciprove	20
Probanzas	pg.sigs

INFORME PERIODO 2016-2017

1. APELLIDO: LIGGIERI

Nombre(s) CONSTANZA SILVINA

Título(s) Lic. En Biología (Or. Ecología); Dra. en Ciencias Exactas; Especialista en Docencia
Universitaria

Dirección Electrónica:

2. OTROS DATOS

INGRESO: Categoría: Asistente Mes: Septiembre Año: 2005

ACTUAL: Categoría: Principal Mes: Octubre Año: 2016 (Acta 1448)

3. PROYECTOS DE INVESTIGACION EN LOS CUALES COLABORA

3.1. Participación como Co-Directora en Proyectos Acreditados de Investigación Científica

NOMBRE DEL PROYECTO: "Optimización de la obtención de proteínas vegetales con potencial aplicación biotecnológica y biomédica". Código X-746.

PERÍODO DE EJECUCIÓN: 2016-2019

UNIDAD DE EJECUCIÓN: Centro de Investigación de Proteínas Vegetales (LIPROVE)

INSTITUCIÓN DE LA QUE DEPENDE LA UNIDAD DE EJECUCIÓN: Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP).

ENTIDAD FINANCIADORA: Universidad Nacional de La Plata. en el marco del Programa de Incentivos a la Investigación de la Secretaría de políticas Universitarias del Ministerio de Cultura y Educación.

Financiamiento obtenido: Sí

3.2. Participación en el Grupo Responsable de Proyectos Acreditados de Investigación Científica

NOMBRE DEL PROYECTO: "Desarrollo de cosmeceúticos conteniendo péptidos antioxidantes obtenidos por acción de fitoproteasas de la flora autóctona". Código: PICT-2013-2531. Categoría "Plan Argentina Innovadora 2020" Tipo A. Res. N° 214/14 y 539/13.

PERÍODO DE EJECUCIÓN: 2014-2017

UNIDAD DE EJECUCIÓN: Centro de Investigación de Proteínas Vegetales (CEPROVE)

INSTITUCIÓN DE LA QUE DEPENDE LA UNIDAD DE EJECUCIÓN: Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP).

ENTIDAD FINANCIADORA: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva, Ministerio de Educación, Ciencia y Tecnología, Presidencia de la Nación. Programa FONCYT (Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica).

Educación.

Financiamiento obtenido: Sí

3.3. Participación como colaboradora en Proyectos Acreditados de Investigación Científica

NOMBRE DEL PROYECTO: "Aplicaciones biotecnológicas de enzimas hidrolíticas provenientes de la flora nativa." Código: Proyecto X-682

PERÍODO DE EJECUCIÓN: 2014-2017

UNIDAD DE EJECUCIÓN: Centro de Investigación de Proteínas Vegetales (Ciprove)

INSTITUCIÓN DE LA QUE DEPENDE LA UNIDAD DE EJECUCIÓN: Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP).

ENTIDAD FINANCIADORA: Universidad Nacional de La Plata en el marco del Programa de Incentivos a la Investigación de la Secretaría de políticas Universitarias del Ministerio de Cultura y Educación.

Financiamiento obtenido: Sí

4. DIRECTOR

Apellido y Nombre (s): Caffini, Néstor Oscar

Cargo Institución: Ex-Investigador Principal CICPBA. Director del CIPROVE. Profesor Extraordinario Consulto. Fac. de Ciencias Exactas. U.N.L.P.

Dirección:

Dirección Electrónica:

5. LUGAR DE TRABAJO

Institución: Centro de Investigación de Proteínas Vegetales (CiProVe).

Dependencia: Departamento de Ciencias. Biológicas. Fac. de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata.

Dirección: Calles 47 y 115. Ciudad: La Plata. C. P: 1900 Prov: Bs. As.

Tel: (0221) 423 5333/0121 (int. 57).

6. INSTITUCION DONDE DESARROLLA TAREAS DOCENTES U OTRAS

Nombre: Fac. de Ciencias Exactas. UNLP

Dependencia: Departamento de Ciencias Biológicas.

Dirección: Calles 47 y 115.

Ciudad: La Plata C. P: 1900 Prov: Bs. As Tel: (0221) 423 5333/0121 (int. 34)

Cargo que ocupa: Jefe de Trabajos Prácticos. Dedicación Simple. Área: Biología.

Especialidad: Biología

7. RESUMEN DE LA LABOR QUE DESARROLLA (Descripción para el repositorio institucional.

Durante mi desarrollo profesional me he formado en: aislamiento, purificación y caracterización de proteasas vegetales de plantas autóctonas y cultivadas. Algunas técnicas de biología molecular, como clonación, expresión utilizando sistemas vivos como levaduras, bacterias y plantas. Hidrolizados proteicos para la obtención de péptidos bioactivos y su empleo y posterior evaluación de su eficacia en diferentes actividades como antimicrobianas, antifúngicas, antihipertensiva, antioxidante. Evaluación del grado de hidrólisis de los sustratos proteicos empleando estas proteasas como catalizadores. Aislamiento de inhibidores peptídicos.

8. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO

8.1. Especie *Asclepias curassavica* (Asclepiadaceae)

Del mismo modo que he informado en periodos anteriores, de la especie *A. curassavica* se obtiene un extractivo enzimático en nuestro laboratorio, el cual es enviado periódicamente al Laboratorio de Bromatología, perteneciente Instituto de Física Aplicada, INFAP, y dependiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, CONICET- Universidad Nacional de San Luis. Dicho extracto es utilizado por los investigadores y becarios del mismo para ser probado en distintos tipos de ensayos. El vínculo laboral se ha establecido con la Prof. Dra. Sonia Barberis.

En el laboratorio se encuentra haciendo su tesis doctoral la Sta. Anabella Origone, quien emplea a la especie *A. curassavica* como catalizador biológico para la síntesis enzimática de péptidos en medios orgánicos. El año pasado (2016) el laboratorio envió muestras al Ciprove de péptidos catalizados por esta especie para realizar ensayos de actividad inhibitoria de la ECA (Enzima Convertidora de Angiotensina I), enzima involucrada en el proceso de la hipertensión arterial. El objetivo que se busca con esta experiencia es ensayar si dichos péptidos pueden ser considerados bioactivos al poseer actividad antihipertensiva. Si bien se llevó a cabo el ensayo, no se pudieron sacar resultados concluyentes ya que la cantidad de muestra enviada fue insuficiente. Sin embargo, la doctorando ha venido a realizar una pasantía en nuestro Centro (26 de Junio al 7 de Julio de 2017) para capacitarse en diferentes técnicas, incluyendo la

repetición del ensayo de la actividad antihipertensiva de los péptidos por ella sintetizados.

