

17 y 18 de setiembre de 2026

Torre de las Telecomunicaciones de Antel, Montevideo

LIBRO DE RESÚMENES

1- Trabajos seleccionados para presentación oral

Mesa I. Metabolismo y Bioquímica celular

Presentación oral #1

Bbs4-Fstl1-cilia primaria como un nuevo eje regulador en el desarrollo del tejido adiposo.

Ileana Sosa Redaelli[1] , Lucía Guggeri[1] , Natalia Rego[2] , Matías Fabregat[3] , Victoria Prieto-Echagüe[1], Paola Lepanto[1] & José Badano[1]

(1) Laboratorio de Genética Molecular Humana, Institut Pasteur de Montevideo. (2) Unidad de Bioinformática, Institut Pasteur de Montevideo; Laboratorio de Genómica Evolutiva, Facultad de Ciencias, UDELAR (3) Department of Medicine, University of Wisconsin-Madison School of Medicine and Public Health, Madison, WI, USA.

Las cilias primarias son organelos presentes en la mayoría de los tipos celulares de vertebrados y desempeñan funciones de señalización en procesos como la diferenciación, metabolismo y homeostasis celular. Los defectos en estos organelos dan lugar a un amplio espectro de enfermedades humanas, denominadas colectivamente ciliopatías. Entre ellas se encuentra el síndrome de Bardet-Biedl (BBS) que se asocia a mutaciones en más de 20 genes codificantes para las proteínas BBS, mediadoras del transporte de vesículas hacia y desde la cilia. Una de las características clínicas distintivas del BBS es el desarrollo de obesidad que surge como resultado de defectos de señalización asociados a las cilias tanto en el sistema nervioso central como en tejidos periféricos. Observaciones previas de nuestro grupo indican que BBS4 regula la secreción de FSTL1, la cual, a su vez, afecta la formación de la cilia primaria y modula la diferenciación de adipocitos en cultivo. Sin embargo, desconocíamos cuál era la relevancia de este eje en la formación del tejido adiposo in vivo. Utilizando organismos KO, encontramos que la pérdida de bbs4 da como resultado un aumento en la acumulación de grasa, similar a lo que ocurre en pacientes, mientras que la falta de fstl1a produce el efecto opuesto. Para comprender cómo surge este fenotipo realizamos un análisis de RNA-seq en muestras de tejido adiposo de pez cebra. Por medio del análisis bioinformático de estos datos, identificamos un conjunto de genes con patrones de expresión opuestos entre los mutantes bbs4 y fstl1a. Esta observación incluye genes relacionados a la señalización mediada por insulina, las vías de transducción de señales asociadas a las cilias, la adhesión celular y la remodelación de la matriz extracelular, así como la señalización por interferón y el inflamasoma NLRP3, entre otros procesos biológicos. En conjunto, nuestros resultados apoyan la participación de un eje BBS4-FSTL1-cilia en la regulación del desarrollo del tejido adiposo in vivo y brindan nuevas pistas sobre los procesos celulares que podrían dar lugar a los fenotipos observados.

Presentación oral #2

No todo el NADPH de los glóbulos rojos humanos está disponible como cosustrato de las enzimas antioxidantes.

Nicolás Silva[123], Leonor Thomson[2], Matias Möller[1]

(1) Laboratorio de Fisicoquímica Biológica, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. (2) Laboratorio de Enzimología, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. (3) Carrera Técnico en Hemoterapia, Unidad Académica de Hemoterapia y Medicina Transfusional, Facultad de Medicina, Universidad de la República.

En los glóbulos rojos humanos, el NADPH desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis redox al actuar como cosustrato clave para diversos sistemas enzimáticos de detoxificación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En este trabajo, utilizamos un método de ciclado enzimático para cuantificar NADPH y $NADP^+$. La cuantificación diferencial se basa en calentar la muestra a 60 °C durante 30 minutos, lo que descompone el $NADP^+$ de manera selectiva. Así, la muestra no tratada proporciona el NADP “total” (NADPH + $NADP^+$) y la muestra tratada térmicamente proporciona únicamente NADPH. Curiosamente, nuestros resultados mostraron de manera consistente que las muestras tratadas con calor presentaban niveles de NADPH superiores a los del NADP "total". Análisis Pósteriores revelaron que el NADPH unido a proteínas no estaba disponible para su cuantificación mediante el método enzimático hasta después del calentamiento. La fracción de NADPH fuertemente unida a proteínas se evidenció al demostrar que el NADPH permanecía en la fracción proteica al separar el lisado de glóbulos rojos en componentes de alto y bajo peso molecular utilizando una columna PD10 desalinizadora, así como filtrando el lisado con un filtro de 10 kDa. En ese sentido, las concentraciones de NADPH en la fracción de bajo peso molecular de eritrocitos expuestos a concentraciones crecientes de H_2O_2 se mantuvieron estables hasta aproximadamente 10 µM de H_2O_2. Por encima de esta concentración, los niveles de NADPH libre disminuyeron significativamente, lo que sugiere un rápido reciclaje del NADPH libre a través de la vía de las pentosas fosfato hasta un límite, mientras que los niveles de NADPH unido a proteínas permanecieron estables. Nuestros resultados demuestran de manera consistente una alta afinidad de unión del NADPH a las proteínas eritrocitarias y llaman la atención sobre su limitada disponibilidad redox en la célula. Nuestras investigaciones futuras se centran en la identificación de las proteínas específicas de unión a NADPH y su contribución relativa a las defensas antioxidantes de los glóbulos rojos humanos.

Presentación oral #3

CD147 regula el ciclo celular y el metabolismo mitocondrial en células metastásicas de cáncer de próstata

Rodrigo Martino-Kunsch[1], Jennyfer Martínez[2], Celia Quijano[2], Lucia Pastro[1], Santiago Fontenla[1], Mercedes Rodriguez-Teja[1].

(1) Unidad académica de genética, Facultad de Medicina, Udelar. (2)Unidad académica de bioquímica, Facultad de Medicina, Udelar

La glicoproteína de membrana CD147 (Basigin/EMMPRIN) ha sido implicada en la progresión tumoral y el desarrollo metastásico de diversos tipos de cáncer. En este trabajo evaluamos el vínculo entre la expresión de CD147, la regulación del ciclo celular, el metabolismo energético mitocondrial y propiedades asociadas al fenotipo metastásico en la línea metastásica ósea de cáncer de próstata PC-3. Para ello generamos una línea knockdown de CD147 y su correspondiente control. Analizamos el ciclo celular mediante citometría de flujo y la expresión de marcadores asociados al ciclo celular. La actividad metabólica se determinó mediante la medición de las tasas de consumo de oxígeno y de acidificación extracelular. Además, evaluamos la migración celular mediante ensayos de herida y la capacidad clonogénica mediante formación de colonias. El silenciamiento de CD147 produjo, en comparación con las células control: 1) un aumento en la proporción de células en fase G2/M y una disminución en G1; 2) un incremento en la expresión de Ki67; 3) una disminución significativa del consumo de oxígeno; y 4) una menor capacidad migratoria en conjunto con una reducción en la formación de colonias. También se analizó el proteoma de las líneas celulares mediante proteómica cuantitativa. El análisis funcional inicial mostró un enriquecimiento de procesos relacionados con el metabolismo energético mitocondrial entre las proteínas con menor expresión, incluyendo el ciclo de Krebs, la respiración aeróbica y la fosforilación oxidativa. En contraste, las proteínas con mayor expresión o exclusivas de la condición knockdown mostraron un enriquecimiento de procesos asociados a la señalización por receptores de factores de crecimiento, incluyendo las vías de FGFR, PI3K/AKT y MAPK, y a la regulación del ciclo celular, particularmente procesos asociados a CDK4/CDK6 y la transición G1/S. Asimismo, se observó un enriquecimiento de procesos relacionados con la glucólisis y el metabolismo central del carbono. En conjunto, estos resultados sugieren que CD147 participa en la regulación coordinada de procesos bioenergéticos y proliferativos asociados al mantenimiento del fenotipo metastásico en cáncer de próstata.

Presentación oral #4

Evaluación de la capacidad de un extracto de orujo de uva Tannat para modular el estrés metabólico en un modelo de diabetes tipo 2 de *Drosophila melanogaster.*

Andrea Duarte[1], Facundo Brizolara[1], Aníbal M.Reyes[3,4,5], Mauricio Mastrogiovanni [3,4,5], Rafael Radi[3,4,5], Nicolás Tobar[6]*, Adrián Aicardo[3,4,5,7]*, Carmen Bolatto[1,2]*.

(1) Laboratorio de Biología del Desarrollo, Unidad Académica de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de la República. (2) Departamento de Neurobiología y Neuropatología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Ministerio de Educación y Cultura. (3) Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República. (4) Centro de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República. (5) Programa en Alimentos y Salud, Facultad de Medicina, Universidad de la República. (6) Laboratorio de Biología Celular y Molecular. Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos, Universidad de Chile, Chile. (7) Departamento de Nutrición Clínica, Escuela de Nutrición, Universidad de la República. * miembros REDLANN (Red Latinoamericana de Neuroprotección y Nutrigenómica).

