



CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO

Informe Científico¹

PERIODO ²: 2005-2006

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: Universidad Nacional de La Plata

Dirección Particular: 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 2006 deberá informar sobre la actividad del periodo 1-1-2004 al 31-12-2005.



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 de ensayar su posible aplicación en ciertos procesos industriales tales como el tratamiento de cueros, el reemplazo del cuajo vacuno en la producción de quesos y la síntesis enzimática de péptidos bioactivos, entre otros. 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 becarios y tesis de la UNLP y de otras Universidades, tanto del país como del exterior y la oferta de cursos 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 CICIPBA, dos investigadores de CONICET, dos docentes con dedicación exclusiva y uno con semidedicación, cuatro becarios doctorales de CONICET, un becario posdoctoral y otro doctoral de la UNLP y uno de la ANPCyT, dos becarios de entrenamiento de CICIPBA y tres estudiantes avanzados de Biotecnología, lo que hace un total de veinte personas afectadas en distinto grado a tareas de investigación. Se han finalizado cinco tesis doctorales (una en el exterior) y se encuentran en distintas etapas de desarrollo otras cinco.

En cuanto a la producción científica individual, en el período se han publicado o se encuentran en prensa seis (6) trabajos en revistas internacionales con referato y se han presentado once (11) comunicaciones en distintos congresos nacionales e internacionales. En relación a la cooperación internacional, el suscripto es Coordinador del Proyecto CYTED IV.22 ("Aplicación industrial de enzimas proteolíticas de vegetales superiores"), que involucra además a otros dos grupos del país, dos de España, dos de Cuba y uno de cada uno de los siguientes países: Brasil, Chile, Colombia, Ecuador, México, Portugal y Uruguay, que ha dado lugar a una intensa relación y que tuvo su correlato en una efectiva formación de recursos humanos.

En lo personal, la formación de recursos humanos estuvo representada por la dirección de seis becarios y de un Profesional Asistente de CICIPBA, además de la defensa de una tesis doctoral y la continuación de la dirección de otra. A través del Programa CYTED se atendieron dos pasantes de la Universidad de La Habana, uno de la Universidad de la República de Uruguay una de Bolivia y una de la Universidad Nacional de San Luis. Finalmente, la vinculación con el medio productivo se ha concretado a través de un convenio con la Cooperativa Telefónica de General San Martín, de la Provincia de Jujuy, para el desarrollo de un proceso de obtención de papaína hidrosoluble a partir de látex de mamón (*Carica papaya* L), así como 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.

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.