Explicaré brevemente lo que está a mi cargo de este proyecto de trabajo en conjunto como colaboradora.

Obtención de extractivos crudos, determinación de la actividad proteolítica y cuantificación del contenido de proteínas

Para la **obtención del extractivo enzimático** se parte del látex presente en esta especie, cuya colecta se realiza mediante incisiones superficiales de los pecíolos de las hojas de *A. curassavica*, logrando de este modo, la exudación de un látex "lechoso" y de características semilíquidas. Se colecta en buffer cítrico-fosfato 0,1 M de pH 6,5 conteniendo 5 mM de EDTA y cisteína. El agregado de EDTA al medio se hace a fin de impedir la acción de las fenoloxidasas, que poseen Cu^{2+} en su centro activo. En el caso de cisteína, la misma se adiciona debido a que permite mantener el medio reductor evitando de este modo la oxidación de los sitios catalíticos de las proteasas.

La suspensión obtenida primeramente se centrifuga a 16,000 x g por espacio de 30 minutos a 4°C con la finalidad de descartar gomas y otros materiales insolubles presentes. Luego, el sobrenadante es ultracentrifugado a 100.000 g durante 1 h a 4°C. Dicho sobrenadante, resultante de la ultracentrifugación contiendo las proteínas solubles, se llama *extracto crudo* (EC). El mismo fue fraccionado y conservado, congelado a -20°C o bien liofilizado, hasta el momento de ser procesado para estudios posteriores.

Con el fin de verificar que el extracto obtenido precedentemente, posee actividad enzimática, se realizó el **ensayo de actividad proteolítica** utilizando caseína como sustrato. Dicho ensayo asegura que la muestra presenta actividad enzimática, lo cual otorga al extracto, la capacidad de ser potencialmente viable para ser utilizado en las experiencias que se llevan a cabo en el Laboratorio de Bromatología de la ciudad de San Luis.

Para este ensayo, la mezcla de reacción contiene 0,1 ml de extracto crudo y 1,1 ml de caseína con cisteína 12 mM en buffer Tris-HCl 0,1 M de pH 8,0. La reacción se lleva a cabo en baño termostático a 42°C, y se detiene 20 minutos después por la adición de 1,8 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5%. Cada tubo de ensayo luego fue

centrifugado a 3.000 x g durante 30 minutos y se midió la absorbancia del sobrenadante a 280 nm¹.

Para expresar la actividad enzimática se definió una unidad arbitraria a la que se llamó *unidad caseinolítica* (Ucas). Dicha unidad expresa la cantidad de proteasa que produce un incremento de una unidad de absorbancia por minuto en las condiciones del ensayo².

En cuanto a la **determinación del contenido de proteínas** también se utilizó, al igual que en las otras especies estudiadas, el método de Bradford³.

En particular en este periodo realicé los ensayos de actividad antihipertensiva, y dirigí a la Sta. Origone durante su pasantía en el Ciprove.

8.2. Estudios moleculares de proteínas de la especie *Silybum marianum* (Fam Asteraceae)

La especie *S. marianum*, posee péptidos que cumplen con la función de defensa. Estos péptidos se caracterizan por ser ricos en el aminoácido cisteína. Sus secuencias son variadas aunque poseen sitios conservados. De esta especie se clonó una *defensina* a partir de sus flores. Se realizó un modelado en 3D. Para alcanzar dicho objetivo, se aisló el ARN de flores inmaduras triturándolas en nitrógeno líquido. Así se obtuvo el cADN por retrotranscripción mediante PCR con primers específicos. La longitud total del ADN se generó a partir de 5´RACE-PCR (System for Rapid Amplification of cDNA Ends), utilizando para ello el molde de ARNm con su correspondiente cebador. El cDNA obtenido se purificó utilizando las columnas S.N.A.P (Invitrogen) Se realizó la adición de la cola homopolimérica TdT en el extremo 3´ del cDNA y se amplificó el cDNA utilizando un primer específico más interno en el extremo 5´ y otro que hibrida en la cola poli TdT (extremo 3´). Por último se realizó una PCR anillada para confirmar el producto de amplificación. Se obtuvo la secuencia completa de la defensina. Dicha secuencia (DefSm1) fue depositada en la base de datos GenBank con el número de acceso de: KT207793. Mediante análisis bioinformático y de homología se determinó que las proteasas de esta especie codifican para una proteína con un dominio defensina (con identidad de

¹ Constanza Liggieri, M. Cecilia Arribére, Sebastián A. Trejo, Francesc Canals, Francesc X. Avilés and Nora S. Priolo. 2004. "Purification and biochemical characterization of asclepain c I from the latex *Asclepias curassavica* L". *The Protein Journal*. Ed: Kluwer Academic Publishers. ISSN: 1572-3887. 23 (6):403-411.

² Priolo, N., Morcelle del Valle, S., Arribére, M.C., López, L.M.I., Caffini, N. (2000). "Isolation and characterization of a cysteine protease from the latex of *Araujia hortorum* fruits". *J. Protein Chem.* **19**: 39-49.

secuencia de 61% con la proteína específica de antera SF18 de *Helianthus annuus* y con un 50% con Art V1 *Artemisia vulgaris*), con actividad antimicrobiana. Con el servidor HHPred (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>) se realizó el *fold assignment*. El molde más adecuado para realizar el modelado por homología resultó ser Art v 1 de *Artemisia vulgaris*, con una identidad del 76% y un E-value de $3,1 \times 10^{-25}$. Utilizando el programa Modeller se construyeron 100 modelos, de los cuales se evaluó el valor de la función objetivo. A partir del análisis bioinformático realizado, pudo obtenerse un modelo tridimensional del dominio DefSm1D, que permitió corroborar el plegamiento característico de las defensinas vegetales como así también realizar el análisis estructura-función. El estudio de la predicción funcional (realizada empleando como input el modelo tridimensional obtenido) a través del servidor ProFunc (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/profunc/>) y los resultados del análisis secuencial utilizando el BLAST mostraron indicios que la función antimicrobiana del dominio DefSm1D sería específicamente antifúngica y no morfogénica. Este modelado permitió además, predecir su estructura, la cual posee tres puentes disulfuro presentando la estructura característica conocida como CS $\alpha\beta$. Posee también el motivo γ -core, con estructura de β hairpin, presente en todas las defensinas y prácticamente en todas las clases de antimicrobianos estabilizados por el aminoácido cisteína. Cabe aclarar que el modelado y los análisis bioinformáticos y de homología de la defensina fueron realizados por la Lic. Agustina Fernández (becaria doctoral de la Dra. Vairo Cavalli) y por Dra. Laura Colombo (becaria postdoctoral de la Dra. Vairo Cavalli), supervisados por su directora.