El consumo excesivo de azúcares simples promueve un estado de hiperglucemia, resistencia a la insulina, estrés oxidativo, neurodegeneración e inflamación crónica de bajo grado, alterando la homeostasis celular y la función de tejidos de alta demanda energética. Dada la conservación evolutiva de las vías metabólicas, *Drosophila melanogaster* se ha consolidado como un modelo para el *screening* de compuestos bioactivos con potencial terapéutico. Entre ellos destacan los polifenoles, metabolitos secundarios de origen vegetal con reconocidas propiedades antiinflamatorias y antioxidantes. El orujo de uva, subproducto de la industria vitivinícola, constituye una fuente sostenible y de bajo costo de estas moléculas. El presente trabajo evaluó si la suplementación dietaria con extracto de orujo de uva Tannat era capaz de prevenir algunas de las alteraciones metabólicas y/o funcionales inducidas por una dieta alta en sacarosa (High Sugar Diet, HSD) en *Drosophila melanogaster.* Para ello, se analizó el efecto de tres concentraciones del extracto (0,01%, 0,05% y 0,1%) sobre la glicemia (concentración de glucosa circulante en hemolinfa), la supervivencia, la geotaxis negativa (escalada / *climbing*), la fototaxis y la organización rabdomérica de los fotorreceptores de la retina. Los resultados obtenidos, en concordancia con lo previamente reportado, mostraron que las moscas alimentadas con HSD presentaron un incremento de la glicemia, una disminución de la supervivencia y un deterioro de la respuesta fototáctica, así como alteraciones en la organización de los fotorreceptores. La suplementación con extracto de orujo de uva Tannat, particularmente al 0,05%, redujo significativamente los niveles de glicemia e incrementó la esperanza media de vida, mejorando la respuesta fototáctica y el desempeño motor. En conjunto, estos resultados indican que el extracto de orujo de uva Tannat atenúa las alteraciones inducidas por una dieta rica en sacarosa, preservando la homeostasis celular y la función de los tejidos sensibles al estrés metabólico en *Drosophila melanogaster*. La

conservación evolutiva de las vías implicadas otorga relevancia traslacional al modelo y respalda el potencial del orujo de uva Tannat como fuente sostenible de compuestos bioactivos con aplicación nutracéutica.

Mesa II. Estado del arte de aplicaciones de transcriptómica en célula única en Uruguay

Presentación oral #5

Descubrimiento de nuevos genes ciliares mediante aprendizaje automático

Torriglia, Emilia[1]; Irigoin, Florencia[2,3]; Romanelli-Cedrez, Laura[4]; Pazos Obregón, Flavio[1]

(1) Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas, IIBCE - Institut Pasteur de Montevideo (2) Unidad Académica de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de la República (3) Laboratorio de Genética Molecular Humana, Institut Pasteur de Montevideo (4) Laboratorio de Biología de Gusanos, Institut Pasteur de Montevideo

La cilia primaria es un organelo evolutivamente conservado presente en muchas células eucariotas, donde desempeña un papel central en la señalización celular y la percepción del entorno. A pesar de su importancia, el conjunto completo de genes necesarios para su estructura y función aún no se conoce en su totalidad. *Caenorhabditis elegans* constituye un sistema modelo de gran utilidad para estudiar la biología ciliar debido a su sistema nervioso bien caracterizado y a la facilidad de manipulación genética y experimental, lo que permite identificar mecanismos conservados entre especies. Planteamos la hipótesis de que los genes asociados a la función ciliar comparten características basadas en su expresión y otros rasgos biológicos, independientes de la similitud de secuencia de ADN, que pueden utilizarse para su identificación. Para investigar esta hipótesis, se emplearon datos de transcriptómica *single cell* y de localización genómica de grupos funcionales. Los conjuntos de datos transcriptómicos fueron elaborados a partir de datos públicos de scRNA-seq (Packer *et al*., 2019; Taylor *et al*., 2021). Estos conjuntos de datos incluyen tipos celulares neuronales de diferentes etapas del desarrollo, que comprenden tanto poblaciones ciliadas como no ciliadas, y fueron integrados antes del análisis. Los genes se filtraron según su expresión en distintos tipos celulares y su varianza en los diferentes tipos celulares. Los valores de expresión se estandarizaron y se aplicó clustering jerárquico aglomerativo. El análisis de enriquecimiento permitió identificar clusters sobrerrepresentados en genes ciliares, a partir de los cuales se definieron genes candidatos. Las *Functional Landscape Arrays* (FLAs) son una representación numérica del contexto genómico de un gen. Se construyeron

utilizando ventanas genómicas de distintos tamaños alrededor de cada gen y cuantificando la presencia de grupos funcionales en esas regiones. De esta forma, cada gen queda descrito por un conjunto de características que reflejan la organización funcional de su vecindario genómico. Estas matrices fueron utilizadas como *features* para el entrenamiento y la evaluación de clasificadores de diferente naturaleza. Con base en estos resultados, se seleccionó el clasificador de mejor desempeño y se utilizó para generar una segunda lista de genes candidatos. Como trabajo futuro, se incorporarán características biológicas adicionales independientes de la secuencia de ADN, como los motivos estructurales o las interacciones tridimensionales en el genoma. También se evaluará la *performance* de los métodos descritos definiendo nuevas listas de genes ciliares, subdivididas según su ubicación en la cilia y su función específica.

Presentación oral #6

Expresión diferencial de ARNm de proteínas ribosomales entre subtipos neuronales

Joaquín Garat[1], Natalia Ortiz[1], Sofía Niño-Rivero[2], Patricia Lagos[2], Andrés Di Paolo[1], Pablo Smircich[3,4], José Sotelo-Silveira[1,5]

(1) Departamento de Genómica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. (2) Unidad Académica de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República. (3) Laboratorio de Bioinformática, Departamento de Genómica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. (4) Sección Genómica Funcional, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. (5) Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

Actualmente se conoce que las proteínas ribosomales (RP) pueden cumplir funciones regulatorias, extendiendo su rol más allá de su función estructural clásica en el ribosoma. Diversos estudios han mostrado además la existencia de heterogeneidad ribosomal a múltiples niveles, con posibles implicancias funcionales. En este contexto, nos propusimos analizar los patrones de expresión de genes codificantes para RP entre subtipos neuronales. Aprovechando datos de single-cell RNA-seq de corteza e hipocampo de ratón, analizamos la expresión de ARNm de RP a resolución de subtipos neuronales. Observamos perfiles diferenciales entre neuronas excitatorias e inhibitorias, destacándose un aumento de Rps27 tanto a nivel de ARNm como de proteína en neuronas inhibitorias respecto de las excitatorias. Además, identificamos diferencias marcadas entre subclases neuronales, con 59 de 84 genes de RP diferencialmente expresados a lo largo de todas las comparaciones, incluyendo enriquecimiento de Rpl21 en neuronas Lamp5 y de Rps27 en interneuronas Vip. Estos patrones fueron consistentes entre regiones cerebrales y reproducibles en plataformas independientes (Smart-seq2 y 10x Genomics), y se mantuvieron estables bajo condiciones de envejecimiento y estrés. En conjunto, presentamos un atlas de expresión de RP con resolución de subclases neuronales que revela firmas

transcripcionales robustas y específicas. En paralelo, estamos desarrollando una estrategia que combina metodologías de single-cell RNA-seq con microdisección axonal para secuenciar transcriptomas de axones individuales de raíces ventrales y dorsales de ratas adultas. Este enfoque permitirá caracterizar el repertorio de ARNm presentes en axones individuales, identificar posibles diferencias entre tipos neuronales y determinar qué ARNm codificantes para RP están presentes en estos compartimentos, analizando la heterogeneidad a nivel de proyecciones neuronales y complementando el análisis previo basado en los transcritos del soma.

Mesa IV: La enseñanza en carreras STEM en la era de la IA en Uruguay

Lucía Gonzalez y Mariana Pereyra.

La irrupción de la inteligencia artificial generativa (IAG) plantea nuevos desafíos para la enseñanza en carreras STEM y obliga a repensar qué competencias deben desarrollar los futuros profesionales. No se trata solo de enseñar a utilizar herramientas de IA, sino de formar profesionales capaces de interactuar críticamente con estos sistemas, comprender sus posibilidades, limitaciones y sesgos, y aplicar el pensamiento computacional en contextos reales. Asimismo, el uso de la IA en el aula plantea interrogantes y desafíos éticos y pedagógicos en la educación superior, vinculados con la autonomía, la dependencia de plataformas externas, la privacidad y la vigilancia, que requieren marcos y orientaciones claras. En este escenario, Uruguay cuenta con una trayectoria relevante en la incorporación de tecnologías digitales a la educación pública, con el Plan Ceibal como referente regional desde 2007, y ha avanzado en el desarrollo de marcos para la enseñanza y el uso de la IA. En particular, la Udelar ha aprobado principios rectores y una hoja de ruta para su abordaje, mientras distintas facultades han desarrollado orientaciones para su uso ético y crítico. Esta mesa propone reflexionar sobre estos desafíos y oportunidades para la enseñanza en carreras STEM en la era de la IA en Uruguay.