- 7.2** Bruno, M. A., S.A. Trejo, X.F. Avilés, N.O. Caffini and L.M.I. López (2006). "Isolation and characterization of Hieronymain II, another peptidase isolated from fruits of Bromelia hieronymi Mez. The Protein Journal. 25: 224-231.
- 7.3** From unripe fruits of Bromelia hieronymi Mez (Bromeliaceae), a partially purified protease preparation was obtained by acetone fractionation of the crude extract. Purification was achieved by anionic exchange chromatography (FPLC) on Q-Sepharose HP followed by cationic exchange chromatography (SP-Sepharose HP). Homogeneity of the new enzyme, named hieronymain II, was confirmed by SDS-PAGE and mass spectroscopy (MALDI-TOF). The molecular mass of was 23,411 Da, and maximum proteolytic activity (more than 90% of maximum activity) was achieved at pH 7.5–9.0 on casein and at pH 7.3–8.3 on Z-Phe-Arg-p-nitroanilide. The enzyme was completely inhibited by E-64 and iodoacetic acid and activated by the addition of cysteine. The N-terminal sequence of hieronymain II (AVPQSIDWRVYGAV) was compared with those of 12 plant cysteine proteases which showed more than 70% of identity. Kinetic enzymatic assays were made on Z-Phe-Arg-p-nitroanilide ($K_m \frac{1}{4} 0:72\text{mM}$; $k_{cat} \frac{1}{4} 1:82 \text{ seg}_{-1}$; $k_{cat}/K_m \frac{1}{4} 2:54 \text{ seg}_{-1} \text{ mM}_{-1}$). No detectable activity could be found on PFLNA or Z-Arg-Arg-p-nitroanilide.
- 7.4** Morcelle, S.R., S. Barberis, N. Priolo, N.O. Caffini & P. Clapés (2006) "Comparative behaviour of proteinases from the latex of Carica papaya and Funastrum clausum as catalysts for the synthesis of Z-Ala-Phe-Ome", Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 41: 117–124.
- 7.5** The proteolytic extract obtained from the latex of Funastrum clausum (Jacq.) Schlechter (Asclepiadaceae), a South American climbing plant, was assayed as a novel catalyst for peptide synthesis and compared with commercial papain under the same conditions. After immobilization on polyamide, the synthesis of the bitter peptide precursor Z-Ala-Phe-OME was performed and different conditions were tried. Acetonitrile and ethyl acetate with low water content were tested as organic solvents. Equilibrium- and kinetically-controlled synthesis were tried by using either Z-Ala-OH or Z-Ala-OME as acyl donors, respectively. The best conditions for the synthesis of the desired product varied according to the catalyst used. For papain, thermodynamic control in acetonitrile ($aw \sim 0.12$) in the presence of triethylamine (TEA) or boric acid–borate buffer (40 mM), and equilibrium- and kinetic-controlled synthesis in ethyl acetate ($aw \sim 0.75$) proved to be the best conditions. The thermodynamic control in either acetonitrile with $aw \sim 0.12$ (40mM TEA or Na_2CO_3) or ethyl acetate ($aw \sim 0.75$) were the best conditions found for funastrain. In all cases, the formation of oligopeptides up to three Phe was observed. The proteolytic extract of F. clausum latex showed more selectivity than papain towards the conversion to Z-Ala-Phe-OME leading to less proportion of oligopeptides.
- 7.6** Obregón, W.D., Curciarello, R., Caffini, N.O. and Priolo, N.S. (2006) "Hidrolitic Profile and isolation of the Proteolytic Components of Latex from Araujia angustifolia Fruits", Acta Farm. Bonaerense 25: 206-12.
- 7.7** The presence of hydrolases in the latex of Araujia angustifolia (Asclepiadaceae), a climbing plant that grows in Argentina, has been studied. The crude extract (CE) obtained by differential centrifugation at 8000 and 15000 rpm of latex from A. angustifolia fruits, collected on 0.05 M citric-citrate buffer (pH 4.5) with 5 mM EDTA,



exhibited several enzymatic activities. CE showed amygdasic activity on L-pyroglutamyl-L-phenylalanyl-L-leucine-p-nitroanilide (PFLNA), proteolytic activity on 1% casein in Tris-HCl pH 8.5, polygalacturonidase activity using 1 % polygalacturonic acid in acetic acetate buffer pH 4.5, pectin methyl esterase on 1% pectin in citric phosphate pH 6.8 in the presence of 0.02M Cl₂Ca, and endosterolytic activity on p-nitrophenyl esters of N- α -carbobenzoxy-L-amino acids in 0.1 M Tris-HCl buffer pH 8.0. As proteolytic activity was the main hydrolytic activity observed, the proteolytic properties of CE were established. The proteases present in CE showed the characteristics of the cysteine proteases: optimum pH at alkaline range, isoelectric point (pI) higher than 8.0, and inhibition of activity by thiol blocking reagents, such as E-64 and iodoacetate. A remarkable thermal stability was also evident in the CE. Three proteases have been detected by IEF and zymogram in the CE and purified by FPLC affording three basic active fractions (araujain al, all and alll) with molecular masses about 23 kDa (SDS-PAGE).

7.8 Abreu Payrol, J., Obregón, W.D., Natalucci, C.L. & Caffini, N.O. (2005) "Reinvestigation of the proteolytically active components of Bromelia pinguin fruit ". *Fitoterapia*. 76: 540-548.