Por otro lado, se estudió y se analizó la localización subcelular de la peptidasa silpsina 2. Las peptidasas aspárticas típicas poseen dos regiones pre-pro en el extremo C-terminal (preproslipesinas) que poseen un inserto específico típico que se encuentra en plantas (PSI). Este inserto es el responsable del direccionamiento de la proteína hacia la vía secretoria de la célula. Para ello se partió de flores *S. marianum*, las cuales se trituraron en nitrógeno líquido obteniéndose de este modo el material de partida para el estudio. Se construyó el modelo del zimógeno a partir del programa de software Modeller v.914 basado en la estructura cristalina de la profitepsina de la cebada (PDB: 1QDM). Para investigar la localización subcelular se

³ Bradford, M. B. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

realizó una expresión transitoria con una proteína de fusión roja fluorescente (RFP) en la epidermis abaxial de hojas de *Nicotiana benthamiana* (tecnología Gateway. Vector pB7RWG2) empleándose para ello los clones de la especie *Agrobacterium tumefaciens* transformadas. Transcurridos tres días, la agroinfiltración fue monitoreada a través de diferentes cortes de hojas tratadas por microscopía confocal de escaneo láser (Leica DMI 6000 CS motorizado) con el objeto de observar la localización intracelular de estas proteínas. Los resultados confirmaron que estas proteínas se encuentran en la vacuola vegetal. Del mismo modo que en el caso de la defensina, el modelado del zimógeno fue realizado por la Lic. Agustina Fernández y por Dra. Laura Colombo), supervisadas por su directora, la Dra. Vairo Cavalli.

8.3. Clonación y secuenciamiento de una proteasa cisteínica de la especie *Bromelia hieronymi* (Bromeliaceae)

Los frutos de esta especie poseen cantidades considerables de proteasas cisteínicas con potenciales usos en las industrias farmacéutica y alimenticia. Para llevar a cabo la clonación y el posterior secuenciamiento se tomó como material de partida frutos inmaduros que fueron triturados en presencia de nitrógeno líquido. Se extrajo el ARN total a partir de 0,2 gr del resultado de esta trituración. Se amplificó por retrotranscripción el cDNA empleando primers específicos. Posteriormente los productos fueron analizados por electroforesis de agarosa al 1% (Fig. 1). Se seleccionaron las bandas de cDNA y se purificaron y se ligaron dentro del vector pGEM-T Easy. Luego se transformaron en células competentes de *Escherichia coli* (XL1-Blue). Se obtuvieron las secuencias consenso conteniendo 989 pb. Las primeras 687 pb codifican para una cadena polipeptídica hipotética de la peptidasa madura conformada por 229 aminoácidos (Bh-CP2). Esta secuencia posee el 93% de identidad con la Bh-CP1, la cual es otra peptidasa de esta especie. Presentan un porcentaje de homología del 80% con las peptidasas de la especie *Ananas comosus* (dato no mostrado). Esto confirma la presencia de residuos altamente conservados que forman el sitio catalítico que incluye seis residuos de cisteína que forman puentes disulfuros.

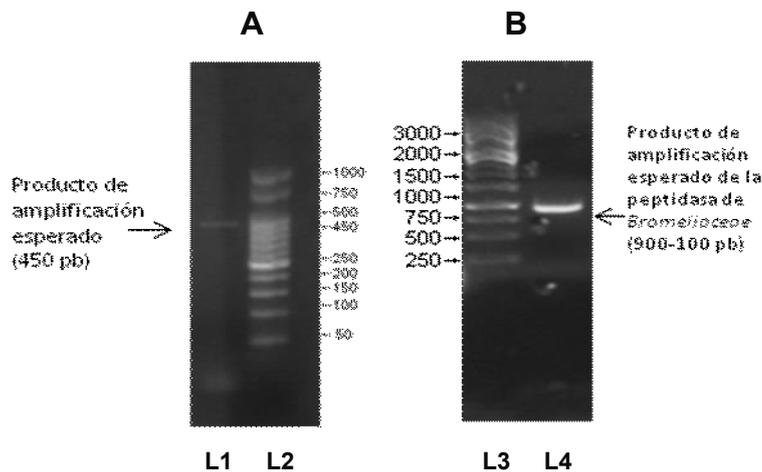


Figura 1. Electroforesis de agarosa al 1%. A Verificación de la extracción de ARN realizando una reacción de PCR usando cebadores de actina (A3 y A4, *Nicotiana tabacum*). Línea 1 (L1): Extracto de ARN; Línea 2 (L2): marcadores moleculares: ADN Ladder 50 pb precisión. B. RT-PCR específica. Los productos se obtuvieron usando cebador Nt-H1 (para secuencias N-terminales de la peptidasa de *Bromelia hieronymi*). Línea 3: Patrones de ADN (Gene Ruler 1kb DNA Ladder, Thermo Scientific); Línea 4 (L4): producto de amplificación purificado.

Este estudio es el primer paso para expresar esta enzima, que es un prometedor biocatalizador para procesos industriales.

8.4. Actividades biológicas en hidrolizados de soja empleando las especies *Bromelia hieronymi* (Bromeliaceae) y *Asclepias curassavica* (Asclepiadaceae)

Las proteasas de las especies *B. hieronymi* y *A. curassavica* fueron empleadas para preparar hidrolizados a partir de la soja como sustrato proteico. La semilla de esta especie contiene diversas proteínas que presentan, encriptados en sus secuencias, péptidos bioactivos antioxidantes, que pueden ser liberados mediante hidrólisis enzimática *in vitro*.

