

Departamento de Química Física

Identificación de moléculas funcionalmente involucradas en enfermedades específicas y resistencia a drogas con aplicación de la Bioinformática y la Proteómica; Ingeniería y modelación de proteínas para el desarrollo de nuevas drogas; son los temas hacia donde se dirige la investigación en el Departamento de Química-Física. Este departamento posee experiencia en caracterización de proteínas glicosiladas, síntesis de péptidos y oligonucleótidos, microscopía electrónica, espectrometría de masas y análisis de aminoácidos.

[Dr. Luis J. González](#)
Jefe del Departamento Química Física
Licenciado en Química
Doctor en Ciencias Químicas
Investigador Auxiliar
Profesor Auxiliar



Proyectos en curso:

- Proteómica
- Bioinformática
- Screening virtual
- Modificaciones Químicas de Proteínas
- Humanización de la Glicosilación en plantas y glándulas mamarias
- Autoinmunidad
- Diseño de moléculas antivirales contra el dengue
- Diseño de moléculas antivirales contra el VIH

Proyecto Desarrollo de nuevas metodologías para el estudio de proteomas



[Dr. Vladimir Besada](#)
Líder del Proyecto

Descripción

Tiene por objetivo desarrollar diferentes metodologías en proteómica que permita una caracterización más completa de cualquier proteoma en estudio. Se ha trabajado en el desarrollo de tres métodos de aislamiento selectivo de péptidos que permitan la simplificación de las mezclas complejas para poder realizar proteómica cuantitativa sin el empleo de la electroforesis bidimensional y al utilizar el marcaje isotópico permita la cuantificación relativa de las proteínas que le dieron origen. Estos métodos reunidos con las siglas **SCAPE** (del inglés **S**elective **C**apture of **PE**ptides) son complementarios entre sí al seleccionar distintos tipos de péptidos: a) péptidos con lisina que no contienen histidina ni arginina (**SCAPE-nHnR**), b) péptidos con más de un aminoácido básico (**SCAPE-RH**), c) péptidos delimitados por arginina (**SCAPE-RRnK**). El recobrado es mayor del 70% en todos los casos y se puede lograr una cobertura amplia (mayor del 95%) de los proteomas conocidos. Uno de estos métodos permite la cuantificación relativa de proteínas en cuatro condiciones de manera simultánea. Los tres métodos están protegidos con 2 aplicaciones de patentes y una ya concedida este año en los Estados Unidos. Estos métodos están siendo empleados en varios de los proyectos del área de investigaciones biomédicas con resultados superiores a los obtenidos por la vía convencional de electroforesis bidimensional. Entre las aplicaciones se encuentra la dilucidación de mecanismos de acción

de moléculas proapoptóticas, estudio de mecanismos de resistencia a drogas en distintas líneas de células tumorales, estudio de biomodelos de artritis reumatoide, estudio de efecto sinérgico de drogas anticancerígenos y en la identificación de proteínas de membranas con potencialidad para candidatos vacunales.

Se ha trabajado intensamente durante este año en el desarrollo de metodologías novedosas para el fraccionamiento de péptidos y el aislamiento selectivo de fosfopéptidos y su aplicación en estudios de proteómica.

Disponemos también de procedimientos para fraccionamiento proteínas por solubilización diferencial y métodos cromatográficos que posibilitan obtener extractos proteicos más sencillos y por tanto la identificación de un número mayor de proteínas.

Publicaciones

- 1- Ramos Y, Gutierrez E, Machado Y, Sánchez A, Castellanos-Serra L, González LJ, Fernández-de-Cossio J, Pérez-Riverol Y, Betancourt L, Gil J, Padrón G, Besada V. Proteomics based on peptide fractionation by SDS-free PAGE. **J Proteome Res.** 2008 Jun;7(6):2427-34.
- 2- Ramos Y, García Y, Llopiz A, Castellanos-Serra L. Selectivity of bacterial proteome fractionation based on differential solubility: a mass spectrometry evaluation. **Anal Biochem.** 2008 Jun 15;377(2):134-40.
- 3- Lugo JM, Rodriguez A, Helguera Y, Morales R, Gonzalez O, Acosta J, Besada V, Sanchez A, Estrada MP. Recombinant novel pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide from African catfish (*Clarias gariepinus*) authenticates its biological function as a growth-promoting factor in low vertebrates. **J Endocrinol.** 2008 Jun;197(3):583-97.
- 4- Acosta J, Carpio Y, Besada V, Morales R, Sánchez A, Curbelo Y, Ayala J, Estrada MP. Recombinant truncated tilapia growth hormone enhances growth and innate immunity in tilapia fry (*Oreochromis* sp.). **Gen Comp Endocrinol.** 2008 May 15;157(1):49-57.
- 5- González Y, Pons T, Gil J, Besada V, Alonso-del-Rivero M, Tanaka AS, Araujo MS, Chávez MA. Characterization and comparative 3D modeling of CmPI-II, a novel 'non-classical' Kazal-type inhibitor from the marine snail *Cenchritis muricatus* (Mollusca). **Biol Chem.** 2007 Nov;388(11):1183-94.
- 6- Garcia JC, Ariza AM, Lasa AM, Gonzalez LJ, Perez VB. Increased antiviral activity of micro-scale purified human IFN alpha8 over the human IFN alpha2b in Hep-2 cells challenged with Mengo virus. **Biotechnol Appl Biochem.** 2007 Nov;48(Pt 3):159-65.
- 7- Yamaguchi H, Sasaki K, Satomi Y, Shimbara T, Kageyama H, Mondal MS, Toshinai K, Date Y, Gonzalez LJ, Shioda S, Takao T, Nakazato M, Minamino N. Peptidomic identification and biological validation of neuroendocrine regulatory peptide-1 and -2. **J Biol Chem.** 2007 Sep 7;282(36):26354-60.
- 8- Sanchez A, Ramos Y, Solano Y, González LJ, Betancourt L, Gil J, Padron G, Besada V. Specific isotope labeling for the identification of free N-terminal peptide of proteins separated by polyacrylamide gel electrophoresis. **Eur J Mass Spectrom (Chichester, Eng).** 2007;13(4):307-9.
- 9- Cuervo P, de Jesus JB, Junqueira M, Mendonca-Lima L, Gonzalez LJ, Betancourt L, Grimaldi G Jr, Domont GB, Fernandes O, Cupolillo E. Proteome analysis of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. **Mol Biochem Parasitol.** 2007 Jul;154(1):6-21.