7.9 Pinguinain is the name given to a proteolytic enzyme preparation obtained from Bromelia pinguin fruits that has been scarcely studied. The present paper deals on the reexamination of the proteases present in fruits of B. pinguin grown in Cienfuegos, Cuba. The preparation (partially purified pinguinain, PPP) showed the main characteristics of the cysteine proteases, i.e., optimum pH within alkaline range (pH 7.2–8.8), inhibition of proteolytic activity by thiol blocking reagents, which is usually reverted by addition of cysteine, a remarkable thermal stability and notable stability at high ionic strength values. Isoelectric focusing and zymogram of PPP revealed the presence of several proteolytic components between pI 4.6 and 8.1. Preliminary peptidase purification by cationic exchange chromatography showed the presence of two main proteolytic fractions with molecular masses of approximately 20.0 kDa, according to SDS-PAGE.

7.10 TRABAJOS EN PRENSA Y/O ACEPTADOS PARA SU PUBLICACIÓN.

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

1. Abreu Payrol, J., W.D. Obregón, S.A. Trejo & N.O. Caffini. "Purification and Characterization of Four New Cysteine Endopeptidases from fruits of Bromelia pinguin L. grown in Cuba". *The Protein Journal*

SUMMARY. Bromelia pinguin L. ("maya" or "mouse pineapple") 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- α -CBZ-amino acid esters, PFLNA, Z-Arg-Arg-p-NA, and Z-Phe-Arg-p-NA) of the four peptidases are given, as well as the N-



terminal sequences of the enzymes and the homology degree with other plant endopeptidases.

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

SUMMARY. *By means of precipitation with organic solvent and cation exchange chromatography, a new cysteine peptidase (granulosain I) was isolated from ripe fruits of *Solanum granuloso-leprosum* Dunal (Solanaceae). 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 a broad range of pH (7 to 8.6). Granulosain I was completely inhibited by E-64 and iodoacetic acid, 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 (Km 0.6 mM) slightly lower to those of other known cysteine plant proteases (papain and bromelain). The N-terminal sequence of granulosain I (DRLPASVDWRGKGVLVLVKNQGQC) exhibited a close homology with other cysteine proteases belonging to the CA1 family.*

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

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

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

7.14 1. Mercerat Julio R., López M. Laura, Caffini Néstor O. y Cantera Carlos S. "Fitoproteasas obtenidas a partir de especies que crecen en Argentina para su aplicación en la tecnología del cuero". SETAC 2006 Primer Simposio de Ecotoxicología y Contaminación. SETAC Argentina, Córdoba 2006

7.15 2. Bruno, Mariela A.; Trejo, Sebastián A.; Avilés, Francesc X.; Caffini Néstor O. y López Laura M.I. "Aislamiento y caracterización de tres fitopeptidasas cisteínicas a partir frutos de *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae)" XXIX Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular, Elche, España, 7 al 10 de septiembre de 2006.

7.16 3. Lazza, C.M., Pardo, M.F., Bruno M.A. y Caffini N.O. "Hydrolytic activity of crude extracts from *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae) on milk proteins". VII Feria Congreso Latinoamericano de Biotecnología y III Congreso Argentino de Biotecnología, Biolatina 2006, Buenos Aires, 28 al 30 de agosto de 2006.

7.17 4. Juan Abreu Payrol, Walter D. Obregón, Néstor O. Caffini, Migdalia Miranda Martínez, Oscar Ros López, Dulce M^a González Mosquera, Alfredo Meneses, María E Cruz de la Cruz & Fernando Banze. "Endopeptidasas cisteínicas del fruto de *Bromelia pinguin* L.: caracterización y potenciales aplicaciones". XXVII Congreso Latinoamericano de Química, La Habana, Cuba. Octubre de 2006.