Mesa VII. Biología Molecular Vegetal: desde los mecanismos moleculares a las aplicaciones biotecnológicas

Presentación oral #7

Caracterización de StECH2, una nueva enoil-CoA hidratasa peroxisomal de *Solanum tuberosum* con potencial participación en la respuesta de defensa

Verónica Giacri[1*], Diego Vallés[2], Alfonso Alvarez[1], Marcos Montesano[1*]

(1) Fisiología Vegetal, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. (2) Laboratorio de Biocatalizadores y sus aplicaciones, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

En estudios previos de expresión diferencial se identificó en papa (*Solanum tuberosum*) un gen inducido por factores de virulencia de *Pectobacterium wasabiae*, denominado StECH2. Los análisis bioinformáticos preliminares predijeron que codifica una proteína peroxisomal con un dominio característico de las enoil-CoA hidratasas, aunque su función permanecía sin caracterizar. En este trabajo se realizó la caracterización funcional de StECH2 mediante un abordaje que integró análisis moleculares, bioquímicos, estructurales y bioinformáticos. El análisis comparativo de secuencias mostró que StECH2 pertenece a una familia altamente conservada de enoil-CoA hidratasas peroxisomales presentes en plantas, conservando los principales dominios estructurales, residuos catalíticos y una señal de direccionamiento peroxisomal tipo PTS1. La expresión de StECH2 aumentó significativamente durante la infección por el hongo necrotrófico *Botrytis cinérea*. Ensayos de expresión transitoria en hojas de *Nicotiana benthamiana* demostraron la localización peroxisomal de la proteína y confirmaron la participación del tripéptido C-terminal SSL en su direccionamiento subcelular. La proteína recombinante StECH2 fue expresada en *Escherichia coli*, purificada mediante cromatografía de afinidad y caracterizada como un homodímero de aproximadamente 69 kDa. Los ensayos enzimáticos demostraron actividad enoil-CoA hidratasa utilizando 2-butenoil-CoA como sustrato y actividad deshidratasa sobre 3-hidroxibutiril-CoA, determinándose los parámetros cinéticos de ambas reacciones. El modelado estructural por homología confirmó la conservación de la arquitectura característica de las enoil-CoA hidratasas, mientras que los análisis de acoplamiento molecular sugirieron la interacción de StECH2 con intermediarios CoA de las vías metabólicas de auxinas, jasmonatos y salicilatos. En conjunto, los resultados demuestran que StECH2 codifica una enoil-CoA hidratasa peroxisomal funcional y amplían el conocimiento sobre las enzimas ECH2 de plantas, aportando evidencias de su posible participación en procesos metabólicos asociados a la respuesta de defensa.

Presentación oral #8

Estudio molecular de *Maize rayado fino virus* y *Maize striate mosaic virus* en plantas con achaparramiento del maíz

A. Altieri[1]; D. Simón[2]; H. Silva[3]; X. Cibils[4]; I. Ponce de León[1]; S. Stewart[4]; E. Hoffman[5]; A.K. Torrico Ramallo[6]; A. Agorio[1]

(1) Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE). (2) Laboratorio de Genómica Evolutiva, Facultad de Ciencias, Universidad de la República (UdelaR), Montevideo, Uruguay. (3) Estación Experimental Mario A. Cassinoni, Facultad de Agronomía, Universidad de la República (UdelaR), Paysandú, Uruguay. (4) Protección Vegetal, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) La Estanzuela, Colonia, Uruguay. (5) Unicampo Uruguay SRL, Paysandú, Uruguay. (6) Instituto de Patología Vegetal, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Córdoba, Argentina.

El achaparramiento del maíz es una enfermedad de alto impacto económico en América, causada por un complejo de patógenos transmitidos por la chicharrita Dalbulus maidis (vector): las bacterias Spiroplasma kunkelii y Candidatus Phytoplasma, y los virus Maize rayado fino virus (MRFV, género Marafivirus, con genoma de ARN monocatenario positivo) y Maize striate mosaic virus (MSMV, género Mastrevirus, con genoma de ADN monocatenario circular). La co-infección con estos patógenos puede generar pérdidas de rendimiento de hasta un 90%. En los últimos años, factores ambientales y de manejo habrían favorecido la expansión del vector y de la enfermedad hacia el sur del continente. En la campaña 2023-2024 se observaron por primera vez en Uruguay síntomas compatibles con la enfermedad. Ese mismo año, mediante PCR y RT-PCR, nuestro grupo detectó la presencia de los cuatro patógenos en plantas enfermas de nueve chacras del litoral oeste, confirmándose la enfermedad en Uruguay. En este trabajo profundizamos en la caracterización molecular de los dos virus del complejo. Mediante una combinación de secuenciación Sanger y NGS (RNA-seq), a partir de muestras de plantas sintomáticas, logramos reconstruir varios genomas virales completos de aislamientos uruguayos de MRFV. Los datos de RNA-seq permitieron identificar Single Nucleotide Variants (SNV) en estos virus y analizar sus respectivas frecuencias en las poblaciones virales de cada planta (así como comparar entre plantas), además de predecir las consecuencias de los SNV en las proteínas virales. Por su parte, el MSMV se replica a través de un intermediario de ADN bicatenario con transcripción bidireccional desde una región intergénica. Los resultados de RNA-seq permitieron recuperar los transcriptos virales en ambos sentidos y, a partir de estos, reconstruir una secuencia parcial correspondiente principalmente a las regiones codificantes (con alta cobertura frente a la muy baja cobertura de la región intergénica; consistente con el origen transcripcional). Análisis filogenéticos realizados para ambos virus permitieron vincular los aislados uruguayos con secuencias previamente reportadas en Brasil y Argentina. Nuestros resultados constituyen la primera caracterización

molecular de MRFV y MSMV en Uruguay, aportando las primeras secuencias genómicas disponibles para aislados locales y sentando las bases para futuros estudios epidemiológicos y de diversidad viral en la región.

Presentación oral #9

Localización de P5CS1 y acumulación de prolina bajo estrés salino e hídrico: un enfoque multiescala

Magdalena Etchemendy-Gamundi[1], Florencia Sena[1], Santiago Signorelli[1,2]

[1]Departamento de Biología Vegetal, Universidad de la República, Montevideo, 12900, Uruguay [2]School of Molecular Sciences, The University of Western Australia, Crawley, WA 6009, Australia

El estrés abiótico desencadena reajustes fisiológicos y metabólicos significativos en las plantas, siendo la biosíntesis y acumulación de prolina uno de los principales mecanismos de defensa. La Δ1-pirrolina-5-carboxilato sintetasa 1 (P5CS1) es la enzima limitante de esta vía. Si bien tradicionalmente se la considera citosólica, su compartimentalización subcelular sigue siendo controversial, ya que varios estudios sugieren una posible translocación al cloroplasto bajo condiciones de estrés. En este trabajo, investigamos la localización de P5CS1 mediante un abordaje dual: fraccionamiento celular acoplado a proteómica dirigida, y microscopía confocal de barrido láser. Los experimentos se realizaron en Arabidopsis thaliana bajo condiciones control, salinidad (150 mM NaCl, 3 días) y sequía (10-12% de capacidad de campo). Para la visualización in vivo, utilizamos líneas transgénicas que expresan P5CS1 fusionada a GFP (pUBC:P5CS1-GFP y pP5CS1:P5CS1-GFP), previamente validadas mediante caracterización bioquímica y molecular. En paralelo, buscamos dilucidar el rol funcional de la acumulación de prolina bajo estrés abiótico mediante un abordaje multi-ómico, integrando análisis proteómicos y metabolómicos. Comparamos mutantes deficientes en prolina (p5cs1.1 y p5cs1.4) contra el tipo salvaje (Col-0) bajo los regímenes de estrés mencionados. Previo al análisis ómico, estas líneas fueron extensamente caracterizadas en cuanto a sus respuestas fisiológicas y perfiles de expresión génica. Este estudio integrado busca resolver el debate sobre la localización de P5CS1 y ampliar nuestra comprensión de cómo la disponibilidad de prolina modula la homeostasis celular frente a desafíos ambientales.

Presentación oral #10

Evaluación del efecto de la deleción del gen *ipdc* sobre la biosíntesis de ácido indolacético en *Kosakonia radicincitans* UYSO10

Sofía Riotorto[1,2]*; Enzo Calzada[1,2]; Federico Battistoni[1,2]; Cecilia Taulé[1,2]

[1] Laboratorio de Interacción Planta-Microorganismo, Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas (BIOGEM), Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), Ministerio de Educación y Cultura (MEC). Uruguay. [2] Centro de Investigación en Ciencias Ambientales, IIBCE, MEC. Uruguay.

El ácido indolacético (AIA) es una fitohormona del grupo de las auxinas que desempeña un importante papel en la modulación del desarrollo vegetal. Además de las plantas, diversas bacterias rizosféricas pueden sintetizarla. Para bacterias se han reportado cinco vías de síntesis que emplean triptófano como precursor. *Kosakonia radicincitans* UYSO10 es una bacteria endófita y promotora del crecimiento vegetal. Dentro de los mecanismos de promoción identificados se encuentra la fijación biológica del N y la síntesis de AIA. Mediante análisis de su genoma, se detectó la presencia del gen *ipdC,* codificante para la enzima indol-piruvato-descarboxilasa, paso clave en la vía IPyA de síntesis de AIA. Con el fin de evaluar la contribución de esta vía a la producción total de AIA en UYSO10, en este trabajo se analizó el efecto de la deleción del gen *ipdC* mediante la comparación entre la cepa parental y la cepa mutante (Δ*ipdC*) construida previamente en el laboratorio. Para esto, se cuantificó en ambas cepas la producción de compuestos indólicos en los sobrenadantes de cultivos suplementados con triptófano. Los resultados mostraron que la síntesis de indoles en la cepa Δ*ipdC* no disminuyó en comparación con la parental. A continuación, con el fin de detectar otras posibles vías de síntesis de AIA en la cepa, se empleó la técnica de HPLC-MS utilizando estándares para la identificación y cuantificación de metabolitos intermediarios de otras vías de síntesis. Mediante esta técnica se confirmó la síntesis de AIA en ambas cepas y se identificó la presencia de los intermediarios metabólicos indol-3-acetonitrilo, triptofol e indol-3-piruvato. Finalmente, se evaluó el efecto de la inoculación de ambas cepas en plantas de caña de azúcar y en la arquitectura radicular de *Arabidopsis thaliana.* En caña de azúcar no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. En *A. thaliana, s*e observó que tanto la cepa UYSO10 como la mutante generan modificaciones en la configuración de su sistema radicular*,* y no se encontraron diferencias significativas entre ambas cepas. Estos hallazgos sugieren una redundancia funcional en la síntesis de AIA en la cepa UYSO10, donde vías como la del indol-3-acetonitrilo podrían estar activas y tener un rol tanto *in vitro* como *in planta*.