Para ello se partió de 5 gr harina desgrasada de soja los cuales se colocaron en 50 ml de agua destilada ajustándose el pH a a 8,0 con NaOH 2N y se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 12800g durante 15 min a 20 °C y se descartó el precipitado. El sobrenadante obtenido se llevó a pH 4,5 con HCl 2N. Luego de un segundo paso de centrifugación, se obtuvo un precipitado que fue redisoluto en 10 ml de agua destilada y llevado a pH 8,0. Se determinó el contenido de proteínas de este sustrato mediante el método de Bradford³ arrojando un valor de $5,16 \pm 0,07$ mg proteínas/ml, previa dilución del mismo 1/10.

Una vez obtenido el aislado proteico de soja para utilizarlo en los ensayos de hidrólisis, se procedió a preparar los extractos enzimáticos de *B. hieronymi* y de *A. curassavica*. En el primer caso se trituraron frutos en buffer fosfatos 0,1 M, pH 6;

y en el segundo se realizaron incisiones superficiales de tallos para colectar el látex sobre buffer cítrico- fosfato 0,1 M, pH 6,5, EDTA 5 mM y cisteína 5 mM. Ambos homogenatos fueron centrifugados a 10000 rpm por espacio de 1 h a 4°C. El sobrenadante de cada uno se denominó extracto crudo de *B. hieronymi* (ECbh) y del mismo modo para *A. curassavica* (ECac). Para cada uno de los extractos se evaluó el contenido de proteínas y la actividad caseinolítica siendo $872,7 \pm 55,2$ $\mu\text{g/ml}$ y $7,87 \pm 0,55$ Ucas/ml⁴; y, $25,8 \pm 1,8$ $\mu\text{g/ml}$ y $0,45 \pm 0,05$ $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

Los ensayos de hidrólisis empleando las proteasas de las especies vegetales se llevaron a cabo en un baño a 45°C, con una relación enzima-sustrato: *A. curassavica* 2:8; *B. hieronymi* de 1:9. En ambos casos los tiempos de hidrólisis: 10' 30' 60' 90' 180' y se detuvo la reacción a ebullición durante siete minutos.

Luego se realizaron ensayos de caracterización de los hidrolizados que consistieron en analizar su perfil proteico por medio de una electroforesis (SDS-PAGE) (Fig. 2), determinar la actividad antioxidante (Método ABTS⁵) (Fig. 3), evaluar el grado de hidrólisis (Método TNBS⁶) (Tabla 1) y detectar actividad antihipertensiva (inhibición de la ECA⁷) (Fig. 4). En éste último ensayo los hidrolizados fueron filtrados con membrana de 3 kDa.

⁴ Constanza Liggieri, M. Cecilia Arribére, Sebastián A. Trejo, Francesc Canals, Francesc X. Avilés and Nora S. Priolo. 2004. "Purification and biochemical characterization of asclepain c I from the latex *Asclepias curassavica* L". *The Protein Journal*. Ed: Kluwer Academic Publishers. ISSN: 1572-3887. 23 (6):403-411.

⁵ Peña-Ramos E.A. & Xiong Y.L. (2001) "Antioxidative activity of whey protein hydrolysates in a liposomal system" *Journal of Dairy Science*, **84**:2577-2583.

⁶ Adler-Nissen, J. (1979). "Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid". *Journal of agricultural and food chemistry*, 27(6), 1256-62.

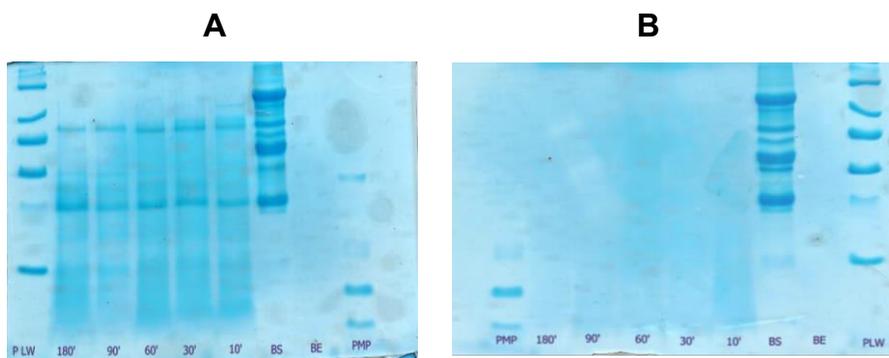
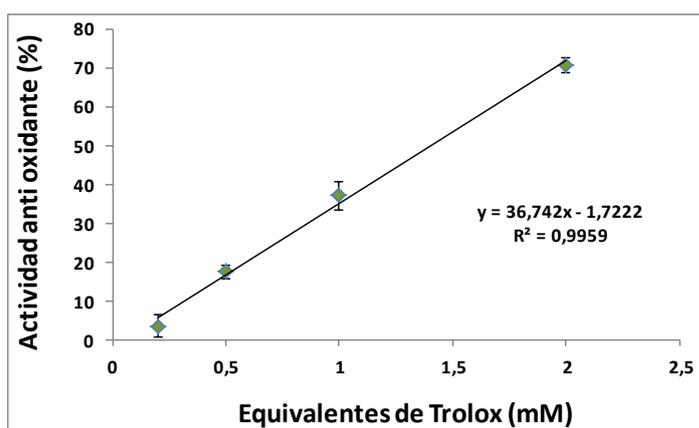


Figura 2: SDS-PAGE en geles de Tricina. **A:** *A. curassavica* (ECAc); **B:** *B. hieronymi* (ECBh); PLW: patrones de bajo peso molecular (GE: 97, 66, 45, 30, 20, 14.7 kDa); BE: soja sin hidrolizar; 10', 30', 60', 90' y 180': tiempos de hidrólisis; PMP: Patrones polipeptídicos (BioRad: 26.6, 17, 14.4, 6.5, 3.5, 1.4).

Los datos aportados por estos experimentos permiten concluir que los perfiles peptídicos de los productos analizados por SDS-PAGE mostraron que ECac degrada las bandas principales, persistiendo dos (18 y 38 kDa), mientras que ECBh presentó una total degradación de las proteínas (Fig. 2B).