- 10-Sanchez A, Ramos Y, Solano Y, Gonzalez LJ, Besada V, Betancourt L, Gil J, Alvarez F, Rodriguez M, Perez L, Pujol M, Padron G. Double acylation for identification of amino-terminal peptides of proteins isolated by polyacrylamide gel electrophoresis. **Rapid Commun Mass Spectrom.** 2007 Jun 14;21(14):2237-44.
- 11-Sanchez A, Lopez LJ, Betancourt L, Gil J, Besada V, Fernandez-de-Cossio J, Rodriguez-Ulloa A, Marrero K, Alvarez F, Fando R, Padron G. Selective isolation of multiple positively charged peptides for 2-DE-free quantitative proteomics. **Proteomics.** 2006 Aug;6(16):4444-55.
- 12-Sanchez A, Gonzalez LJ, Ramos Y, Betancourt L, Gil J, Besada V, Fernandez-de-Cossio J, Alvarez F, Padron G. Selective isolation of lysine-free tryptic peptides delimited by arginine residues: A new tool for proteome analysis. **J Proteome Res.** 2006 May;5(5):1204-13.
- 13-Castellanos-Serra et al. Outer membrane vesicles of the VA-MENGOC-BC→vaccine against serogroup B of *Neisseria meningitidis*: Analysis of protein components by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. **Proteomics** 2006, 6, 3389–3399.
- 14-Besada V, Diaz M, Becker M, Ramos Y, Castellanos-Serra L, Fichtner I. Proteomics of xenografted human breast cancer indicates novel targets related to tamoxifen resistance. **Proteomics.** 2006 Feb;6(3):1038-48.
- 15-Castellanos-Serra L, et al. An in-gel digestion procedure that facilitates the identification of highly hydrophobic proteins by electrospray ionization-mass spectrometry analysis. **Proteomics.** 2005, 5(11):2729-38.
- 16-Lazaro Betancourt, Jeovanis Gil, Vladimir Besada, González LJ, Jorge Fernandez de Cossio, Liudy García, Rolando Pajón, Aniel Sánchez, Félix Alvarez and Gabriel Padrón. SCAPE: A new tool for the Selective CAPture of Peptides in Protein identification. **J. Proteome Res.** 2005, 4(2), 491-496.
- 17-Fernandez-De-Cossio J, Gonzalez LJ, Satomi Y, Betancourt L, Ramos Y, Huerta V, Besada V, Padron G, Minamino N, Takao T. Automated interpretation of mass spectra of complex mixtures by matching of isotope peak distributions. **Rapid Commun Mass Spectrom.** 2004 Sep 21;18(20):2465.
- 18-Fernandez-de-Cossio J, González LJ, Satomi Y, Betancourt L, Ramos Y, Huerta V, Amaro A, Besada V, Padron G, Minamino N, Takao T. Isotopica: a tool for the calculation and viewing of complex isotopic envelopes. **Nucleic Acids Res.** 2004 Jul 1;32 (Web Server issue):W674-8.
- 19-Marrero J. et al. Effect of high concentration of Co (II) on *Enterobacter sp.* strain C-1: A bacterium highly resistant to heavy metals with an unknown genome. **Proteomics** 2004, 4(5), 1265-1279.
- 20-González LJ, Lila Castellanos-Serra, Volker Badock, Maylín Díaz, Alejandro Moro, Silvio Perea, Alicia Santos, Dalila Paz-Lago, Albrecht Otto, Eva-Christina Müller, Susanne Kostka, Brigitte Wittmann-Liebold and Gabriel Padrón. Identification of nuclear proteins of small cell lung cancer cell line H82: An improved protocol for the analysis of silver stained proteins. **Electrophoresis,** 2003, 24, 237-252.
- 21-Castellanos-Serra L, Paz-Lago D. Inhibition of unwanted proteolysis during sample preparation: evaluation of its efficiency in challenge experiments. **Electrophoresis.** 2002; 23(11):1745-53.

- 22-Moya G, González LJ, Huerta V, Garcia Y, Morera V, Perez D, Brena F, Arana M. Isolation and characterization of modified species of a mutated (Cys¹²⁵-Ala) recombinant human interleukin-2. **J Chromatogr A**, 2002, **971(1-2)**, 129-142.
- 23-Lázaro Betancourt, Vladimir Besada, Luis J. González, Vivian Morera, Gabriel Padrón, Toshifumi Takao and Yasutsugu Shimonishi. Selective isolation and identification of N-terminal blocked peptides from tryptic protein digests. **J. Peptide Research** **57 (5)**, 2001, 345-53.
- 24-Castellanos-Serra L, Hardy E. Detection of biomolecules in electrophoresis gels with salts of imidazole and zinc II: a decade of research. **Electrophoresis**. 2001; **22(5):864-73**.
- 25-Luis Javier González, Takahiko Shimizu, Yoshinori Satomi, Lazaro Betancourt, Vladimir Besada, Gabriel Padrón, Ron Orlando, Takuji Shirasawa, Yasutsugu Shimonishi, Toshifumi Takao. Differentiating alpha- and beta-aspartic acid by electrospray ionization and low-energy tandem mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom**. **14 (22)**, 2000, 2092-2102.
- 26-Jorge Fernández-de-Cossio, Luis J. González, Yoshinori Satomi, Takaki Shima, Nobuaki Okumura, Vladimir Besada, Lázaro, Betancourt, Gabriel Padrón, Yasutsugu Shimonishi and Toshifumi Takao. Automated interpretation of low-energy collision induced dissociation spectra by SeqMS, a software aid for de novo sequencing by tandem mass spectrometry. **Electrophoresis** **21**, 1694 (2000).
- 27-Fernández-de-Cossio J, González LJ, Betancourt L, Besada V, Padrón G, Shimonishi Y, Takao T. Automated interpretation of high-energy CID spectra of singly protonated peptides by 'SeqMS', a software aid for *De Novo* sequencing by tandem mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom**. **12 (1998)**, 1-12.
- 28-González J, Besada V, Garay H, Reyes O, Padrón G, Támbara Y, Takao T, Shimonishi Y. Effect of the position of a basic amino acid on C-terminal rearrangement of protonated peptides upon collision-induced dissociation. **J Mass Spectrom**, **31 (1996)**, 150-158.
- 29-Fernández-de-Cossio J, González J. and Besada V. A computer program to aid the sequencing of peptides in collision-activated decomposition experiments. **CABIOS**, **11 (1995)**, 427-434.
- 30-González J, Takao T, Hori H, Besada V, Rodríguez R, Padrón G, Shimonishi Y. A method for determination of N-glycosylation sites in glycoproteins by collision-induced dissociation analysis in FAB-MS: Identification of the positions of carbohydrate-linked asparagine in recombinant alpha-amylase by treatment with peptide-N-glycosidase F in ¹⁸O-labelled water. **Anal Biochem**. **205 (1992)**, 151-158.
- 31-Besada V, Antuch W, Cinza A, Rojas I, Quintana M, Padrón G. Chemical characterization of recombinant human epidermal growth factor. **Analytica Chimica Acta**, **239 (1990)**, 301-305.
- 32- Padrón G, Besada V, Agráz A, Quiñones Y, Herrera L. Mass spectrometric analysis of recombinant human alpha-2 IFN. **Analytica Chimica Acta**, **223 (1989)**, 361-369.