Mesa VIII. Caracterización bioquímica de lípidos y pequeñas moléculas en modelos celulares e *in vivo.*

Presentación oral #11

Terapia de Reemplazo Lipídico en un modelo de diabetes tipo 2 en *Drosophila melanogaster* inducido por dieta alta en azúcar: efectos metabólicos y relevancia biofísica de la PKC.

Chavarría, L[1]. Ferreira, G[1]. Budelli, G[1]. Las, A[1]. Bolatto, C[2,3].

(1) Laboratorio de Canales Iónicos, Membranas Biológicas y Señalización Celular, Departamento de Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay. (2) Laboratorio de Biología del Desarrollo, Unidad Académica de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay. (3) Departamento de Neurobiología y Neuropatología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Ministerio de Educación y Cultura, Montevideo, Uruguay.

La homeostasis del calcio intracelular constituye un pilar fundamental para la fisiología celular, al modular procesos críticos como la exocitosis vesicular y la neurotransmisión. En patologías metabólicas como la diabetes tipo 2 (DT2), la glucotoxicidad crónica induce un estado de estrés oxidativo sostenido, que genera especies reactivas del oxígeno (ROS), las cuales desencadenan la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de membrana. Esta modificación lipídica altera drásticamente las propiedades viscoelásticas (fluidez y presión lateral) de la bicapa lipídica, comprometiendo el microentorno hidrofóbico de proteínas integrales, canales iónicos y la actividad de quinasas asociadas a membrana. En este trabajo se evalúa, desde una perspectiva biofísica y molecular, la eficacia de la Terapia de Reemplazo Lipídico (TRL) mediante la administración de glicerofosfolípidos no oxidados en un modelo de DT2 de *Drosophila melanogaster* inducido por dieta alta en azúcar. Los resultados muestran que la suplementación al 0,1 % con glicerofosfolípidos mitiga el daño funcional, mejorando el rendimiento fototáctico (como indicador de neuroprotección retiniana) un 55%, y reduce la glicemia sistémica. Mecanísticamente, se propone que la TRL restaura la matriz lipídica por acción de masas y recupera el microambiente biofísico necesario para la correcta activación dependiente de membrana de la Proteína Kinasa C (PKC), lo que contribuye a estabilizar la sensibilidad a la insulina. Con el fin de explorar la traslacionalidad de este mecanismo hacia sistemas humanos, se evaluó la conservación de la secuencia de la PKC mediante alineamientos por pares (BLASTP), tomando como referencia la isoforma alfa humana (RefSeq: NP_002728.2) frente al proteoma de *Drosophila melanogaster*. Los resultados identificaron al gen *Pkc53E* como su principal homólogo, con un elevado porcentaje de identidad global cercano al 70% (E-value = 0,0) y una cobertura superior al 95%. Esta alta conservación en los dominios catalíticos respalda la validez del modelo para el estudio de esta vía de señalización. Por otra parte, las variaciones detectadas en los dominios reguladores sugieren que ambas proteínas

podrían presentar una ultrasensibilidad diferencial a la membrana, reflejando una adaptación evolutiva fina de cada secuencia a la composición lipídica característica de su respectiva especie, un aspecto que requerirá futura validación funcional. En conclusión, el modelo de *Drosophila melanogaster* constituye un sistema útil para estudiar el impacto metabólico sobre esta vía. La TRL se posiciona como una estrategia farmacológica potencialmente promisoria para mitigar las repercusiones del daño tisular asociado a la hiperglucemia crónica.

Presentación oral #12

Ibogaína y sus análogos estructurales: prometedores agentes antiadictivos frente al desafío de la cardiotoxicidad

Demarco, Agustín[1*]; Bernech, Franco[1*]; Mesa, Juan Manuel[2]; Las, Aníbal[1]; Budelli, Gonzalo[3]; Carrera, Ignacio[2#]; Carrera, Inés[4#]; y Ferreira, Gonzalo[1#].

1. Laboratorio de Canales Iónicos, Membranas Biológicas y Señalización Celular. Unidad Académica de Biofísica, Facultad de Medicina. 2. Laboratorio de Síntesis Orgánica, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química. 3. Laboratorio de termorrecepción sensorial. Unidad Académica de Biofísica, Facultad de Medicina. 4. Área Farmacología, Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Química; Universidad de la República, Montevideo, Uruguay # Autor correspondiente. * Igual contribución al trabajo.

El trastorno por uso de sustancias constituye un problema de salud pública a nivel global. La ibogaína, alcaloide presente en el arbusto *Tabernanthe iboga*, ha mostrado potencial para reducir la abstinencia y el consumo de opioides; sin embargo, su desarrollo clínico se limita debido a la cardiotoxicidad, atribuida en parte al bloqueo de hERG/Kv11.1 y a la prolongación del intervalo QT. En este sentido, nuestra hipótesis es que análogos estructurales pueden preservar la actividad antiadictiva y no presentar cardiotoxicidad. Para ello, estamos trabajando con varios análogos (noribogaína, ibogamina, 18-MC y oxanoribogaína) y analizando su actividad en corazón aislado de cobayo, cardiomiocitos aislados y células HEK293 (transfectadas con hERG de forma de testear esta hipótesis). Se evaluaron ibogaína, noribogaína, ibogamina, 18-MC y oxanoribogaína (Oxa) en corazones aislados y en cardiomiocitos ventriculares de cobayo, combinando la contractilidad, el potencial de acción monofásico, el patch-clamp y la microscopía confocal de Ca^{2+}. En corazones aislados de cobayo, la ibogaína produjo inotropismo y cronotropismo negativos, prolongación de la repolarización, baja reversibilidad y actividad proarrítmica. La noribogaína mantuvo un efecto depresor menor y más reversible, mientras que la ibogamina mostró el perfil cardiodepresor más marcado. En contraste, 18-MC presentó efectos limitados sobre la contractilidad y la repolarización, mientras que Oxa presentó una disminución moderada de la contractilidad, con un comportamiento bifásico de la repolarización. En cardiomiocitos, la ibogaína inhibió marcadamente una corriente

nativa enriquecida en IKr/Kv11.1, cuantificada al inicio de pulsos de 0 a +60 mV tras protocolos que evidenciaron colas dependientes de K^+. 18-MC y Oxa produjeron una inhibición sustancialmente menor, en concordancia con sus efectos inotrópicos más leves. Además, la ibogaína redujo parcialmente la corriente de Ca^{2+} tipo L (Cav1.2) y alteró la respuesta intracelular de Ca^{2+} inducida por cafeína (20 mM), lo que es compatible con una modificación de la liberación mediada por RyR2. Por el contrario, ni 18-MC ni oxanoribogaína produjeron alteraciones detectables de la corriente Cav1.2 ni de la respuesta dependiente de RyR2. En conjunto, los resultados sugieren que la depresión mecánica inducida por ibogaína podría derivar de una acción multicanal y sobre el manejo intracelular de Ca^{2+}: el bloqueo de Cav1.2 contribuye al inotropismo negativo y la alteración de RyR2 aporta un mecanismo adicional. La menor interferencia de 18-MC y Oxa con IKr, Cav1.2 y RyR2 respalda un perfil cardiovascular más favorable y orienta el desarrollo de análogos antiadictivos más seguros.

Mesa IX. El mundo del ARN: regulación, diversidad y función

Presentación oral #13

Optimización de un sistema de degradación selectivo de transcriptos en *Trypanosoma cruzi*

Carolina Fedele[1], Carlo Robello[1,2], Florencia Díaz Viraqué[1]; María Laura Chiribao[1,2]

1 Laboratorio de Interacción Hospedero-Patógeno, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay. 2 Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

La enfermedad de Chagas, causada por el protozoario *Trypanosoma cruzi*, continúa siendo un importante problema de salud en América Latina, con opciones terapéuticas limitadas y de baja eficacia en la fase crónica de la enfermedad. A pesar de los avances logrados en la comprensión del ciclo de vida y los mecanismos que utiliza para invadir y persistir en el hospedero, aún falta comprender el efecto de muchos genes involucrados que no se han logrado caracterizar. Esto se debe, en gran parte, a características de su biología y a la limitada disponibilidad de herramientas moleculares aplicables para su estudio. En particular, *T. cruzi* carece de la maquinaria molecular de ARN interferente, lo que dificulta realizar *knockdown* de genes, limitando significativamente el estudio de las funciones biológicas necesarias para su supervivencia e infectividad. Para abordar esta limitación, se optimizó un sistema de degradación selectiva de transcriptos combinando la herramienta de edición génica CRISPR/Cas9 y la tecnología SHARK. El sistema SHARK se basa en aptazimas capaces de unirse a ligandos exógenos; la unión del ligando induce la

degradación del ARNm blanco, permitiendo la regulación post-transcripcional de la expresión génica. Mediante la tecnología CRISPR/Cas9 se generaron líneas de parásitos genéticamente modificados a los cuales se les introdujo el *cassette* SHARK en *loci* específicos. Posteriormente, se evaluaron y optimizaron las condiciones experimentales necesarias para la correcta inducción de los distintos sistemas. Luego, se analizó el sistema evaluando su efecto a nivel de transcriptos y proteínas. Los resultados demostraron que los sistemas SHARK constituyen una herramienta eficaz para inducir degradación selectiva de transcriptos en *T. cruzi*, evidenciada por una disminución en los niveles de ARNm de entre un 57% y un 88%, junto con una reducción en la expresión proteica. El potencial de esta tecnología se demostró en su capacidad para inducir una degradación eficaz, selectiva y estable de los transcriptos de interés, permitiendo la implementación de estrategias *knockdown* para el estudio de genes esenciales en este parásito.