	Actividad antioxidante (Mm Trolox)
ECAc 180'	1,68 ± 0,02
ECBh 60'	1,3 ± 0,21

Figura 3. Actividad antioxidante de los hidrolizados de ECAc 180 min y ECBh 60 minutos

La actividad antioxidante de los hidrolizados fue de $1,68 \pm 0,02$ mM de Trolox para el hidrolizado de 180 min de ECAc y de $1,30 \pm 0,21$ mM de trolox para el hidrolizado de 60 min de ECBh.

En la tabla 1 se puede observar los datos del grado de hidrólisis de las muestras ensayadas. El grado de hidrólisis a los 180 min fue de $25,1 \pm 3,4$ % (ECAc) y de $38,9 \pm 1,6$ % (ECBh). El ensayo de grado de hidrólisis se llevó a cabo en todos los hidrolizados empleando las especies, los sustratos y los diferentes

⁷ Carmona, Schwager, Juliano, Juliano, & Sturrock, 2006. "A continuous fluorescence resonance energy transfer angiotensin I-converting enzyme assay". *Nature protocols*, 1(4): 1971-6. doi:10.1038/nprot.2006.306.

tiempos de reacción. Los datos que arrojó el mismo llevaron a seleccionar el hidrolizado de ECbh 60 min (menor tiempo de hidrólisis) y el correspondiente a ECAc 180 min (mayor tiempo de hidrólisis) para trabajar con grados de hidrólisis similares.

	Grado de hidrólisis (%) 60'	Grado de hidrólisis (%) 180'
ECAc	24,1 ± 0,7	25,1 ± 3,4
ECBh	33,9 ± 2,6	38,9 ± 1,6

Tabla 1. Grado de hidrólisis de los hidrolizados de ECAc 180 min y ECBh 60 minutos

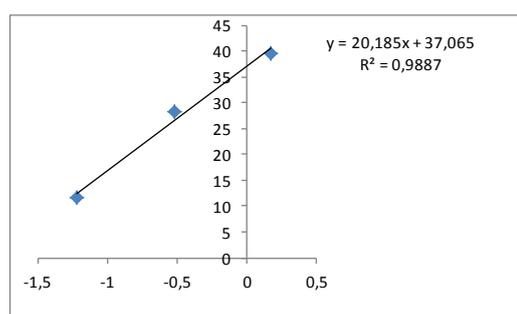


Figura 4. Actividad antihipertensiva. Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I: ECA $IC_{50} = 1,9$ mg/ml para el hidrolizado obtenido con Ecac

No se detectó actividad antihipertensiva para el hidrolizado de ECBh, mientras que el ECAc presentó actividad antihipertensiva con un valor de IC_{50} de 1,9 mg/ml. Por todo ello, sería promisorio el empleo de estos hidrolizados de soja en la obtención de alimentos funcionales, por la presencia de péptidos con actividad antioxidante e inhibitoria de la ECA.

8.5. Hidrolizados de proteínas de leche de cabra empleando las peptidasas de *Bromelia hieronymi* (Bromeliaceae)

Los objetivos de este trabajo fueron: a) emplear las preparaciones proteolíticas obtenidas de los frutos de *B. hieronymi* para ensayar pruebas de

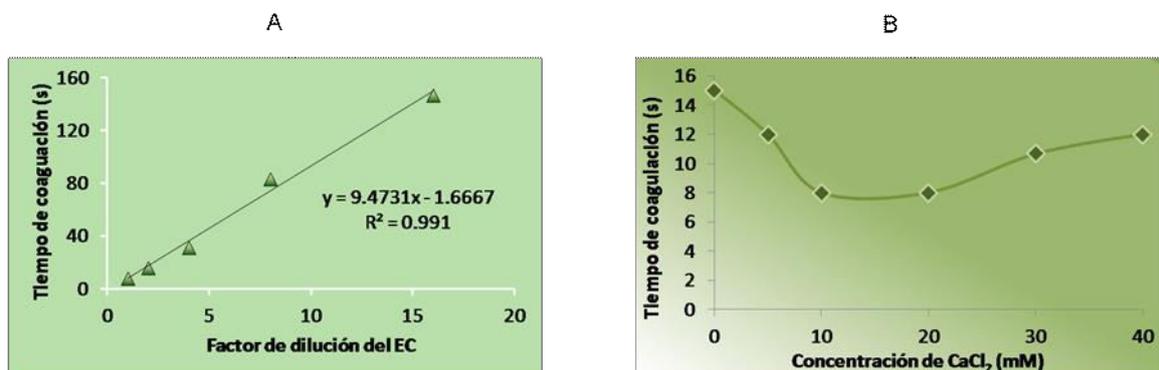
coagulación en leche de cabra y b) obtener hidrolizados de caseinato y de las proteínas contenidas en el lactosuero.

A partir de los frutos de esta especie se preparó un extracto crudo en buffer fosfato de sodio 0,1M (pH 6,0, cisteína y EDTA 5mM). Seguidamente se procedió a preparar tres extractos parcialmente purificados mediante distintas metodologías: precipitación etanólica (Eet), filtración por una membrana de 3KDa (E3) y cromatografía de exclusión molecular (Eem). De las tres extracciones, la que resultó mejor fue aquella que se filtró (Tabla 2).

muestra	Concentración de proteínas (mg/ml)	Act. caseinolítica (Ucas/ml)	Act. Antioxidante (mM Trolox)
EC	0,59 ± 0,00	9,4 ± 0,2	0,67 ± 0,01
Eet	0,45 ± 0,02	7,8 ± 0,6	0,68 ± 0,05
Eem	0,13 ± 0,02	3,8 ± 0,9	No detectable
E3	0,51 ± 0,03	8,9 ± 1,2	0,69 ± 0,03

Tabla 2. Caracterización de los diferentes extractos obtenidos

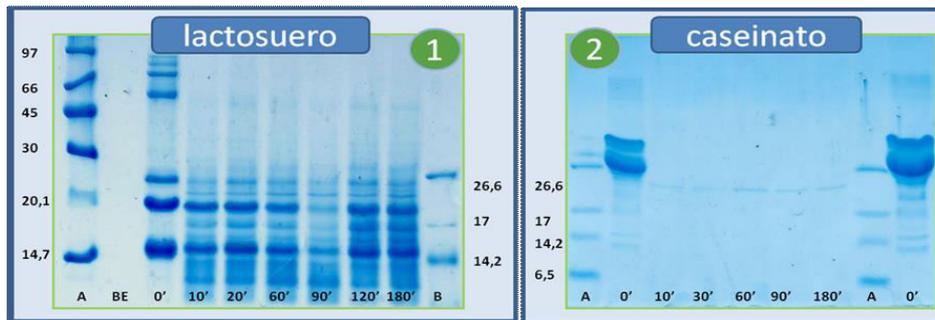
A este extracto parcialmente purificado se lo caracterizó con los siguientes ensayos: determinación de la concentración proteica (método de Bradford³), la actividad proteolítica y la actividad antioxidante (método del ABTS⁵). Con el extracto crudo inicial se realizaron ensayos de coagulación de la leche de cabra. La reacción se llevó a cabo a 37 °C de temperatura siendo el tiempo de coagulación, en presencia de CaCl₂ 20 mM de 8 segundos (Fig. 5 A y B).