Proyecto Autoinmunidad



[Dra. María del Carmen Domínguez](#)
Líder del Proyecto

Descripción

Este proyecto está enfocado en el estudio y búsqueda de tratamientos para las enfermedades autoinmunes, específicamente de la Artritis reumatoide (AR). Una de las estrategias más novedosas para el tratamiento de la AR implica la inducción de tolerancia antigénica, cuya premisa más importante es el uso de autoantígenos o fragmentos de ellos para inhibir los clones autoreactivos de células T, para prevenir la destrucción de las articulaciones.

En este sentido nosotros hemos identificado varios epítopes de células T a partir de la proteína humana de estrés térmico de 60kDa (del inglés hHsp60), que es uno de los principales autoantígenos involucrados en la patogénesis de la AR. Usando herramientas bioinformáticas, se modificaron los péptidos originales correspondientes a epítopes de células T en los sitios de contacto con la molécula HLA, de forma que los péptidos APL (del inglés altered peptide ligand) sean capaces de cambiar el patrón de citocinas a un fenotipo regulador.

Uno de estos péptidos en ensayos *ex vivo* usando PBMC de pacientes con AR, induce un incremento sustancial en los niveles de IL-10 (la cual es una importante citocina inmunoreguladora) en la mayoría de los pacientes (Figura 1).

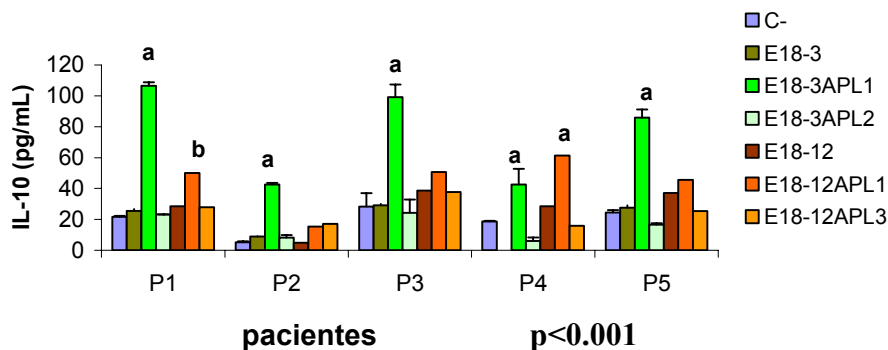


Fig. 1. Niveles de IL-10 inducidos por péptidos en PBMC de pacientes con AR

También hemos evaluado estos péptidos en dos modelos animales: un modelo de artritis inducida por adyuvante (AIA, del inglés) y un modelo de artritis inducida por colágeno en ratas Lewis, demostrado que algunos péptidos APL modulan eficientemente el curso de la AR. Por ejemplo, la figura 2 muestra la evaluación clínica de dos péptidos en el modelo AIA. En este caso las ratas fueron separadas en cuatro grupos y tratadas de la forma siguiente:

- grupo I: animales tratados con el péptido tipo APL CIGB-814
- grupo II: animales tratados con el péptido correspondiente al epitope original
- grupo III: animales no tratados con péptidos (control de la inducción de la enfermedad)
- grupo IV: animales que no fueron inducidos con la enfermedad y no fueron tratados con péptidos (control negativo)

En esta figura es evidente que la administración intradérmica de ambos péptidos indujo una reducción significativa de los signos clínicos de la Artritis. Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los grupos tratados con péptido y el grupo tomado como control positivo de la enfermedad.

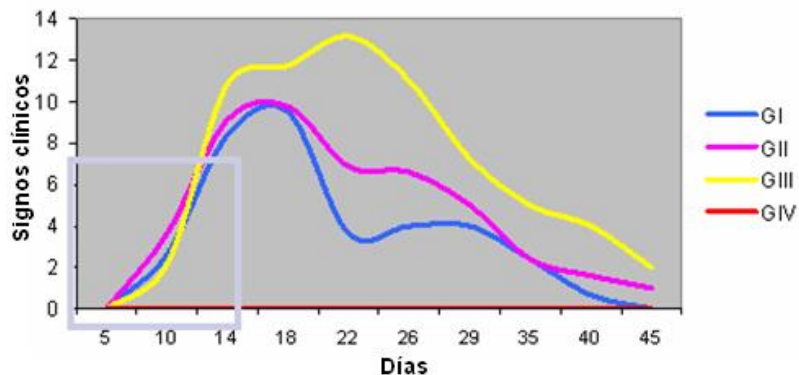


Fig. 2. Evaluación de los signos clínicos de AR en ratas tratadas con péptidos, modelo AIA.

Publicaciones

- 1- Domínguez MC, Lorenzo N, Barbera A, Hernández MV, Torres AM, Nazabal M, Camacho H, Hernández I, Ortiz N, Morera V, Padrón G. Caracterización de moléculas HLA tipo II y evaluación de citocinas en pacientes cubanos con artritis reumatoide. **Revista Cubana de Reumatología. 2006;VIII(9-10).**

Proyecto Diseño de moléculas antivirales contra el dengue



Dr. Glay Chinae
Líder del Proyecto

Descripción

En el proyecto se trabaja en diferentes etapas del ciclo de replicación viral atractivas para el desarrollo de principios novedosos de inhibición de la infección. Esto incluye los eventos tempranos de la infección i.e. adhesión, internalización y fusión, así como el procesamiento de la

poliproteína viral por la proteasa NS3.

Dada la importancia funcional de la proteína de la envoltura del virus en estos eventos, se seleccionó esta proteína como blanco para el desarrollo de ligandos capaces de bloquear sitios involucrados en interacción proteína-proteína y/o bloquear cambios conformacionales de la proteína. También se trabaja en la identificación del receptor que media la endocitosis del virus en las células de mamíferos y en el diseño de ligandos que bloqueen esta interacción. Se emplean una combinación de herramientas metodológicas entre las que se incluyen el diseño computacional de moléculas basado en estructura y tamizaje molecular masivo, la selección de ligandos contra las moléculas diana utilizando métodos combinatorios, metodologías de Proteómica y métodos de análisis de interacciones de biomoléculas. Se realizan además ensayos de actividad antiviral *in vitro* e *in vivo* de las moléculas obtenidas como potenciales inhibidores y la validación del receptor viral putativo.