Presentación oral #14

Optimización de aptámeros de ARN con afinidad a estreptavidina para captura de proteínas de unión a ARN

Germán Guimenez Armas[1], Alicia Costábile[1,2,3,4]

1: Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. 2: Centro de Innovación en Vigilancia Epidemiológica, Institut Pasteur de Montevideo. 3: Laboratorio de Virología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. 4: Laboratorio de Evolución Experimental de Virus, Institut Pasteur de Montevideo.

Los aptámeros son oligonucleótidos de simple cadena (ya sea ARN o ADN de cadena sencilla) que tienen la capacidad de unirse a sus dianas con alta selectividad y afinidad debido a su compleja estructura tridimensional. Estas estructuras pueden incluir tallos, bucles, protuberancias, horquillas, pseudonudos, triplexes o cuadruplexes. Su funcionamiento se basa en la compatibilidad estructural, el apilamiento de anillos aromáticos, interacciones electrostáticas, fuerzas de van der Waals y puentes de hidrógeno. El aptámero con afinidad a estreptavidina (*Streptavidin Aptamer* o SA) puede fusionarse al extremo de un ARN de interés para inmovilizarlo en perlas paramagnéticas recubiertas de estreptavidina, y utilizarlo en estudios de captura. Eso permite una elución específica mediante la competencia con biotina o aumento de la temperatura, lo que reduce drásticamente el ruido de fondo y los ligandos inespecíficos en experimentos de proteómica. Existe una variación de este aptámero, denominado tRSA, en que el aptámero de afinidad a estreptavidina se fusiona con una estructura *scaffold* de tRNA que estabiliza su unión al ligando.

El presente trabajo se enmarca en un proyecto que propone optimizar un protocolo de captura de proteínas de unión a ARN (RBPs) mediante el uso de aptámeros de afinidad a estreptavidina. Con el objetivo de optimizar este protocolo, se diseñó un control utilizando el sitio de unión a proteínas reguladoras del gen HDAC2 (Histona desacetilasa 2). El control de la expresión de este gen ocurre a nivel post-transcripcional mediante la interacción con proteínas de unión a ARN en sus regiones no traducidas. La proteína HuR se une específicamente a una horquilla dentro de los 292 nucleótidos de la región 3' UTR del ARNm de HDAC2. De esta manera, haciendo uso de la expresión endógena de HuR en células HeLa, se puede optimizar el protocolo de captura fusionando el aptámero SA o tRSA a la región 3’ UTR de HDAC (HDAC-SA y HDAC-tRSA). Mediante el uso de estos constructos, optimizamos un método consistente para la captura de proteínas de unión a ARN haciendo uso de perlas paramagnéticas de estreptavidina. Se ha obtenido un amplio espectro de proteínas a partir del extracto de células HeLa que se encuentran en proceso de caracterización.

Presentación oral #15

Caracterización de un ARN no codificante relacionado al transporte de aminoácidos en *Aspergillus nidulans*

Arispe, Florentina [1]; Dourron, Juliette [1]; Sanguinetti, Manuel [1]; Ramón, Ana [1]

1 Sección Bioquímica, Departamento de Biología Celular y Molecular, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República

En el hongo modelo *Aspergillus nidulans* se han caracterizado tres transportadores de aminoácidos, y se predice la existencia de varios otros. Si bien otras especies de hongos poseen sistemas que regulan coordinadamente la expresión de genes de transportadores de aminoácidos, no se han reportado homólogos de estos en *A. nidulans*. Sin embargo, se aislaron mutantes del gen *fpaD* (*AN0885*), entre ellos *fpaD43*, resistentes a *p*-fluorofenilalanina (FPA) y a D-Serina, análogos tóxicos de Phe y Ser, presentando además deficiencia en el transporte de otros aminoácidos. El análisis bioinformático de la proteína codificada por *fpaD*, FpaD, reveló la existencia de distintos dominios de unión a ADN, por lo que se propuso que podría ser un represor general de la transcripción de genes de transportadores de aminoácidos. No obstante, estudios Pósteriores de RNA-Seq y ChIP-Seq revelaron que FpaD no los regularía de forma directa, sino que activaría la transcripción de diversos genes relacionados con el metabolismo de fuentes de nitrógeno y carbono, y más interesantemente, de arrestinas, que participarían de la endocitosis y degradación de los transportadores. Las regiones genómicas que flanquean la secuencia codificante de *fpaD* son esenciales para la correcta expresión y función de FpaD, ya que la modificación de este *locus* lleva a la pérdida del fenotipo de resistencia característica

de *fpaD43*. Por otro lado, sí se observa fenotipo de resistencia al transformar una cepa silvestre para *fpaD* con un plásmido multicopia no integrativo pAMAI, portando la secuencia codificante de *fpaD* y hasta 2500 pb corriente arriba. Esta región incluye el gen *lamB* (*AN0886*) y, entre este y *fpaD*, un transcripto (tX) no reportado previamente, identificado por RNA-Seq. tX está codificado en la hebra opuesta a *lamB* y *fpaD,* y está sobreexpresado en el mutante *fpaD43*, sugiriendo una relación funcional con FpaD. Se determinaron los extremos 5' y 3' de tX por RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*), así como el 3' de *lamB* y 5' de *fpaD*, constatando que corresponden a transcriptos independientes. Asimismo, se comprobó que posee cola poli(A) y 5' cap. Su secuencia incluye un marco abierto de lectura hipotético mayor a 100 nucleótidos, sin "*hits*" por BLAST. A futuro, se estudiará la expresión del transcripto por qPCR en distintas fuentes de nitrógeno, y se realizará el modelado estructural del ARN y predicción de su función por métodos bioinformáticos. Además, se planea modificar la secuencia de tX utilizando el sistema CRISPR Cas y sobreexpresarlo en el plásmido pAMAI.

Presentación oral #16

Descifrando el repertorio de lncRNAs de *Trypanosoma cruzi*

Paola Sosa Basso[1,2,3], Lucía Bilbao[1,2] Lucas Inchausti[1,2], Beatriz Garat[2], José Sotelo-Silveira[3,4], María Ana Duhagon[2,5], Pablo Smircich[1,2]

[1]Laboratorio de Bioinformática, Departamento de Genómica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.[2]Sección Genómica Funcional, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.[3]Departamento de Genómica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.[4]Sección Biología Celular, Facultad de Ciencias Universidad de la República.[5]Unidad Académica de Genética, Facultad de Medicina, Universidad de la República.

Trypanosoma cruzi, el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, experimenta cambios significativos en la expresión génica a lo largo de su ciclo de vida, regulados principalmente a nivel post-transcripcional. Aunque se han estudiado reguladores proteicos, la función de los ARN largos no codificantes (lncRNAs) permanece en gran medida inexplorada. Los lncRNAs son moléculas de ARN de más de doscientos nucleótidos que tienen nulo o casi nulo potencial codificante. En diversos organismos, se ha demostrado que los lncRNAs regulan la expresión génica, ayudan en la diferenciación celular a través de su interacción con el ADN, ARN, proteínas y cromatina. En este trabajo desarrollamos una estrategia bioinformática reproducible que integra el ensamblaje del transcriptoma, la predicción del potencial codificante y análisis comparativos para la identificación y caracterización de lncRNAs. Mediante el análisis de datos de RNA-seq obtenidos a lo largo del ciclo de vida del parásito y su validación mediante secuenciación directa de ARN (DRS, Oxford Nanopore),

identificamos cientos de nuevos candidatos a lncRNAs, muchos de ellos derivados de transposones, y confirmamos experimentalmente la longitud completa de varios transcritos. Si bien la mayoría de los lncRNAs presentó bajos niveles de expresión, un subconjunto alcanzó abundancias comparables a las de los ARNm y exhibió patrones de expresión específicos de estadio. En conjunto, estos resultados constituyen el primer catálogo de lncRNAs de *T. cruzi* y proporcionan una base para futuros estudios orientados a dilucidar su papel en el desarrollo del parásito y en la interacción con el hospedador.

Mesa X. Vacunas, inmunoterapias y otras intervenciones inmunológica

Presentación oral #17

La variabilidad del hospedador como clave en el diseño de estrategias de inmunización contra Haematobia irritans en bovinos.

E. Elerd[1], MO. Lapissonde[2], G. Suarez[3], Pastro L.[4], T. Cabrera[1], V. Acuña[1], M. Rossi[1], F. Negrin[1], M. Breijo.

(1) URBE Facultad de Medicina/ CUPAE- Bioterio Central de la Udelar, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. (2) Ministerio de Desarrollo Productivo, Bv. Pellegrini 3100, 3000 Santa Fe-Argentina. (3) Farmacología y Terapéutica, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. (4) Departamento de Genética, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

La mosca de los cuernos (*Haematobia irritans*) es un ectoparásito hematófago obligado de bovinos. Su impacto en la producción es evidente dado por disminución en la ganancia de peso, reducción de la producción láctea, y deterioro del bienestar animal. El uso de insecticidas químicos ha sido la estrategia clásica de control, pero la resistencia creciente obliga a explorar nuevas soluciones como el desarrollo de vacunas dirigidas contra componentes claves del parásito. En el presente estudio se evaluó la respuesta humoral inducida por una vacuna experimental basada en Hematobina recombinante (HTB), una proteína salival con actividad inmunomoduladora identificada previamente por nuestro equipo en el sialoma de *H. irritans*. Para ello se clonó y expresó en cuerpos de inclusión de *Escherichia coli* la secuencia codificante de HTB (GenBank KP185122), formulándose dos preparaciones vacunales: vHTB-1 (500 µg) y vHTB-2 (750 µg), ambas emulsificadas en adyuvante incompleto de Freund. Se emplearon 33 bovinos clínicamente sanos, tratados previamente con ectoparasiticidas pour-on y distribuidos en grupos según dosis y categoría. Se tomaron muestras sanguíneas del rodeo al día 0 (D0) y tras

cada inmunización al día 21 (D21) y día 43 (D43). La respuesta humoral específica se midió mediante ELISA indirecto (D0, D21, D43) y se analizó con modelos lineales mixtos, considerando dosis, sexo, edad y tiempo (Procedimiento MIXED de SAS). La inmunización indujo una respuesta humoral cuantificable en los animales vacunados, observándose un incremento significativo en los niveles de anticuerpos al día 43 en animales vacunados con vHTB-1 y vHTB-2, en relación al grupo control ($p=0.034$ y $p= 0.0013$ respectivamente). Adicionalmente a eso las medias de los títulos de IgG vacunales al día 21 y 43 desarrollados por el grupo inmunizado con vHTB-2 fueron mayores que los observados en el grupo de vHTB-1, aunque no fue estadísticamente significativo ($p= 0.8145$). El sexo del hospedador fue de relevancia dado que las hembras respondieron significativamente mejor que los machos ($p = 0.034$). Mientras tanto, la edad no mostró tener un efecto significativo ($p = 0.086$). En conclusión, a la luz de estos resultados la vacuna experimental con Hematobina recombinante indujo una respuesta humoral clara, modulada por factores fenotípicos como el sexo del hospedador. Estos hallazgos destacan la importancia de considerar la diversidad biológica a la hora de diseñar y evaluar futuras estrategias de vacunación contra *H. irritans*.