7.18 5. Pardo Marcelo F.; Bruno Mariela A., Lazza Cristian M. and Caffini Néstor O. "Use of plant proteases in cheese making". XLI Reunion de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), Pinamar, 3 al 6 de Diciembre de 2005.

7.19 6. Bruno, Mariela A.; Caffini Néstor O and López Laura M.I. "Comparison of two Cysteine Endopeptidasas from *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae)". XLI Reunion de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), Pinamar, 3 al 6 de Diciembre de 2005.



- 7.20** 7. Marcelo Pardo, Cristina Brutti, Claudia Natalucci y Néstor Caffini. "Elaboración de Quesos utilizando Fitoproteasas". Biental de Ciencia y Tecnología, Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires. La Plata, 8 al 10 de noviembre de 2005.
- 7.21** 8. Juan Abreu Payrol, Walter D. Obregón, Guillermo M. Carranza, Laura Colombo, Natalia Durante, Carla M. Almeyra y Néstor O. Caffini "Caracterización de pinguinaína I, la principal proteasa básica presente en frutos de Bromelia pinguin L. (Bromeliaceae). Baires Biotech, Buenos Aires. Junio de 2005
- 7.22** 9. Bruno, Mariela A.; Gonzalez, Marisa R.; Caffini, Néstor O. y López, Laura M.I. "Actividad Coagulante de la Leche de un Extracto Parcialmente Purificado de Frutos de Bromelia hieronymi Mez (Bromeliaceae)". X Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, 1º Simposio Internacional de Nuevas Tecnologías". 18 al 20 de mayo de 2005, Mar del Plata, Argentina.
- 7.23** 10. S.A. Trejo, F. Canals, L.M.I. López, N.O. Caffini, C.L. Natalucci and F.X. Avilés "Isolation and characterization of Af-CP, a cDNA clone encoding a cysteine protease of Asclepias fruticosa L.". VIth European Symposium of the Protein Society 2005. Barcelona. Mayo de 2005
- 7.24** 11. D. Obregón, R. Curciarello, C. Liggieri, S. Trejo, C. Cimino, N. Priolo and N. Caffini. "Enzymatic profile of proteases obtained from latices of Araujia angustifolia (Hook. et Arn.) Decaisne and A. hortorum Fourn. fruits (Asclepiadaceae). Protein Society 2005. Barcelona. Mayo de 2005.
- 7.25** 12. Juan Abreu Payrol, Walter D. Obregón, Guillermo M. Carranza, Laura Colombo, Natalia Durante, Carla M. Almeyra y Néstor O. Caffini "Purificación y Caracterización Parcial de Pinguinaína I, la principal proteasa básica presente en frutos de Bromelia pinguin L. (Bromeliaceae)", Bioveg 2005, Ciego de Avila, Cuba.
- 7.26** **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.).

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**

10.3 "Selección Natural, Genoma Humano y Cáncer". Néstor O. Caffini. Enviado a Revista Farmacéutica (Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica).

10.4

10.5 RESUMEN. El cáncer continúa siendo uno de los problemas más preocupantes de la humanidad. Se ha avanzado considerablemente en el conocimiento, tratamiento y prevención de esta enfermedad, claramente relacionada con desórdenes genéticos, pero siguen siendo muchas las personas que a diario mueren como consecuencia de ella. Los resultados del Proyecto Genoma Humano han estimulado la creación de un catálogo genético del cáncer, que seguramente aportará información valiosa para la comprensión de los orígenes de la enfermedad. De igual valor parecen los estudios que están realizando los biólogos evolutivos, siguiendo las modificaciones que han sufrido en el curso de la evolución los genes involucrados en el cáncer.

PALABRAS CLAVE: Atlas Genómico del Cáncer, Biología Evolutiva, Selección Natural

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. Sebastián Alejandro Trejo. Beca Doctoral Mixta de CONICET. Tema: "Purificación, caracterización y expresión de endopeptidasas cisteínicas de origen vegetal, para su empleo en tecnología de alimentos. Desde el 1º de abril de 2002.