Actualmente disponemos de varias moléculas de actividad antiviral *in vitro* e *in vivo* en modelo de ratón de encefalitis inducida por infección con virus dengue, que implican principios novedosos de inhibición generadores de propiedad intelectual.

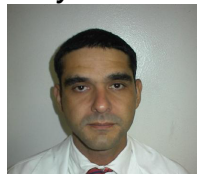
Una parte fundamental del trabajo ha sido el desarrollo de herramientas analíticas propias tanto en la parte experimental como en la computacional. Como parte de esa estrategia se desarrolló el programa de FINDEpi, un método computacional para la predicción de sitios de interacción proteína-proteína utilizando como datos los resultados de bibliotecas

combinatorias. En estos momentos el programa se encuentra disponible para utilizar a través de una interfaz WEB.

Se solucionó la estructura cristalográfica del anticuerpo monoclonal 4G2. Este es el primer reporte en el mundo de coordenadas cristalográficas de un anticuerpo neutralizante contra Flavivirus. Estudios de modelación sobre la región de reconocimiento conllevó a la comprensión de los determinantes estructurales de la amplia reactividad cruzada del anticuerpo contra flavivirus, así como de su mecanismo de neutralización y generación de mutantes de escape.

Hemos identificado un receptor celular capaz de mediar internalización viral y nos encontramos en proceso de caracterización de la interacción y el desarrollo de ensayos de interacción directa para la búsqueda y optimización de moléculas que interfieran con esta interacción. Una de las herramientas que se emplea con este fin es una biblioteca de mutantes de alanina de todos los residuos de la superficie del dominio III de la proteína de la envoltura del virus dengue 1.

Proyecto Obtención de nuevos antivirales para el tratamiento del SIDA



Dr. Carlos Duarte
Líder del Proyecto

Descripción

La epidemia de VIH/SIDA continúa siendo uno de los más graves problemas de salud para la humanidad. Durante el ciclo viral existen numerosos puntos que pueden ser bloqueados para interrumpir la replicación del virus. Esto ha sido explotado para desarrollar numerosos compuestos antivirales, cuya aplicación en la terapia antiretroviral de alta eficacia (TAAE) ha logrado un impacto considerable en la sobrevivencia de los pacientes de SIDA.

A pesar de su indiscutible éxito, la TAAE presenta cuatro limitaciones importantes: (1) No elimina el VIH de los reservorios virales, por tanto no cura completamente al paciente, (2) Los inhibidores tienen efectos tóxicos considerables, (3) Eventualmente el virus desarrolla resistencia a todos los inhibidores conocidos, (4) Es un tratamiento privativo por su elevado costo.

Por estas razones el descubrimiento de nuevos inhibidores más potentes, con mejor accesibilidad, mejor rango de acción frente a mutantes o menor costo resulta de primordial importancia. Este es el objetivo de este proyecto, para lo cual se emplea la metodología de Búsqueda Virtual de bibliotecas de compuestos químicos para la búsqueda de inhibidores no nucleosídicos de la reverso transcriptasa (RT) o de inhibidores del proceso de fusión mediado por la gp41.

Inhibidores no nucleosídicos de RT: (NNRTI): Son inhibidores no competitivos, o sea no se unen al sitio activo de la enzima, sino a una cavidad adyacente a este. Su entrada provoca una modificación alostérica de la enzima que trae como resultado el bloqueo al acceso del sustrato al sitio activo. Existen tres compuestos de este tipo aprobados en la clínica: efavirenz, nevirapina y delavirdina y los tres son inactivos frente a los mismos mutantes de escape.

Inhibidores de fusión: Estos inhibidores evitan la entrada del virus a la célula blanco. El único compuesto aprobado en clínica el T20, Fuzeon o Enfuviritide. El T20 es un péptido de gp41, cuya secuencia se solapa con la de la región C34. Se ha demostrado que ejerce su efecto inhibitorio al unirse a los surcos del intermediario trímérico formado por las regiones N36 y de esta forma inhibe la formación del complejo intermediario de las seis hélices.

Otras Instituciones participantes

Centro de Biosíntesis Química de Villa Clara (CBQ) y Laboratorio de Investigaciones de SIDA (LISIDA)

Publicación

Duarte CA. El Virus GB-C y su interacción con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana. **BA 2008 25**

Proyecto Pesquisaje Virtual de bibliotecas de compuestos químicos para la búsqueda de nuevos fármacos.



[Lic. Roberto Vera](#)
Líder del Proyecto

Descripción

El uso de diferentes procedimientos computacionales para el diseño de fármacos se ha impuesto como una necesidad para acelerar y hacer más eficiente el desarrollo de nuevos medicamentos. El éxito de este enfoque dependerá de la vinculación estrecha entre los grupos de biología que conocen con profundidad el blanco y la función sobre la que se pretende influir, el grupo de bioinformática relacionado con el diseño racional y los grupos de síntesis química. El *pesquisaje virtual* es un procedimiento eminentemente computacional que evalúa la posibilidad de interacción específica de una molécula orgánica relativamente pequeña con el sitio deseado de la proteína. Se comparan las posibilidades de interacción de todos los compuestos contenidos en bases de datos de compuestos químicos, que en general puede ser de algunos millones de compuestos.

Una alternativa, o mas bien una posible combinación son los métodos de diseño **de novo** que no parten de una base de datos de compuestos químicos conocidos sino que tratan de explorar el extremadamente amplio espacio químico (que se considera de 1060-10100 compuestos) que pudieran constituir un fármaco.

Esta metodología ha sido empleada en el estudio de inhibidores no nucleosídicos de RT de HIV, donde se obtuvieron compuestos químicos con actividad antiviral *in vitro* contra el VIH. En estos momentos estos compuestos están en fase de rediseño- optimización de sus propiedades químico-físicas y farmacológicas. De igual forma se están realizando estudios dirigidos a la obtención de inhibidores de fusión del VIH, utilizando esta misma estrategia.

Otros de los blancos estudiados se relaciona con la obtención de compuestos químicos por modelación molecular *in silico*, y cuya estructura permite el bloqueo de la fosforilación mediante la interacción de dichos compuestos con el dominio de fosforilación o su entorno en los sustratos de la enzima Caseína Kinasa 2. En este estudio se obtuvieron compuestos químicos que mostraron un efecto citotóxico sobre células tumorales en cultivos *in vitro*.