Presentación oral #18

Desarrollo de nanobodies inmunomoduladores para estrategias combinadas de terapia antitumoral

Camila Cedrés[1], Diego Duarte[2], Carolina Padula[1], Gabriel Lassabe[1], María Moreno[3] y Gualberto González[1]

1 Unidad Académica de Inmunología, Facultad de Química, Udelar. 2 Division of Immune Modulation in Cancer, German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Germany. 3 Unidad Académica de Desarrollo Biotecnológico, Facultad de Medicina, Udelar

La inmunoterapia con anticuerpos monoclonales ha transformado el tratamiento del cáncer, principalmente mediante la modulación de la respuesta inmune antitumoral. Los anticuerpos que bloquean el eje inhibitorio PD-1/PD-L1 permiten restaurar las funciones efectoras de los linfocitos T y favorecer el control del crecimiento tumoral y la progresión de metástasis. Estudios recientes han demostrado que el bloqueo de PD-L1 en células presentadoras de antígeno es particularmente relevante para promover una respuesta antitumoral sostenida, favoreciendo la activación de células T $CD8^+$ progenitoras-exhaustas. Por otro lado, 4-1BB es un receptor coestimulador expresado en linfocitos T activados cuya estimulación potencia su expansión y función efectora. Sin embargo, su activación sistémica puede producir toxicidad, limitando su uso terapéutico y resaltando la necesidad de desarrollar estrategias capaces de dirigir y controlar su actividad. La combinación de ambos mecanismos,

mediante el bloqueo de señales inhibitorias y la estimulación de señales coestimuladoras, podría potenciar la respuesta antitumoral. En este contexto, los *nanobodies* (Nbs) ofrecen una herramienta útil para desarrollar moléculas inmunomoduladoras y formatos multiespecíficos capaces de integrar mecanismos de acción. En este trabajo se desarrollaron y caracterizaron Nbs dirigidos a distintas vías de regulación de la respuesta inmune. En primer lugar, se desarrolló un anticuerpo biespecífico basado en Nbs (bNb) capaz de redirigir el bloqueo de PD-L1 a células dendríticas. Este direccionamiento mostró una actividad terapéutica superior a la del bloqueo de PD-L1 no dirigido en modelos tumorales murinos. En paralelo, se generaron Nbs dirigidos a 4-1BB mediante *phage display*. Tras varias rondas de selección, se identificaron tres Nbs capaces de reconocer epítopes distintos del receptor. Los tres candidatos fueron clonados para su expresión en diferentes formatos recombinantes, y demostraron actividad agonista en ensayos funcionales *in vitro*. Estos Nbs fueron Pósteriormente evaluados en modelos tumorales murinos, donde mostraron actividad antitumoral y prolongaron la sobrevida de los animales tratados. Actualmente se está estudiando la combinación del bNb dirigido a PD-L1 en células dendríticas con los agonistas de 4-1BB, con el objetivo de concentrar la actividad agonista en la sinapsis inmunológica entre células dendríticas y linfocitos T y, de este modo, mejorar la respuesta antitumoral. En conjunto, este trabajo contribuye al desarrollo de nuevas estrategias inmunoterapéuticas que favorezcan una respuesta antitumoral más potente y amplíen las posibilidades de modulación de distintas vías de regulación inmune. Asimismo, estos desarrollos constituyen una plataforma para explorar nuevos formatos multiespecíficos orientados a optimizar la actividad y localización de señales inmunomoduladoras.

Presentación oral #19

Salmonella LVR01, más allá del tumor primario

Plata, María Clara[1]; Mónaco, Amy[1]; Chabalgoity, José Alejandro[1]; Moreno, María[1]

[1]Unidad Académica de Desarrollo Biotecnológico, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

El uso de bacterias como inmunoterapias antitumorales ha sido ampliamente estudiado, y en los últimos años, ha cobrado mayor interés debido a su capacidad para modular el sistema inmune y actuar selectivamente sobre el microambiente tumoral. En este contexto, nuestra Unidad Académica investiga desde hace varios años el potencial de *Salmonella* Typhimurium LVR01, una cepa atenuada en la vía de los aromáticos (*aroC*-) como estrategia inmunoterapéutica contra el cáncer evidenciando que puede constituir una alternativa terapéutica para de varios tipos de tumor. En particular, *Salmonella* presenta varias características que la convierten en

una candidata promisoria: efecto antitumoral directo mediante la inducción de la muerte en células tumorales, y un efecto indirecto promoviendo una fuerte respuesta inmune proinflamatoria. En modelos murinos de melanoma demostramos previamente que una única inoculación intratumoral de *Salmonella* LVR01 en el tratamiento de tumores primarios retrasa el crecimiento tumoral y prolona la sobrevida de los animales, aunque su efecto es transitorio y no alcanza la remisión completa. En el presente trabajo nos planteamos evaluar si el tratamiento con *Salmonella* es capaz de inducir respuestas antitumorales sistémicas que trasciendan el control del tumor primario. Nuestros resultados muestran que el tratamiento neoadyuvante con LVR01, administrado previo a la remoción quirúrgica del tumor primario, determina una reducción en la diseminación de la enfermedad permitiendo alcanzar una remisión completa en más del 40% de los animales tratados. Además, los animales recuperados, desafiados meses más tarde con un tumor homólogo en el flanco opuesto, presentaron un retraso en el crecimiento del mismo, evidenciando que el tratamiento induce una respuesta de memoria específica. Sumado a esto, observamos este efecto antitumoral inducido por *Salmonella* en tumores contralaterales no tratados, evidenciando que la respuesta inducida por LVR01 trasciende el sitio de inoculación. En un modelo de metástasis con células tumorales B16F10, el tratamiento neoadyuvante con LVR01 también redujo significativamente la aparición de metástasis pulmonares, confirmando que la respuesta inmune inducida es capaz de ejercer protección contra la enfermedad diseminada. Por otra parte, determinamos que la inmunidad generada fue transferible mediante transferencia adoptiva de esplenocitos provenientes de animales previamente tratados. En conjunto, estos resultados destacan el potencial de *Salmonella* LVR01 para inducir respuestas antitumorales locales y sistémicas en distintas etapas de la enfermedad. Comprender los mecanismos celulares y moleculares responsables de estos efectos permitirá optimizar su desarrollo como estrategia inmunoterapéutica.

Presentación oral #20

Actividad oncolítica, seguridad y eficacia antitumoral de un coxsackievirus B3 racionalmente atenuado (GKOV-002)

Paula Perbolianachis[1,2,3], Fabián Aldunate[1,2,3], Manuela Machado[1,2,3], Juan Gandioli[1,2,3], Joaquín Hurtado[1,2,3], Gonzalo Moratorio[1,2,3,4], Pilar Moreno[1,2,3,4]

[1]Laboratorio de Virología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. [2] Laboratorio de Evolución Experimental de Virus, Institut Pasteur de Montevideo [3] Guska [4] Centro de Innovación en Vigilancia Epidemiológica, Institut Pasteur de Montevideo

Los virus oncolíticos constituyen una estrategia terapéutica prometedora por su capacidad de replicarse selectivamente en células tumorales, inducir su destrucción y amplificar localmente el efecto antitumoral. Sin embargo, su desarrollo plantea el desafío de preservar una elevada potencia oncolítica y, al mismo tiempo, alcanzar un perfil de seguridad adecuado. Con este propósito se desarrolló GKOV-002, un coxsackievirus B3 derivado de la cepa Nancy y racionalmente atenuado mediante dos estrategias complementarias. Por un lado, se introdujeron 117 sustituciones sinónimas en los codones Ser y Leu de la región P1 (que codifica la cápside viral) aplicando la estrategia *one-to-stop*, en la que se aumenta la frecuencia de codones situados a una única mutación de convertirse en codones *stop*. Por otro lado, se incorporaron cuatro secuencias complementarias para miR-145 en la región 3′ no traducida, lo que permite restringir la replicación viral en tejidos sanos que conservan este microARN e intensificarla en el microambiente tumoral, caracterizado por la pérdida de expresión. En este trabajo se evaluaron la actividad oncolítica, la seguridad y la eficacia antitumoral de GKOV-002 como candidato preclínico. La actividad oncolítica se analizó en 18 líneas celulares humanas de cáncer de pulmón, sistema nervioso central, páncreas, mama, ovario, próstata y colon, utilizando distintas multiplicidades de infección. La seguridad *in vivo* se estudió en ratones NSG mediante esquemas subcutáneas de dosis única y repetida en cuatro administraciones, mientras que la eficacia se evaluó en un modelo CDX de adenocarcinoma pulmonar A549 tratado con cuatro dosis intratumorales de 1×10^5 PFU de GKOV-002 o PBS. GKOV-002 mostró una actividad oncolítica amplia y dosis-dependiente destacando una marcada destrucción celular en distintas líneas celulares incluso a bajas multiplicidades de infección. En el estudio de seguridad alcanzó 100% de supervivencia a 30 días, superando ampliamente al virus parental, y el esquema de dosis repetidas fue bien tolerado con eventos clínicos leves. En el modelo CDX de A549, GKOV-002 redujo el crecimiento tumoral y prolongó significativamente la supervivencia (log-rank, p=0,0010). Todos los animales control alcanzaron el criterio de eutanasia antes del día 44, mientras que cuatro de diez animales tratados completaron los 90 días de seguimiento. En conjunto, GKOV-002 combina una potente actividad oncolítica de amplio espectro, control tumoral *in vivo* y una atenuación mejorada, respaldando su avance hacia nuevas etapas del desarrollo preclínico temprano.