Ensayos de coagulación. A: Ensayo de coagulación de la leche de cabra en función del factor de dilución del extracto crudo (EC). B: A. Ensayo de coagulación de la leche de cabra en función del factor de dilución del extracto crudo (EC). A. Ensayo de coagulación de la leche de cabra en función del factor de dilución del extracto crudo (EC).

Figura 5. Ensayos de coagulación

Además se prepararon caseinatos hidrolizados de proteínas del lactosuero de cabra a 45° C. Se realizó una electroforesis (SDS-PAGE de Tricina Fig. 6) que mostró un patrón característico de degradación de las principales fracciones proteicas, alcanzando un grado máximo de hidrólisis a los 180 minutos de reacción ($28,8 \pm 10,1\%$ para proteínas de suero y $42,2 \pm 7,0\%$ para caseinato, respectivamente) Fig. 7.



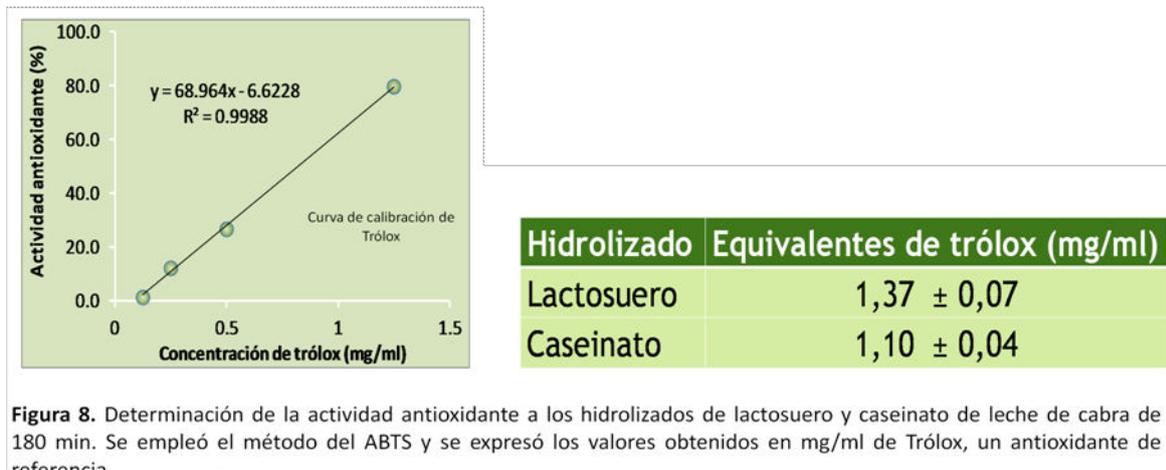
SDS-PAGE en geles de Tricina. ① Hidrolizado de lactosuero de cabra. ② Hidrolizado de caseinato de cabra. A: patrones polipeptídicos (BioRad: 26.6, 17, 14.4, 6.5, 3.5, 1.4); BE: blanco de enzima; B, patrones de bajo peso molecular (GE: 97, 66, 45, 30, 20.1, 4.7 kDa); tiempos de hidrólisis: 0', 10', 30', 60', 90', 120' y 180'.

Figura 6. SDS-PAGE

Grado de hidrólisis porcentual (método del TNBS)		
Tiempo de hidrólisis	Hidrolizado de lactosuero caprino	Hidrolizado de caseinato caprino
10	$4,2 \pm 2,4$	$17,3 \pm 1,6$
30	$13,7 \pm 15,1$	$29,5 \pm 4,7$
60	$15,1 \pm 5,3$	$35,1 \pm 4,1$
90	$22,8 \pm 2,3$	$36,8 \pm 3,7$
180	$28,8 \pm 10,1$	$42,2 \pm 7,0$

Figura 7. Determinación del grado de hidrólisis

En cuanto al ensayo de la actividad antioxidante luego de 180 minutos de reacción de hidrólisis, los resultados fueron de $1,37 \pm 0,07$ y $1,10 \pm 0,04$ de Trolox para ml / ml de hidrolizados de suero y caseinato, respectivamente (Fig. 8).



Los datos obtenidos de este estudio llevan a predecir que el sistema proteolítico de *B. hieronymi* podría ser utilizado en la fabricación de quesos de cabra y en la preparación de hidrolizados de proteínas de leche de cabra con potencial actividad antioxidante.

8.6. Colaboración en ensayos de laboratorio para el grupo de trabajo que dirige la Dra. Sandra Vairo Cavalli

Dicha colaboración la he estado prestando desde el año 2014 y continúo en la actualidad.

La temática de este grupo apunta principalmente a la clonación y expresión de proteasas aspárticas de *Silybum marianun*, *Arctium minus* y cisteínicas de *Bromelia hieronymi*.

Sin embargo, actualmente el equipo de investigación está explorando el campo de la elaboración de miniquesos a partir de la coagulación de la leche empleando este tipo de proteasas. A modo de una breve introducción a este tema, se puede mencionar que, en la industria láctea, para la elaboración de queso se utiliza la quimosina o renina comerciales (ambas de tipo aspártico) que producen la coagulación de la leche. Estas enzimas hidrolizan la caseína, la cual forma la cuajada o cuajo al desnaturalizarse y precipitar, y constituye el primer paso para la fabricación del queso. Debido a que la directora del equipo siempre ha trabajado con extractivos vegetales conteniendo este tipo de proteasas, durante este periodo se está ensayando las proteasas aspárticas obtenidas de las flores de *Silybum marianum* con el fin de emplearlas como potenciales sustitutos de quimosina en la preparación de los quesos.