El desarrollo de nuevas metodologías en este campo es un elemento importante en el éxito del trabajo. (1) Se desarrolló un programa (MCRotate) para el cálculo de conformaciones explorando todo el espacio molecular de los compuestos químicos, (2) Se desarrolló un algoritmo para estimar la energía de solvatación de moléculas pequeñas y (3) Se confeccionó un programa para el cálculo de diferentes descriptores moleculares.

Servicio de análisis de interacciones en Biacore



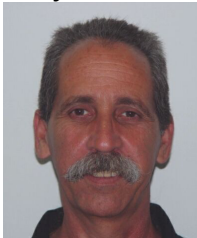
[Lic. Vivian Huerta](#)
Responsable del Servicio

Descripción

El BIACore es un sensor óptico que emplea el fenómeno de la resonancia de los plasmones de superficie (SPR) y permite monitorear la interacción entre dos macromoléculas en tiempo real. Algunas aplicaciones potenciales incluyen las mediciones de afinidad de interacción y cinética de unión, determinación de concentración de analitos y el mapeo de epitopos. El principio de detección basado en la SPR es una técnica óptica que mide las variaciones en el índice de refracción en la superficie del sensor, causadas por las diferencias en la concentración del analito. Por tanto, la técnica no requiere el marcaje de las moléculas a analizar y la respuesta obtenida es esencialmente independiente de la naturaleza de la biomolécula.

Esta tecnología se puede emplear en el estudio de las interacciones de proteínas, ácidos nucleicos, micelas lipídicas e incluso partículas como virus y células completas. Las áreas de aplicación también incluyen un amplio rango desde la ciencia básica en bioquímica y biología molecular, el diseño de drogas, la producción de anticuerpos monoclonales y la investigación de enfermedades infecciosas.

Proyecto Glicosilación.



[Dr. José Cremata](#)
Líder del Proyecto

Descripción

Desde 1990 nuestro grupo inició una nueva línea de investigación en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) centrandó su interés en el estudio de glicoproteínas de diferentes fuentes para brindar el soporte necesario para los trabajos de Biología Molecular que se venían desarrollando en la institución.

Nuestro laboratorio de Glicoproteínas dirige sus esfuerzos hacia:

1. Estudios de la participación de la glicosilación como modificación post-traducciona en la modulación de la actividad biológica de glicoproteínas naturales y/o recombinantes.
2. Modificación de la maquinaria de N-glicosilación de hospederos para la producción de glicoproteínas de interés farmacéutico.
3. Desarrollo e introducción de nuevas metodologías para la caracterización de la N-glicosilación.

En particular en los últimos años se han abordado los siguientes temas de investigación:

- Desarrollo de nuevos métodos de caracterización de la glicosilación de proteínas naturales y recombinantes.
- Caracterización de la N-glicosilación del sistema *P. pastoris* para la expresión de proteínas recombinantes.
- Caracterización de la glicosilación de Eritropoietina (EPO) humana recombinante expresada en células CHO y glándula mamaria de animales no-transgénicos.

- Caracterización de la glicosilación de proteínas heterólogas expresadas en células de plantas como hospedero.
- Estudios de la vía de glicosilación en glándulas mamarias de animales no-transgénicos.

Publicaciones

1. Séveno M, Cabrera G, Triguero A, Burel C, Leprince J, Rihouey C, Vézina LP, D'Aoust MA, Rudd PM, Royle L, Dwek RA, Harvey DJ, Lerouge P, Cremata JA, Bardor M. Plant N-glycan profiling of minute amounts of material. **Anal Biochem.** 2008 Aug 1;**379(1):66-72.**
2. Leyva A, Quintana A, Sánchez M, Rodríguez EN, Cremata J, Sánchez JC. Rapid and sensitive anthrone-sulfuric acid assay in microplate format to quantify carbohydrate in biopharmaceutical products: method development and validation. **Biologicals.** 2008 Mar;**36(2):134-41.**
3. Montesino R, Toledo JR, Sánchez O, Sánchez A, Harvey DJ, Royle L, Dwek RA, Rudd PM, Gerwig GJ, Kamerling JP, Cremata JA. Monosialylated biantennary N-glycoforms containing GalNAc-GlcNAc antennae predominate when human EPO is expressed in goat milk. **Arch Biochem Biophys.** 2008 Feb 15;**470(2):163-75.**
4. Sánchez O, Barrera M, Rodríguez MP, Frías MT, Figueroa NE, Naranjo P, Montesino R, Farnos O, Castell S, Venereo A, Ganges L, Borroto C, Toledo JR. Classical swine fever virus E2 glycoprotein antigen produced in adenovirally transduced PK-15 cells confers complete protection in pigs upon viral challenge. **Vaccine.** 2008 Feb 13;**26(7):988-97.**
5. Toledo JR, Sánchez O, Montesino R, Farnos O, Rodríguez MP, Alfonso P, Oramas N, Rodríguez E, Santana E, Vega E, Ganges L, Frias MT, Cremata J, Barrera M. Highly protective E2-CSFV vaccine candidate produced in the mammary gland of adenoviral transduced goats. **J Biotechnol.** 2008 Feb 1;**133(3):370-6.**
6. Bardor M, G. Cabrera, J. Stadlmann, P. Lreouge, J. A. Cremata, V. Gomord and A-C Fitchette. N-Glycosylation of Plant Recombinant Pharmaceuticals. **Methods in Biotechnology 2008 (Ed. Loic Fayé)**
7. Sanchez O, Montesino R, Toledo JR, Rodriguez E, Diaz D, Royle L, Rudd PM, Dwek RA, Gerwig GJ, Kamerling JP, Harvey DJ, Cremata JA. The goat mammary glandular epithelial (GMGE) cell line promotes polyfucosylation and N,N'-diacetyllactosedi-aminylation of N-glycans linked to recombinant human erythropoietin. **Arch Biochem Biophys.** 2007 Aug 15;**464(2):322-34.**
8. Bardor M, Cabrera G, Rudd PM, Dwek RA, Cremata JA, Lerouge P. Analytical strategies to investigate plant N-glycan profiles in the context of plant-made pharmaceuticals. **Curr Opin Struct Biol.** 2006 Oct;**16(5):576-83.**
9. Toledo JR; Sanchez Ramos O, Montesino R, Fernández Y; Rodríguez MP, Cremata JA. Differential *in vitro* and *in vivo* glycosylation of human erythropoietin expressed in adenovirally transduced mouse mammary epithelial cells. **BBA - General Subjects (2005) 1726, 48-56.**
10. Triguero A, Cabrera G, Cremata JA, Yuen CT, Wheeler J, Ramírez NI. Plant-derived mouse IgG monoclonal antibody fused to KDEL Endoplasmic Reticulum-retention signal is N-glycosylated homogeneously throughout the plant with mostly high-Mannose type N-glycans. **Plant Biotechnol J.** 2005 Jul;**3(4):449-57.**
11. Cabrera G, Cremata JA, Valdés R, García R, González Y, Montesino R, Gómez H, González M. Influence of the proliferation conditions in the N-glycosylation profiles of a