3. Bioqco. Walter David Obregón. Beca de Nivel Inicial para trabajar en el Proyecto "Aplicación Industrial de Enzimas Proteolíticas de Vegetales Superiores". Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica. Programa FONCYT. Código 09-09916. A partir del 1º de Mayo de 2003.

4. Bioqca. Mariela Anahí Bruno. Tema: "Aislamiento, purificación y caracterización de las proteasas de frutos Bromelia hieronymi Mez. (Bromeliaceae). Su aplicación en la industria alimentaria". Desde el 1º de Abril de 2004. Becaria de Formación Superior de la UNLP. Desde el 1º de abril de 2006.

5. Bioqco. Cristian Martín Lazza. Beca de Nivel Inicial para trabajar en el Proyecto "Aplicación Industrial de Enzimas Proteolíticas de Vegetales Superiores". Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica. Programa FONCYT. Código 09-09916. Desde el 1º de octubre de 2005. Beca de Iniciación de la UNLP. Tema "Utilización de fitoproteasas sobre proteínas lácteas" Desde el 1º de abril de 2006.

6. Qca. 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.

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.*



13. Dr. Juan Abreu Payrol. Tesis para optar al Doctorado en Ciencias Farmacéuticas. Universidad de La Habana, Cuba. Tema: "Caracterización y potenciales aplicaciones de las endopeptidasas cisteínicas del fruto de Bromelia pinguin L.) que crece en Cuba. Estudio farmacognóstico". Asesor Externo. Universidad de La Habana, Cuba. Diciembre de 2005.

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)". Defendida en Abril de 2007. Calificación sobresaliente (10).

14. **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.*
15. IX Simposio Argentino y XII Simposio Latinoamericano de Farmacobotánica, San Miguel de Tucumán, República Argentina. A realizarse los días 4 al 6 de julio de 2007. Miembro del Comité Científico.
16. XVI Congreso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina. La Plata. A realizarse del 4 al 8 de septiembre de 2007. Presidente del Comité Científico. Cuenta con auspicio de CICPBA.
17. **CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC.** *Señalar características del curso o motivo del viaje, período, instituciones visitadas, etc.*
18. Durante el 6 y el 25 de septiembre de 2006 se realizó una breve estadía en España, financiada por la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI) merced a un subsidio otorgado al Instituto de Biotecnología y Biomedicina (IBB) de la Universidad Autónoma de Barcelona y al LIProVe. La estadía comenzó con la participación en el XXIX Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular, celebrado en Elche entre el 7 y el 10 de septiembre, donde se presentó el trabajo "Aislamiento y Caracterización de tres Fitopeptidasas Cisteínicas a Partir de Frutos de Bromelia hieronymi Mez (Bromeliaceae)" (M.A. Bruno, S.A. Trejo, S. Bronsoms, F.X. Avilés, N.O. Caffini & L.M.I. López). La mayor parte de las actividades tuvo lugar luego en Barcelona, esencialmente en el IBB, donde el suscripto tuvo a su cargo una charla ("Nuevas fuentes de proteasas vegetales del Nuevo Mundo") y se estuvo trabajando con el Dr. Francesc Xavier Avilés en la elaboración de un proyecto a ser presentado ante la Unión Europea. También hubo reuniones con el Dr. Pere Clapés en el Instituto de Química del C.S.I.C., conjuntamente con el Dr. Avilés y el Dr. Carlos Salas, este último de la Universidad de Minas Geraes, todos ellos integrantes del proyecto CYTED IV.22 del cual es suscripto es coordinador. El motivo de este encuentro fue el de organizar la tercera reunión de coordinación del mencionado proyecto, que tuvo lugar en La Plata entre el 11 y el 14 de diciembre próximos. Finalmente se sostuvo una breve reunión en la Universidad de Córdoba con la Dra. Martha Hernández, del Centro de Bioplasmas de la Universidad de Ciego de Avila, Cuba, para coordinar la estadía de una de sus tesis en el LIProVE.
19. **SUBSIDIOS RECIBIDOS EN EL PERIODO.** *Indicar institución otorgante, fines de los mismos y montos recibidos.*
20. Proyecto "Nuevas endopeptidasas vegetales con aplicaciones biotecnológicas", Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, Resolución 1114/05. Año 2006.
21. Proyecto "Aproximaciones de Biología Molecular y Proteómica para la Búsqueda de Fármacos Contra Parásitos", Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI). Proyecto A/4565/05. Director español Dr. Francisco Javier Avilés, Director contraparte argentina Dr. Néstor Caffini. Año 2006.
22. Proyecto: "Proteasas Vegetales. Aplicaciones Biotecnológicas". Proyecto X-445, acreditado por la Universidad Nacional de La Plata. Años 2006-2008.