Mesa XI. Enfermedades Infecciosas emergentes y reemergentes

Presentación oral #21

Efecto de subtipos de *Blastocystis spp.* sobre la función de barrera del epitelio intestinal humano en un modelo de células Caco-2.

Denisse Bercovici[1,2], Alejandra Valentín-Decuadro[2,3,4], Mariela Bollati-Fogolin[1], María E Francia[2,3], Romina Pagotto[1]

1 Unidad de Biología Celular, Institut Pasteur de Montevideo. 2 Laboratorio de Biología de Apicomplejos Institut Pasteur Montevideo.3 Unidad Académica de Parasitología y Micología, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay 4 Sección Parasitología, Unidad Académica de Laboratorio de Patología Clínica, Escuela de Tecnología Médica (EUTM), Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Blastocystis spp. es un protista intestinal anaerobio de elevada prevalencia mundial cuyo papel como comensal o patógeno continúa siendo controversial y podría depender del subtipo genético. Los subtipos ST1, ST3 y ST6 difieren en su distribución y asociación con cuadros clínicos, aunque la evidencia sobre su efecto directo en el epitelio intestinal humano sigue siendo limitada. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de estos tres subtipos sobre la integridad del epitelio intestinal utilizando como modelo monocapas polarizadas de células Caco-2. Las cepas ST1 y ST3 (de origen comercial) y ST6 (aislado clínico local) se mantuvieron en cultivo, se caracterizaron morfológicamente y mediante curvas de crecimiento. Las células Caco-2 se cultivaron durante 20 días en insertos *Transwell* hasta obtener una monocapa polarizada, cuya integridad se confirmó mediante la medida de la Resistencia Eléctrica Transepitelial (TEER). Debido a que los cultivos de *Blastocystis* contienen bacterias acompañantes, los parásitos se purificaron mediante gradiente de densidad en Ficoll-Paque para reducir la carga bacteriana antes de los ensayos. Las monocapas se incubaron durante 24 horas con $1x10^6$ células por inserto de cada subtipo en condiciones de anaerobiosis y se evaluó la función de barrera mediante la TEER, la permeabilidad paracelular empleando FITC-dextrano (4 kDa) y la proteína de unión estrecha ZO-1 por inmunofluorescencia. Las tres cepas se cultivaron con sus bacterias acompañantes, y en todos los casos predominó la forma vacuolar del protista. En los co-cultivos, ST3 disminuyó la TEER en dos experimentos independientes, mientras que para ST1 y ST6 las respuestas fueron variables. Los análisis de permeabilidad a FITC-dextrano y de la distribución de ZO-1 mostraron una elevada variabilidad entre ensayos independientes, sin evidenciar un patrón consistente de alteración de la barrera epitelial asociado a un subtipo particular. Estos resultados preliminares sugieren que distintos subtipos de *Blastocystis spp.* ejercen efectos diferenciales sobre la función de barrera del epitelio intestinal, siendo ST3 el que produjo la alteración más consistente. No obstante, la dificultad para obtener cultivos axénicos y la variabilidad observada entre experimentos apuntan a que las

bacterias asociadas podrían influir en la respuesta del epitelio. Estudios adicionales empleando modelos axénicos permitirán determinar si la tendencia observada se mantiene y establecer con mayor precisión la contribución específica de ***Blastocystis*** en la alteración de la barrera epitelial.

Presentación oral #22

Identificación de posibles reservorios de microorganismos resistentes y de patógenos en superficies de Unidades de Cuidados Intensivos mediante el uso de paneles de NGS.

Licandro, Santiago [1]., Bilbao, Lucía [1,2]., Grill, Fabio [3,4]., Brito, Cecilia [5]., Piccini, Claudia [6,7]., González-Revello, Álvaro [1,7,8]., Deicas, Alberto [3]., Smircich, Pablo [1,2]., Sotelo-Silveira José R [1,9].

1 - Departamento de Genómica. IIBCE, MEC. Montevideo, Uruguay. 2 - Sección Genómica Funcional. Facultad de Ciencias, Udelar. Montevideo, Uruguay. 3 - Departamento de Medicina Intensiva. Institución privada. Montevideo, Uruguay. 4 – Unidad de Enfermedades Infecciosas. Hospital Maciel, ASSE. Montevideo, Uruguay. 5 - Laboratorio de Análisis Clínicos. Institución privada. Montevideo, Uruguay. 6 - Centro de Investigación en Ciencias Ambientales. IIBCE, MEC. Montevideo, Uruguay. 7 - Departamento de Microbiología. IIBCE MEC. Montevideo, Uruguay. 8 - Departamento de Ciencia y Alimentos. Facultad de Veterinaria, Udelar. Canelones, Uruguay. 9 - Sección Biología Celular. Facultad de Ciencias, Udelar. Montevideo, Uruguay.

Las infecciones nosocomiales (IN) incrementan la morbi-mortalidad, prolongan las estadías hospitalarias y aumentan los costos de atención. Su aparición se asocia principalmente al contacto entre pacientes, personal de salud y equipamiento médico. Además, la elevada presión selectiva generada por el uso intensivo de antimicrobianos favorece la persistencia de microorganismos multirresistentes en el ambiente hospitalario. Por ende, el monitoreo ambiental de patógenos y genes de resistencia antibiótica representa una estrategia con potencial para la vigilancia epidemiológica y la gestión del riesgo. Tradicionalmente, estos estudios se han basado en métodos dependientes de cultivo, limitados a microorganismos viables y cultivables. En contraste, las herramientas moleculares, como la PCR y la secuenciación masiva de amplicones, permiten una detección rápida, sensible e independiente de cultivo de un gran número de blancos en simultáneo. En el proyecto que enmarca este trabajo, se realizaron tres campañas de muestreo en dos unidades de cuidados intensivos, recolectando hisopados de superficies individuales. Inicialmente, las habitaciones fueron analizadas mediante una estrategia de pooles de ADN utilizando paneles de secuenciación masiva de amplicones. Se emplearon dos paneles: uno desarrollado en este trabajo para detectar especies patógenas asociadas a las IN, y el panel comunitario AMR para detectar genes de resistencia antimicrobiana. La mayoría de las habitaciones fue positiva para ADN correspondiente a patógenos del grupo ESKAPE y un gran número de genes de

resistencia, incluyendo carbapenemasas y β-lactamasas de espectro extendido. También se profundizó en dichos resultados estudiando superficies individuales en búsqueda de posibles reservorios para los patógenos y resistencias que habían sido detectadas para las habitaciones. Los patógenos más frecuentemente detectados fueron *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Stenotrophomonas maltophilia*. Asimismo, el agrupamiento jerárquico de los resultados de genes de resistencia antibiótica generó a grandes rasgos dos grandes grupos que separaban a las muestras húmedas de las muestras secas. Los genes blaNDM, blaVIM y blaCTX fueron detectados de manera consistente y en mayor abundancia en las superficies húmedas. Estos resultados sugieren que las superficies húmedas constituyen un potencial reservorio de microorganismos portadores de genes de resistencia antimicrobiana de relevancia clínica y respaldan el potencial de paneles de secuenciación masiva como herramienta para la vigilancia ambiental en hospitales y la prevención de la ocurrencia de IN.

Presentación oral #23

Bases celulares y moleculares de la cistogénesis y la reactivación de las formas crónicas en *Neospora caninum* y *Toxoplasma gondii.*

Solano-Castro D.[1], Tejera E.[1], Tana, L.[1], Berná, L.[1], Sena, F.[1], Faral-Tello P.[1], Francia M. E.[1]

1. Laboratory of Apicomplexan Biology, Institut Pasteur de Montevideo, 11400 Montevideo, Uruguay.

Toxoplasma gondii y *Neospora caninum* son parásitos intracelulares distribuidos a nivel mundial y responsables de la toxoplasmosis y la neosporosis, respectivamente. Mientras que la toxoplasmosis es una infección zoonótica con un importante impacto en la salud pública y animal, la neosporosis representa un problema sanitario y económico significativo para la producción pecuaria, ya que está asociada con trastornos reproductivos, abortos y mortalidad neonatal. Ambos parásitos presentan un ciclo de vida complejo que requiere dos hospedadores y comprende múltiples formas de desarrollo. Sin embargo, difieren en que la reactivación de los quistes en *T. gondii* ocurre únicamente bajo condiciones de inmunosupresión del hospedador, mientras que en *N. caninum* la conversión de bradizoítos a taquizoítos tiene lugar específicamente durante la gestación. Este proyecto busca identificar los mecanismos celulares y moleculares implicados en la cistogénesis de *N. caninum* y en la reactivación de las formas crónicas de *T. gondii* y *N. caninum*. Con este objetivo, se ha optimizado un protocolo de cistogénesis desarrollado en nuestro laboratorio para *N. caninum*, una especie considerablemente más refractaria a la conversión *in vitro* que *T. gondii*. Asimismo, se han incorporado marcadores fluorescentes específicos de estadio en una cepa de *N. caninum* que expresa SpCas9, lo que permitirá la selección

celular mediante FACS. Además, se ha generado una cepa monoclonal de *N. caninum* con expresión inducible de Cas9, la cual se encuentra actualmente en proceso de validación mediante la expresión de ARN guía dirigidos contra el gen UPRT. Por otra parte, para estudiar la cinética de reactivación en modelos animales sometidos a inmunosupresión y durante la gestación, se han generado cepas policlonales de ambos parásitos que expresan luciferasa de forma constitutiva. En conjunto, estas estrategias permitirán identificar nuevos genes candidatos y profundizar en la comprensión de las formas crónicas de estas enfermedades.