- monoclonal antibody specific against the rHBsAg. **Biotechnol Appl Biochem.** 2005 Feb;41(Pt 1):67-76.
12. González LJ, Cremata JA, Guanche Y, Ramos Y, Triguero A, Cabrera G, Montesino R, Huerta V, Pons T, Boué O, Farnós O, Rodríguez M. The cattle tick antigen, Bm95, expressed in *Pichia pastoris* contains short-chains of N- and O-glycans. **Arch Biochem Biophys.** 2004 Dec 15;432(2):205-11.
 13. Cremata JA, Sorell L, Montesino R, Garcia R, Mata M, Cabrera G, Galvan JA, Garcia G, Valdes R, Garrote JA. Hypogalactosylation of serum IgG in patients with Coeliac Disease. **Clin Exp Immunol.** 2003 Sep;133(3):422-9.
 14. Yuen CT, Storrington PL, Tiplady RJ, Izquierdo M, Wait R, Gee CK, Gerson P, Lloyd P, Cremata JA. Relationships between the N-glycan structures and biological activities of recombinant human erythropoietins produced using different culture conditions and purification procedures. **Br J Haematol.** 2003 May;121(3):511-26.
 15. Betancourt LH, García R, González J, Montesino R, Quintero O, Takao T, Shimonishi Y, Cremata JA. Dextranase (α -1,6 glucan-6-hydrolase) from *Penicillium minioluteum* expressed in *Pichia pastoris*: Two host cells with minor differences in N-glycosylation. **FEMS Yeast Res.** 2001 Jul;1(2):151-60.
 16. Montesino R, Nimitz M, Quintero O, García R, Falcón V, Cremata JA. Characterization of the oligosaccharides assembled on the *Pichia pastoris*-expressed recombinant Aspartic protease. **Glycobiology.** 1999 Oct;9(10):1037-43.
 17. Montesino R, Quintero O, García R and Cremata JA. Glycosylation profiling of heterologous protein expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. In: **Methods in Molecular Biology. Pichia protocols.** Ed. James Cregg and David Higgins. Humana Press (1998) Vol. 103, Chap. 8, 95-105.
 18. Quintero O, Montesino R, Cremata JA. Two-Dimensional mapping of 8-amine-1,3,6-naphthalene trisulfonic acid derivatives of N-linked neutral and sialyl oligosaccharides. **Anal Biochem.** 1998 Feb 1;256(1):23-32.

Laboratorio de Microscopía Electrónica



Dr. Viviana Falcón
Líder del Laboratorio

Descripción

Nuestro laboratorio se enfoca en el uso de la microscopía electrónica para el diagnóstico de virus, parásitos, bacterias y otros microorganismos; para el control de calidad de proteínas recombinantes; para la detección de antígenos virales a través de la Inmunomicroscopía Electrónica; así como el estudio de patogénesis de enfermedades a los cuales se le aplica las diferentes proteínas recombinantes.

Publicaciones

1. Falcon V, Menendez I, Acosta-Rivero N, Shibayama M, de la Rosa M-C, Luna- Munoz J, Miranda-Sanchez M, Gavilondo JV, Lopez D, Duenas-Carrera S, Gra B, Chinea G, Tamayo Garcia L, Garcia W, Vidal E, Arus-Soler E, Silva J, Alvarez F, Acosta EF, Seoane J, Morales-Grillo J, Penton E, Kouri J, Tsutsumi V. Ultrastructural Evidences of Hepatitis B Infection in Human Liver Biopsies Disclose Complex Assembly and Morphogenesis

Pathways for Hepatitis B Virus. **American Journal of Infectious Diseases 2008; 4(2):97-103.**

2. Falcón V, Shibayama M, Menéndez I, de la Rosa MC, Luna- Muñoz J, Miranda-Sánchez M, López D, Dueñas-Carrera S, Gra B, García W, Vidal E, Arús Soler E, Silva J, Acosta-Rivero N, Álvarez F, González M, Acosta EF, Seoane J, Morales-Grillo J, Kouri J, Tsutsumi V. Novelties in the Hepatitis C Virus study by using confocal and electron microscopy. **Acta Microscopica 2007 16(1-2,Supp.2):23**
3. Acosta Medina E, González Bravo M, Ramírez Carmenate Z, Falcón Cama V, Hernández Pérez M, Menéndez Valdés I. Software Educativo de microfotografías ópticas y electrónicas de modelos celulares para la disciplina Histología. **Acta Microscopica 2007 16(1-2,Supp.2):246**
4. Acosta-Rivero N, Aguilera Y, Falcon V, Poutou J, Musacchio A, Alvarez-Lajonchere L, Guerra I, Alvarez-Obregon JC, Amador-Canizares Y, Martinez-Donato G, Marante J, Aguilar JC, Soria Y, Alvarez F. Ultrastructural and immunological characterization of hepatitis C core protein-DNA plasmid complexes. **American Journal of Immunology 2006 July 1, 2(3): 71-6.**
5. Falcón V, Acosta-Rivero N, de la Rosa MC, Menéndez I, Dueñas-Carrera S, Lopez D, Fernández-Ortega C, Casillas D, Morales J, Gra B, García W, Vilar E, González Bravo M, Shibayama M, Luna-Munoz J, Miranda-Sanchez M, Kouri J, Tsutsumi V. Evidences of Hepatitis C Virus Replication in Hepatocytes and Peripheral Blood Mononuclear Cells from Patients Negative for Viral RNA in Serum. **American Journal of Infectious Diseases 2005. 1(1):34-42.**
6. Falcón V, Acosta-Rivero N, Gavilondo J, de la Rosa MC, Menéndez I, Dueñas-Carrera S, Silva J, China G, Alvarez F, Morales J, Gra B, García W, González Bravo M, Shibayama M, Luna-Munoz J, Miranda-Sanchez M, Kouri J, Tsutsumi V. Detection of HCV Components and Pathological Reactions in Apoptotic Hepatocytes from Chronically HCV-infected Patients. **American Journal of Infectious Diseases 2005. 1(1):12-24.**
7. Acosta-Rivero N, Rodriguez A, Mussachio A, Poutou J, Falcon V, Torres D, Aguilar JC, Linares M, Alonso M, Perez A, Menendez I, Morales-Grillo J, Marquez G, Dueñas-Carrera S. A C-terminal truncated hepatitis C virus core protein variant assembles in vitro into virus-like particles in the absence of structured nucleic acids. **Biochem Biophys Res Commun. 2005 Sep 2;334(3):901-6. Erratum in: Biochem Biophys Res Commun. 2005 Nov 11;337(1):410. Poutu, Johana [corrected to Poutou, Joanna].**
8. Falcón V, Acosta-Rivero N, Shibayama M, China G, Gavilondo JV, de la Rosa MC, Menéndez I, Gra B, Dueñas-Carrera S, Viña A, García W, González-Bravo M, Luna-Munoz J, Miranda-Sanchez M, Morales-Grillo J, Kouri J, Tsutsumi V. HCV core protein localizes in the nuclei of nonparenchymal liver cells from chronically HCV-infected patients. **Biochem Biophys Res Commun. 2005 Apr 22;329(4):1320-8.**
9. Falcón V, Acosta-Rivero N, Shibayama M, Menéndez I, de la Rosa MC, Gra B, Dueñas-Carrera S, García W, Vilar E, Silva J, Lopez D, González-Bravo M, Acosta EF, Seoane J, Morales J, Kouri J, Tsutsumi V. Evidencias de la infección por el virus C de la Hepatitis en biopsias hepáticas detectadas por la microscopia óptica y electrónica. **Acta Microscópica, 2004, 13(1-2):1-13.**
10. Falcón V, Acosta-Rivero N, China G, de la Rosa MC, Menéndez I, Dueñas-Carrera S, Gra B, Rodriguez A, Tsutsumi V, Shibayama M, Luna-Munoz J, Miranda-Sanchez MM, Morales-Grillo J, Kouri J. Nuclear localization of nucleocapsid-like particles and HCV core