En la siguiente lista se mencionan algunas de las técnicas de laboratorio que he realizado para este grupo de trabajo:

- Purificación cromatográfica de *Silybum marianum* (exclusión molecular, intercambio iónico).
- Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) discontinua en condiciones reductoras y electroforesis de Tricina.
- Western blot.
- Preparación de diferentes medios de cultivo.
- Preparación de reactivos
- Crecimiento y mantenimiento de cultivos bacterianos.
- Preparación de células competentes.
- Transformación por shock térmico de las bacterias competentes químicas.
- Extracción de ADN plasmídico de bacterias por lisis alcalina o por empleo del kit comercial *AccuPrep Plasmid MiniPrep DNA Extraction Kit* (Bioneer).
- Extracciones de ARN total de las especies estudiadas.
- Actividad coagulante de leche empleando las proteasas aspárticas *Silybum marianum*.
- Electroforesis de Tricina al 16 %.

9. OTRAS ACTIVIDADES

9.1. PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

9.1.1. Colombo, María Laura, **Liggieri Constanza**, Vairo Cavalli, Sandra. "Peptidasas aspárticas de flores de *Asteraceae* con potencial aplicación biotecnológica" *Rev. Farm.* Volumen 158 (2016). ISSN 0034-9496.

9.1.2. María Alicia Corrons, **Constanza Silvina Liggieri**, Sebastián Alejandro Trejo, Mariela Anahí Bruno. "ACE-inhibitory peptides from bovine caseins released with peptidases from *Maclura pomifera latex*". *Food Research International* 93 (2017). 8-15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.01.003>. ISSN 0963-9969.

9.2. PUBLICACIONES DE ABSTRACTS CON REFERATO

9.2.1. *Biocell*. Cloning and sequencing of e new cisteinpeptidase from fruits of *Bromelia hieronymi* MEZ. Colombo ML, **Liggieri CS**, Fernández A, Vairo Cavalli SE, Bruno MA. "Cloning and sequencing of e new cisteinpeptidase from fruits of *Bromelia hieronymi* MEZ". Córdoba. Argentina. 7-10 de noviembre de 2016. ISSN 0327-9545 (Impreso). ISSN 1467-5744. (Electrónico). Vol 40 (Supl.1). 2016.

9.2.2. *Biocell*. Molecular analysis and subcellular localization molecular analysis and subcellular localizatiós of peptidase Silpepsin 2 from *Silybum marianum*. Colombo ML, Fernández A, **Liggieri CS**, Tornero P, Vairo Cavalli SE. Córdoba. Argentina. 7-10 de noviembre de 2016. ISSN 0327-9545 (Impreso). ISSN 1467-5744. (Electrónico). Vol 40 (Supl.1). 2016.

9.3. MANUSCRITO ENVIADO PARA SU EVALUACIÓN PARA SER PUBLICADO EN EL JOURNAL OF BIOTECHENOLOGY

Origone, A.; Bersi, G.; Illanes, A.; Sturnuolo, H. ; Liggieri, C.; Ardanaz, C.;Guzmán, F.; Barberis, S. "Enzymatic and chemical synthesis of new anticoagulant peptides". Número de Manuscrito: BIOTEC-D-17-00445.

9.4 COMUNICACIONES A REUNIONES CIENTIFICAS/TECNOLOGICAS

9.4.1. Garay V, López Fino C, Bruno M, **Liggieri C**. "Búsqueda de actividades biológicas en hidrolizados de soja empleando peptidasas de *Asclepias curassacica* (Asclepiadaceae) y *Bromelia hieronymi* (Bromeliaceae)". **VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos 2016**. Córdoba. Argentina. 2,3 y 4 de noviembre de 2016.

9.4.2. López Fino C, Garay V, **Liggieri C**, Bruno M. "Utilización de peptidasas de *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae) sobre proteínas de leche de cabra". **VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos 2016**. Córdoba. Argentina. 2,3 y 4 de noviembre de 2016.

9.4.3. Colombo ML, **Liggieri CS**, Fernández A, Vairo Cavalli SE, Bruno MA. "Cloning and sequencing of e new cisteinpeptidase from fruits of *Bromelia hieronymi* MEZ". **SAIB - 52th Annual Meeting Argentine Society for Biochemistry and Molecular Biology LII Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación**

en Bioquímica y Biología Molecular. Córdoba. Argentina. 7-10 de noviembre de 2016.

- 9.4.4. Colombo ML, Fernández A, **Liggieri CS**, Tornero P, Vairo Cavalli SE. "Molecular analysis and subcellular localization molecular analysis and subcellular localizations of peptidase Silpepsin 2 from *Silybum marianum*". **SAIB - 52th Annual Meeting Argentine Society for Biochemistry and Molecular Biology LII Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular.** Córdoba. Argentina. 7-10 de noviembre de 2016.
- 9.4.5. Fernandez, Agustina; Colombo, Maria Laura; **Liggieri, Constanza**; Bakás, Laura; Vairo Cavalli, Sandra. "Gene organization and bioinformatic analyses of DefSm1D, a defensin-like protein domain from flowers of *Silybum marianum*". **III Latin American Federation of Biophysical Societies (LAFeBS) IX IberoAmerican Congress of Biophysics XLV Reunion Anual SAB 2016.** San Miguel de Tucumán. Argentina. 23 al 25 de noviembre de 2016.
- 9.4.6. Constanza Liggieri. III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de la Provincia de Buenos Aires. "**Ciencia y Tecnología para el Desarrollo**". Organizado por la Comisión de Investigaciones Científicas de la Prov. De Buenos Aires (CICPBA). 1º de Septiembre de 2016. Participación en calidad de Asistente.
- 9.4.7. Viana, C.A., Oliveira, J.P.B., **Liggieri, C.S.**, Cavalli, S.E.V., Freitas, C.D.T., Bruno, M.A. Ramos, M.V. "Bioactive Peptides Derivade from casein hydrolysis by latex proteases". **XIII Regional Nordeste da SBBq. 6th International Symposium in Biochemistry of Macromolecules and Biotechnology.** Fortaleza, CE. 27 a 30 de Noviembre de 2016.

10. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO.