23. Proyecto: ““Endopeptidasas Vegetales Con Aplicaciones Biotecnológicas”. Otorgado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica. Programa FONCYT. PICT 38088. Año 2007.

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

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

Designado Profesor Extraordinario en la Categoría de Consulto. Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata. Resolución 237 del 9 de marzo de 2005 del Honorable Consejo Académico.

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

27. Coordinador de la Comisión de Autoevaluación de las Carreras de Farmacia y Bioquímica. Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata. Desde de 2004 a la fecha. En junio de 2006 se elevó al Ministerio de Educación, Ciencia y Tecnología el Informe de Autoevaluación de las Carreras de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de la Plata, conteniendo los informes de evaluadores externos y que concluyó en junio de 2007 con la visita de una Comisión Evaluadora designada por la Secretaría de Políticas Universitarias.

28. Coordinador Institucional por la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata. Programa de Movilidad de Corta Duración para Docentes de Grado del MERCOSUR. Octubre de 2006.

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

Profesor Titular y Coordinador del 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 primer semestre de 2005 y 2006.

30. **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.*

Asistente del Departamento de Ciencias Biológicas durante 2005 y Jefe del Departamento de Ciencias Biológicas durante 2006. La Ordenanza Departamental (art. 5º) establece que estas actividades se computan como una semidedicación.

Conferencias dictadas:

"Proteasas e Inhibidores de origen vegetal". Conferencia. Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de San Luis. San Luis, noviembre de 2005.

"Nuevas fuentes de proteasas vegetales del Nuevo Mundo". Conferencia. Instituto de Biotecnología y Biomedicina, Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, España, septiembre de 2006.

Jurado de Tesis Doctorales

1. Dra. en Bioquímica Evelina Quiroga. Marzo de 2005. Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de San Luis.



2. Dra. en Bioquímica Nora Escudero. Noviembre de 2005. Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de San Luis.
3. Dra. Juliana Beatriz Parsons. Diciembre de 2005. Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.
4. Dra. Silvina Constanza Liggieri. Diciembre de 2005. Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata.
5. Dra. Lilian Abugoh James. Abril de 2006. Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata.
6. Dr. Gonzalo Gastón Palazzolo. Abril de 2006. Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata.
7. Dra. Ana Zulema Rugna. Septiembre de 2006. Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.
8. Dra. Graciela Corbino. Noviembre de 2006. Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.
9. Dra. Silvia Susana Fernández. Noviembre de 2006. Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la Universidad de San Luis.

31. TITULO Y PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PROXIMO PERIODO.

Desarrollar en no más de 3 páginas. Si corresponde, explicita la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.

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

OBJETIVOS.