protein in Hepatocytes of a chronically HCV-infected patient. **Biochem Biophys Res Commun. 2003 Oct 10;310(1):54-8.**

11. Falcon V, Acosta-Rivero N, China G, Gavilondo J, de la Rosa MC, Menendez I, Dueñas-Carrera S, Viña A, Gra B, Noa M, Alvarez F, Rodriguez J, Morales J. Detection of HCV-related Structures in the mitochondria of apoptotic hepatocytes in the liver biopsies from chronically HCV-infected patients. **Microscopy and Microanalysis 2003, 9(Spurr2):1424-5**
12. Falcon V, Acosta-Rivero N, China G, Gavilondo J, de la Rosa MC, Menendez I, Dueñas-Carrera S, Viña A, Gra B, Noa M, Alvarez F, Rodriguez J, Morales J. Detection of HCV Core Protein in the Nuclei of Different Cell Types and in the Extra cellular Matrix in Liver Biopsies from HCV-infected Patients. **Microscopy and Microanalysis 2003, 9(Spurr2):1422-3.**
13. Falcón V, Acosta-Rivero N, China G, Gavilondo J, de la Rosa MC, Menéndez I, Dueñas-Carrera S, Viña A, García W, Gra B, Noa M, Reytor E, Barceló MT, Alvarez F, Morales-Grillo J. Ultrastructural evidences of HCV infection in Hepatocytes of chronically HCV-infected patients. **Biochem Biophys Res Commun. 2003 Jun 13;305(4):1085-90.**
14. Falcón V y cols. Ultrastructural study in the Epidermal Growth factor-mediated hepatoprotection in rats intoxicated with carbon tetrachloride **Acta Microscopica 2001, octubre:579-60.**
15. Falcón V y cols. Similarities of Hepatitis C virus and Hepatitis B virus in antigen expression of recombinant subviral particles in *P. pastoris*. **Acta Microscopica 2001, octubre:442-3.**
16. Falcón V *et al.* Hepatoprotective effects of epidermal growth factor on carbon tetrachloride induced liver injury in rats. **Electron Microscopy 1998 4:533-4.**
17. Falcón V *et al.* Determination of the expression at ultrastructural and inmunocytochemical level of the GP 120, GP 41, P 24 and P 36 Proteins of Human Inmunodeficiency virus (HIV) in *E. coli*. **Acta Microscópica 1995 4:22-3.**
18. Mas P, Falcón V *et al.* Resultados preliminares del laboratorio virológico en estudio de casos de Neuropatía Epidémica cubana. **Boletín epidemiológico (IPK) 1: 7-8.**
19. Falcón V *et al.* Study by transmission electron microscopy of virus strains isolated from cerebrospinal fluid of patients with epidermic neuropathy. **BA 1994; 11(2):151-59.**
20. Falcón V *et al.* Kinetic study of the transference process of heterologos DNA into Myeloma cells by mice spermatozoa employing Electron Microscopy. **Acta Microscópica 1:53.**
21. Fernández D, Miranda A, Falcón V *et al.* A Diagnostic Dipstick for rotavirus in faces the use of colloidal selenium as marker. **BA 1993; 10(3):217-21.**
22. Falcón V *et al.* Ultrastructural and inmunocytochemical characteristics of hepatocytes from hepatitis B Virus infected chimpanzees. **Tissue & Cell 1993 25(6):865-73.**

Sección de Síntesis Química



Dr. Osvaldo Reyes
Líder del Laboratorio

Descripción

Esta sección tiene dos líneas de trabajo fundamentales: síntesis en fase sólida y purificación de oligonucleótidos y oligonucleótidos modificados, y la síntesis y purificación de péptidos.

Hasta el momento se han sintetizado más de 1600 moléculas diferentes. La capacidad actual del grupo incluye la síntesis desde pocos miligramos hasta decenas de gramos de cualquier secuencia. Se realizan también varias modificaciones químicas entre las que se encuentran la ciclación por puentes disulfuros y por lactamas, las modificaciones de los grupos aminos, la conjugación a otras macromoléculas, la polimerización por enlaces disulfuros y la obtención de estructuras complejas como los péptidos multiantigénicos, la obtención de bibliotecas combinatorias, entre otras.

El desarrollo hacia posibles candidatos terapéuticos de péptidos sintéticos, así como el estudio y el diseño de procesos para el escalado de la producción de estas moléculas, también forma parte del objetivo de trabajo del grupo.