CARGO: Jefe de Trabajos Prácticos

Para el dictado de la asignatura Biología, se continuó con la modalidad implementada en el año 2012, tal como fue informado en los periodos anteriores. La *clase taller* fue la modalidad adoptada en la cátedra para que se lleven a cabo los procesos de enseñanza y aprendizaje con el objeto que los alumnos alcancen el conocimiento significativo crítico. El fundamento de esta modalidad es principalmente, la construcción de conocimiento a partir de las ideas previas que cada uno de los alumnos puede aportar a la discusión global de los contenidos curriculares. El disparador de cada clase fue un texto de trabajo o consigna sobre los contenidos correspondientes a cada

clase en particular. Los docentes, a cargo de la misma, desarrollaron más profundamente los contenidos conceptuales a lo largo de las horas de discusión. En cuanto a la *Evaluación* se mantuvo un esquema de dos evaluaciones parciales, correspondientes a dos partes de la cursada. El contenido y modalidad de las evaluaciones fueron acordes a la modalidad de ejercitación y discusión de conceptos realizados durante las clases.

11. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES.

11.1. DICTADO DE CURSO

“Estrategias de la Purificación de Proteínas Vegetales”. Teórico-Práctico. Directora del Curso: Dra. Susana Morcelle del Valle. Organizado por el Centro de Investigación de Proteínas Vegetales (CIPROVE) de la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP). Válido para la Carrera del Doctorado. 31 de octubre al 7 de noviembre de 2016. Expte. 700-002209/000. Resolución nro. 2832. Válido por 5 años (fecha de aprobación 09/12/14).

11.2. CO-DIRECCIÓN DE PASANTES DE LABORATORIO

Anabella Origone. Becaria Doctoral (CONICET) residente en la ciudad de San Luis, Argentina. La pasantía en el CIPROVE se desarrolló durante el periodo comprendido entre el 26 de junio y el 7 de julio del año 2017 (90 horas). Como parte de su plan de tesis doctoral (“Síntesis de péptidos antihipertensivos, utilizando fitoproteasas autóctonas inmovilizadas”) se ha entrenado en la realización de diferentes actividades que se enumeran a continuación: preparación de extractos proteolíticos a partir del látex del tallo de *Asclepias curassavica*; determinación de la concentración de proteínas, determinación de la actividad enzimática sobre caseína, ensayos de actividad antihipertensiva de los péptidos sintetizados tanto enzimáticamente como químicamente mediante la determinación de la actividad inhibitoria de la ECA (Enzima Convertidora de la Angiotensina I) y purificación de la peptidasa de interés por técnicas cromatográficas, empleando un cromatógrafo Äkta Purifier.

11.3. MIEMBRO DE COMISIONES ASESORAS PARA EVALUAR TRABAJOS FINALES DE LA CARRERA DE ESPECIALIZACIÓN EN DOCENCIA EN SALUD Y ALIMENTACIÓN (RES C.S. 092/13 UNER).

Integrante del Jurado para evaluar el Trabajo Final Integrador de la Carrera de Especialización en Docencia en Salud y Alimentación de la Licenciada Elda Cecilia TRIGO.

Título del Trabajo Final: “El mapa conceptual (MC) y otras formas de esquematizar (OFE) como instrumento de evaluación en la universidad frente a las preguntas de opción múltiple (POM)”. Experiencias en la cátedra de Anatomía y Fisiología de la Carrera de Licenciatura en Nutrición. Facultad de Bromatología. Universidad de Entre Ríos. Argentina. Resolución CD 055/16. 1/4/2016.

11.4. MIEMBRO DE COMISIONES ASESORAS PARA EVALUAR PROYECTOS DE EXTENSIÓN DE LA UNLP.

Convocatoria 2016

11.4.1. Área temática: Ambiente, Urbanismo y Patrimonio

Proyecto: El Ambiente, mi barrio, mi escuela

Directora: Verónica Mariana SOSIO,

11.4.2. Área temática: Ambiente, Urbanismo y Patrimonio

Proyecto: APORTES A LA CONSOLIDACIÓN SOCIAL, URBANA Y ARQUITECTÓNICA

Director: Nora Ponce

11.4.3. Área temática: Ambiente, Urbanismo y Patrimonio

Proyecto: OFIDIOS Y LA POBLACION RURAL.

Director: Marcela Sandra Leipus

11.4.4. Área temática: Ambiente, Urbanismo y Patrimonio

Proyecto: PROFESIONALES EN LOS BARRIOS. Talleres barriales por un hábitat digno III en el Gran La Plata

Director: Ariel Emilio Frattasi

11.5. FINALIZACIÓN DE LA CARRERA DE ESPECIALIZACIÓN EN DOCENCIA UNIVERSITARIA

Título de Especialización: Especialista en Docencia Universitaria

Director: Dra. Laura Bakás

Co-Director: Mg. Mónica Paso

Título: “Planificación de la implementación de estrategias de enseñanza innovadoras de los contenidos curriculares de la asignatura Biología perteneciente al tercer y cuarto cuatrimestre del Ciclo Básico”

Fecha: 11 de julio de 2017

Calificación: siete (7)

Aclaración: La probanza correspondiente a este punto y que adjunto, es el Dictamen de la Comisión Evaluadora. Sólo ha sido firmado por uno de los jurados. La Secretaría de la Carrera se comprometió a enviarme vía mail este dictamen nuevamente cuando esté firmado por los dos jurados restantes. Al momento de la presentación del presente Informe no ha llegado aún el mail.

11.6. SUBSIDIOS RECIBIDOS O EN EJECUCIÓN EN EL PERIODO.

Título

“Optimización de la obtención de proteínas vegetales con potencial acción biotecnológica y biomédica”

Directora: Dra. Mariela Bruno. Co-Directora: **Dra. Constanza Liggieri.**

Código X-746.

11.7. GESTIÓN ADMINISTRATIVA Y CONTABLE DEL CIPROVE

Responsable de la gestión administrativa y contable del Ciprove (Centro de Investigación de Proteínas Vegetales), incluyendo la confección y traslado de los formularios de orden de provisión de fondos a la administradora de los PICTs otorgados para el Laboratorio, rendición de subsidios, de servicios a terceros, manejo de fondos y realización de operaciones bancarias asistida por el Director del Centro, entre otras. Actividad desarrollada desde marzo de 2006 y actualmente en ejecución.