El objetivo general del proyecto es aislar, purificar y caracterizar proteasas e inhibidores de proteasas provenientes de plantas autóctonas o cultivadas o provenientes de cultivos in vitro y utilizarlas sobre proteínas de uso alimentario, tanto en la modificación de sus propiedades funcionales como en la elaboración de quesos, en el tratamiento de cueros, para la producción y síntesis in medio orgánico de péptidos bioactivos y para aplicaciones biomédicas. También de fuentes vegetales se procederá al aislamiento y ensayo de inhibidores para su posible uso biomédico

RESULTADOS ESPERADOS

Desde el punto de vista del aprovechamiento de recursos naturales renovables, los resultados de este proyecto ampliarán el escaso conocimiento del que se dispone sobre especies de nuestra flora potencialmente productoras de proteasas y de sus inhibidores. Asimismo, el estudio de las propiedades bioquímicas y estructurales de nuevas fitoproteasas constituirá un aporte al conocimiento de este importante grupo de enzimas. Al mismo tiempo proveerá información básica sobre parámetros de utilidad en el diseño de procesos biotecnológicos en los que puedan participar dichas enzimas. Las proteasas son utilizadas en variados procesos tecnológicos (industrias alimentaria, farmacéutica, química, textil, de polvos detergentes, del cuero, etc.). El ensayo de las fitoproteasas en estudio en algunos de los procesos mencionados en reemplazo de las enzimas comerciales que se usan en los mismos, que habitualmente se importan, podría permitir la sustitución de éstas en los casos en los que se mejore el rendimiento, la calidad del producto obtenido o se disminuya el costo de producción. En relación a los inhibidores de proteasas se programa ensayar los inhibidores aislados frente a las proteasas blanco de diversas patologías en las que el bloqueo de la acción proteolítica pueda resultar una alternativa farmacológica.

METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO

Material vegetal

Es producto de compromisos de cooperación científica establecidos con distintos grupos de investigación pertenecientes a las Universidades Nacionales del país y del exterior e incluye distintas especies pertenecientes a las Asclepiadaceae, Asteraceae, Caricaceae y Bromeliaceae.

Obtención de preparaciones parcialmente purificadas

Cuando las proteasas forme parte del látex, el mismo se obtendrá por incisiones del órgano vegetal que lo contenga, permitiendo su exudación. El látex exudado será recogido sobre un buffer apropiado conteniendo sustancias protectoras, manteniendo la temperatura entre 0°C y 4°C y congelado inmediatamente después de obtenido. La clarificación será



llevada a cabo por centrifugación en frío. En caso en que las proteasas se encuentren localizadas en otros tejidos, los mismos serán procesados a 0-4°C en un homogeneizador de velocidad variable provisto con accesorios de corte en presencia de buffer de baja fuerza iónica conteniendo protectores adecuados y los restos vegetales serán eliminados por centrifugación. Las preparaciones crudas se someterán a una purificación inicial por precipitación acetónica, etanólica o salina fraccionada. Estas preparaciones parcialmente purificadas serán liofilizadas, previa confirmación de que el proceso no afecta la actividad de las mismas; en caso contrario serán conservadas a -20°C.

Caracterización de las preparaciones parcialmente purificadas

Dado que todas las enzimas proteolíticas estudiadas en nuestro laboratorio pretenden ser ensayadas en distintos procesos industriales en reemplazo de otras proteasas comerciales que actualmente se importan, y teniendo en cuenta que éstas consisten en preparaciones prácticamente no purificadas, es esencial contar con información sobre el comportamiento de las preparaciones parcialmente purificadas. En función de ello se determinará el efecto del pH sobre la actividad proteolítica, utilizando caseína o azocaseína y/o hemoglobina desnaturalizada como sustratos. Asimismo se verificará la estabilidad por determinación de la actividad residual de preparaciones expuestas durante lapsos variables a diferentes condiciones de pH, fuerza iónica y temperatura.

Purificación de las preparaciones enzimáticas

El análisis por isoelectroenfoque (IEF) de las fracciones proteolíticamente activas provenientes de la precipitación fraccionada, permitirá definir la estrategia de purificación a adoptar. De acuerdo a los puntos isoelectrónicos (pI) obtenidos, las preparaciones serán purificadas mediante FPLC (cromatografía de intercambio iónico o afinidad). Si se observan dos o más fracciones no totalmente resueltas, con puntos isoelectrónicos muy próximos, se recurrirá al cromatoenfoque. Una vez separadas la o las fracciones con actividad proteolítica serán luego sometidas a cromatografía de exclusión molecular. En cada etapa se establecerán el grado de purificación alcanzado y el porcentaje de recuperación de la actividad original.