Publicaciones

1. Perea SE, Reyes O, Baladron I, Perera Y, Farina H, Gil J, Rodriguez A, Bacardi D, Marcelo JL, Cosme K, Cruz M, Valenzuela C, López-Saura PA, Puchades Y, Serrano JM, Mendoza O, Castellanos L, Sanchez A, Betancourt L, Besada V, Silva R, López E, Falcón V, Hernández I, Solares M, Santana A, Díaz A, Ramos T, López C, Ariosa J, González LJ, Garay H, Gómez D, Gómez R, Alonso DF, Sigman H, Herrera L, Acevedo B. CIGB-300, a novel proapoptotic peptide that impairs the CK2 phosphorylation and exhibits anticancer properties both in vitro and in vivo. **Mol Cell Biochem.** 2008 Jun 25. [Epub ahead of print]
2. Junco JA, Basalto R, Fuentes F, Bover E, Reyes O, Pimentel E, Calzada L, Castro MD, Arteaga N, López Y, Hernández H, Bringas R, Garay H, Peschke P, Bertot J, Guillén G. Gonadotrophin releasing hormone-based vaccine, an effective candidate for prostate cancer and other hormone-sensitive neoplasms. **Adv Exp Med Biol.** 2008;617:581-7.
3. Perera A., Mather SJ., Stalteri M., Allison D., Prats A., Hernández A., Reyes O., Bequet M 99mTc-Labeling and in vitro characterization of N4 and N3S-RGDS-derivative peptides. **J Radioanal Nucl Chem.** 2008; 275 (3): 619-626
4. Junco JA, Peschke P, Zunab I, Ehemannnd V, Fuentes F, Bover E, Pimentel E, Basulto R, Reyes O, Calzada L, Castro MD, Arteaga N, Lopez Y, Garay H, Hernandez H, Bringas R, Guillen GE. Immunotherapy of prostate cancer in a murine model using a novel GnRH based vaccine candidate. **Vaccine.** 2007 Dec 5;25(50):8460-8.
5. Silva JA, Carpio Y, Rodríguez E, Estrada RC, Estrada MP. Small interfering RNA induced knockdown of green fluorescent protein using synthetic RNA molecules. **BA.** 2007; 24(1):49-52.
6. Rodríguez H, Martín O, Ochoa E, Suárez M, Reyes O, Garay H, Albericio F, Martín Nazario. Solid-Phase Synthesis and Structural Study of Substituted 1,4,5,6-Tetrahydro-6-oxopyridine-3-carboxylic Acids. **QSAR & Combinatorial Science.** 2006;25(10):921-7.
7. Immunotherapy with CTL peptide and VSSP eradicated established human papillomavirus (HPV) type 16 E7-expressing tumors. Torrens I, Mendoza O, Batte A, Reyes O, Fernandez LE, Mesa C, Guillen G. **Vaccine.** Aug 17. 2006.
8. SE. Perea, O Reyes, Y Puchades, O Mendoza, NS. Vispo, I Torrens, A Santos, R Silva, B Acevedo, E Lopez, V Falcon and DF. Alonso. Antitumor Effect of a Novel Proapoptotic Peptide that Impairs the Phosphorylation by the Protein Kinase 2 (Casein Kinase 2). **Cancer Reseach,** 64, 7127-71-29, 2004.

9. Reyes O, Torrens I, Ojalvo AG, Seralena A, Garay HE. Profiling the immune response of human patients treated with recombinant SK after myocardial infarct. ***Mol Divers.* 2004;8(3):251-6**
10. Hortensia Rodríguez, Osvaldo Reyes, Margarita Suarez, Hilda E. Garay, Rolando Pérez, Luis Javier Cruz, Yamila Verdecia, Nazario Martín and Carlos Seoane. Solid-phase synthesis of 4-aryl substituted 5-carboxy-6-methyl-3,4-dihydropyridones. ***Tetrahedron Letters* 43 (2002) 439–441.**
11. O. Reyes, MG. Vallespí, HE. Garay, LJ. Cruz, LJ. González, G. Chinaea, W. Buurman and MJ. Araña. Identification of Single Amino Acid Residues Essential for the Binding of Lipopolysaccharide (LPS) to LPS Binding Protein (LBP) Residues 86–99 by Using an Ala-scanning Library. ***J. Peptide Sci.* 8: 144–150 (2002).**
12. Pérez R, Reyes O, Suarez M, Garay HE., Cruz LJ., Rodríguez H, Molero-Vilchez MD. and Ochoa C. Solid Phase Synthesis of 3-(5'-Carboxypentyl)-5-Substituted Tetrahydro- 2H-1,3,5-Thiadiazin-2-Thione Derivatives. ***Tetrahedron Letters* 2000, Vol. 41, No. 5 pp. 613.**
13. Garay HE., Niebla O, González LJ, Menéndez T, Cruz LJ. and Reyes O. Disulfide bond polymerization of a cyclic peptide derived from the surface loop 4 of OMP of *Neisseria meningitidis*. ***LIPS* 2000, Vol 7, No. 2, 97-105.**
14. Rolando Pérez, Hortensia Rodríguez, Eduardo Pérez, margarita Suarez, Osvaldo Reyes, Luis J. González, Adela López, Olga Ezpeletela, Concepción Pérez and Carmen Ochoa. Study on the decomposition products of Thiadiazinthione and their anti-cancer properties. ***Arzneimittel Forschung/Drug Research*, 2000; vol. 50 (II), 854-857.**
15. Ojalvo AG., Torrén I., Reyes O., Seralena A., & de la Fuente J. (1999). Recombinant streptokinase with reduced immunoreactivity. ***Thromb. Haemost. Suppl.* 82: 260**
16. Torrens I, Reyes O, Ojalvo AG, Seralena A, Chinaea G, Cruz L J, de la Fuente J. Mapping of the Antigenic Regions of Streptokinase in Humans after Streptokinase Therapy. ***Biochem Biophys Res Commun* 1999 May 27; 259 (1): 162-168.**
17. Síntesis de un nuevo fosforamidito nucleosídico biotinilado para la preparación de oligonucleótidos multibiotinilados. José Angel Silva, Víctor Jiménez, Magalys Campos. ***Biotechnología Aplicada* 1998; 15(3): 154-158.**
18. Síntesis en Fase Sólida de un Péptido Fluoresceinado para la Determinación Cualitativa de Proteasas. Osvaldo Reyes, Ignacio Figueroa, Hilda E. Garay, Luis J. González y Luis J. Cruz. ***Biotechnología Aplicada* (1996), vol. 13, No. 2, 101-104.**
19. Jimenez V, Güimil R et al, Síntesis total del gen de la eritropoyetina humana, ***Biotechnología Aplicada* 1991, 8 (3): 326-334**
20. Jimenez V, Güimil R, Ubieta R, Ochagavía ME, Villegas G, Herrera L. Síntesis químico-enzimática del gen de la proinsulina humana ***Biotechnología Aplicada* 1990, 7 (2): 326-334.**