Caracterización de las fracciones obtenidas

El peso molecular relativo se estimará por cromatografía de exclusión molecular, por SDS-PAGE y, eventualmente, por espectrometría de masas (EM). La posterior aplicación de isoelectroenfoque permitirá establecer el grado de homogeneidad y el valor del punto isoelectrónico de cada una de las fracciones activas. La presencia de actividad proteolítica en cada una de las fracciones proteicas separadas se determinará a través de la realización de zimogramas a partir de los geles provenientes de isoelectroenfoque y de SDS-PAGE. Con el objeto de conocer la especificidad y capacidad catalítica de las proteasas en estudio, se determinarán los parámetros cinéticos en el estado estacionario empleando sustratos sintéticos y/o proteicos. Se observará la variación de los mencionados parámetros en diferentes condiciones (pH y fuerza iónica) en las que cada enzima sea estable. Mediante el empleo de inhibidores específicos de cada grupo de proteasas se determinará la K_i (app) para cada enzima, a efectos de precisar el mecanismo catalítico de las fitoproteasas en estudio. Se analizará la composición aminoacídica y el extremo N-terminal de la(s) proteasa(s) purificada(s), así como la secuencia aminoacídica completa en los casos de mayor interés y se determinará el grado de homología con otras fitoproteasas. En los casos más promisorios se ensayará el clonado y expresión de las proteasas en eucariotes poco evolucionados.

Utilización de nuevas fitoproteasas en la elaboración de quesos

La capacidad coagulante de las preparaciones crudas y eventualmente las fracciones parcialmente purificadas de distintas fitoproteasas obtenidas de plantas crecidas a campo o de cultivos in vitro será ensayada bajo diferentes condiciones. Dado que los productos de degradación de la caseína afectan el rendimiento, consistencia y sabor del queso, se analizará la acción de las fitoproteasas sobre las caseínas de las distintas leches, tomando muestras a diferentes tiempos durante 24 horas y de los quesos durante su maduración (15 a 40 días según fueran de pasta blanda o semidura). El grado de proteólisis se evaluará cuantificando densitométricamente las bandas obtenidas por electroforesis en geles de poliacrilamida con urea y por HPLC-MS.

Hidrólisis controlada de proteínas alimentarias



Las preparaciones parcialmente purificadas serán ensayadas en diferentes condiciones (pH, temperatura y tiempo de reacción) sobre caseinatos sódicos 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. Se analizarán en cada caso los péptidos resultantes por electroforesis en geles de poliacrilamida con urea y HPLC-MS.

Detección de actividad inhibitoria

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, desarrollada por el grupo español con el que se está llevando a cabo un Proyecto conjunto subsidiado por la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI) 72, lo que permitirá identificar posibles dianas enzimáticas o especies proteicas (u orgánicas) con capacidad inhibitoria y su masa molecular.

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 isoelectrónicos (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.

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 isoelectrónico 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), catepsinas 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.



Condiciones de la presentación:

La presentación deberá incluir:

- a. Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 21)
- b. Una copia en soporte electrónico, la que será remitida por correo electrónico a la siguiente dirección: infinvest@cic.gba.gov.ar. Deberá realizarse en formato .doc zipeado, configurado para papel A-4 y libre de virus. Si se trabaja sobre el documento modelo, se deberán eliminar las instrucciones.
- c. En el mismo correo electrónico referido en el punto b), 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.
- d. Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, en una carpeta o caja, en cuyo rótulo se consignará el apellido y nombres del investigador y la leyenda "Informe Científico Período".
- e. Informe del Director de tareas (en los casos que corresponda), en sobre cerrado.

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.