Mesa XII. Biocatálisis y Biotransformaciones: hacia una química sustentable

Presentación oral #24

Ingeniería de epítopos para reducir alergenicidad de Quimopapaína recombinante producida en *Physcomitrium patens*

Vivas, Andrés[1]; Baroffio, Agustín[1]; Villadóniga, Carolina[2]; Pérez, Leticia[3]; Ruibal Cecilia[1].

[1] Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias UdelaR [2] Laboratorio de Biocatalizadores y sus aplicaciones, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias UdelaR [3] Laboratorio de Interacciones Moleculares, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias UdelaR

Durante casi cuatro décadas, la hernia de disco tuvo una alternativa a la cirugía: la quimionucleólisis, la inyección intradiscal de una proteasa vegetal que degrada los proteoglicanos del núcleo pulposo, reduciendo su capacidad de retener agua y aliviando la compresión sobre la raíz nerviosa. Esa enzima es la quimopapaína, la cisteín-proteasa más abundante del látex de *Carica papaya*, donde representa cerca del 30% del contenido proteico. Su eficacia quedó establecida en numerosos ensayos, pero el tratamiento estuvo asociado a reacciones alérgicas que motivaron preparaciones más puras, hasta que en 2002 fue retirada del mercado por razones comerciales. La alergenicidad de estos preparados tiene un origen dual. Por un lado, ninguna preparación fue quimopapaína pura: aun las más refinadas conservaban las otras cisteín-proteasas del látex, y fueron las minoritarias, caricaína y glicil endopeptidasa, las que provocaron la respuesta IgE más intensa. Por otro lado, la quimopapaína es en sí misma un alérgeno conocido (Cari p 2), con reactividad cruzada con otras proteasas vegetales y alérgenos ambientales, y con sensibilización previa en la población general. Producirla de forma recombinante elimina la primera fuente, pero no la segunda; los intentos en bacterias, además, rindieron proteína insoluble que requiere replegado. El musgo *Physcomitrium patens* es un sistema de

expresión vegetal que permite generar sobreexpresantes por recombinación homóloga y cultivarlos en biorreactores. Al tratarse de una célula vegetal, dispone de la vía secretora eucariota, en la que se forman los tres puentes disulfuro necesarios para la obtención de la enzima activa. El cultivo no introduce endotoxinas bacterianas, agentes infecciosos humanos ni secuencias génicas con potencial oncogénico, y la plataforma ya cuenta con validación clínica: una proteína humana producida en este sistema completó un ensayo de fase I. En este trabajo se generó una construcción de sobreexpresión de proquimopapaína y se obtuvieron líneas transgénicas de *P. patens*, en las que se confirmó la expresión del transgén y se detectó la proteína recombinante. Se generarán variantes que incorporen modificaciones puntuales en los epítopos de potencial alergénico mapeados bioinformáticamente, y estas variantes resultantes se compararán con la enzima nativa en su actividad proteolítica y en su capacidad de inducir respuesta IgE, con el objetivo de obtener una quimopapaína de menor potencial alergénico.

Presentación oral #25

Sistema enzimático acoplado para aplicación en terapia enzimática dirigida

Agustina Arrieta[1*], Lucía Patrón[1], Magdalena Ripoll[1], Cecilia Ortiz[1], Valeria Grazú[2,3], Lorena Betancor[1]

[1]Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ingeniería, Universidad ORT Uruguay, Mercedes 1237, 11100 Montevideo, Uruguay. [2]Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón (INMA), CSIC/Universidad de Zaragoza, c/ Edificio I+D, Mariano Esquillor Gómez, 50018, Zaragoza, España. [3]Centro de Investigación Biomédica en Red de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Avenida Monforte de Lemos, 3-5, 28029 Madrid, España

Las terapias enzimáticas con profármacos permiten generar compuestos citotóxicos localmente a partir de precursores de baja toxicidad. En este contexto, la citosina deaminasa (CD) convierte al profármaco 5-fluorocitosina (5-FC) en el fármaco citotóxico 5-fluorouracilo (5-FU), mientras que la uracil fosforribosil transferasa (UFRT) favorece su conversión a otros metabolitos fluorados citotóxicos, potenciando la eficacia y reduciendo la generación de resistencia asociada al uso de la CD sola. En este trabajo se caracterizó UFRT recombinante de *Thermus thermophilus* y se estudió el sistema CD-UFRT en solución y co-inmovilizado en nanopartículas de sílica biomimética como aproximación a una aplicación biotecnológica. Dado que la eficiencia de la cascada depende del balance entre ambas actividades, se evaluaron diferentes relaciones CD:UFRT. La UFRT se obtuvo con un rendimiento de 1,87 mg/g de pellet celular y una pureza superior al 95 %, determinada por SDS-PAGE. Su actividad se evaluó por HPLC a 37 °C, observándose una conversión del 80 % de uracilo (concentración inicial: 0,1mM) a UMP luego de 5 min, una velocidad de reacción de 0,16 $\mu mol \cdot min^{-1}$ y una actividad específica de 17,3 $\mu mol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$. El

sistema CD-UFRT se evaluó en solución empleando relaciones de concentración 1:10, 1:1 y 10:1, manteniendo 1 mg/mL de proteína total, correspondientes a 0,1:0,9; 0,5:0,5 y 0,9:0,1 mg/mL de CD:UFRT, respectivamente. La CD presentó conversiones de 50 mM de citosina a uracilo de 2, 48 y 50 %, mientras que UFRT presentó conversiones de uracilo a UMP de 58, 64 y 30 %, respectivamente. La actividad de UFRT podría encontrarse limitada por concentraciones subsaturantes de PRPP, actualmente en evaluación. Posteriormente, ambas enzimas fueron co-inmovilizadas en sílica biomimética (Torres-Herrero et al., 2023) utilizando las mismas relaciones, obteniéndose valores de inmovilización aparente, estimados mediante balance de actividad, superiores al 80 %. Los co-inmovilizados presentaron un tamaño hidrodinámico de 480,4 ± 168,6 nm y un potencial ζ de 5,81 ± 0,45 mV. La CD conservó el 12,6 ± 2,5 % y 2,8 ± 0,2 % de la actividad inmovilizada para las relaciones 1:10 y 10:1, respectivamente, mientras que UFRT no presentó actividad detectable. Actualmente nos encontramos evaluando nuevas estrategias de inmovilización. En conjunto, estos resultados demuestran el acoplamiento funcional CD-UFRT en solución y establecen las bases para optimizar una plataforma biocatalítica co-inmovilizada orientada a aplicaciones de terapia dirigida.

Mesa XIII. Diseño de nuevos sistemas biológicos mediante Biología Sintética

Presentación oral #26

Bioprospección etnodirigida de extractos vegetales amazónicos y desarrollo de un biosensor sintético para la detección de flavonoides.

Agustina Canclini[1], Tomás Tejera[1,2], Fabricio Edmundo Oña[3], Cristina Quiroga[3], Cecilia Ortiz[1].

[1]Laboratorio de Biotecnología, Universidad ORT Uruguay. [2] Institut Pasteur de Montevideo. [3]Laboratorio de Biología Celular y Microscopía, Universidad Regional Amazónica Ikiam, Tena, Ecuador.

Diversas especies vegetales amazónicas han sido utilizadas desde tiempos ancestrales con fines medicinales, y el conocimiento tradicional asociado a su uso constituye una fuente promisoria de compuestos bioactivos. En colaboración con la comunidad Kiwchua Atacapi de Ecuador, se llevó a cabo la bioprospección etnodirigida de seis especies vegetales provenientes de la Reserva Biológica Colonso Chalupas, utilizadas en preparaciones medicinales tradicionales, con el objetivo de identificar extractos bioactivos responsables de su actividad y aportar evidencia experimental que respalde el conocimiento tradicional que guio su

selección. Se evaluó su capacidad antioxidante mediante los mecanismos de transferencia de electrones y de átomos de hidrógeno, utilizando ensayos basados en ABTS y DPPH. Asimismo, se determinó el contenido de polifenoles totales mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu y la capacidad estrogénica utilizando un biosensor comercial de estrógeno. Los resultados evidenciaron una fuerte correlación positiva entre el contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante. Este patrón permitió clasificar los extractos en tres grupos: 1) alta capacidad antioxidante y contenido de polifenoles (1110–586 µg equivalentes de ácido ascórbico (EAA)/mg de extracto y 386–307 µg equivalentes de ácido gálico (EAG)/mg de extracto, respectivamente); 2) mediana capacidad antioxidante y contenido de polifenoles (245–108 µg EAA/mg y 103–97 µg EAG/mg), y 3) baja capacidad antioxidante y contenido de polifenoles (41–34 µg EAA/mg y 21–14 µg EAG/mg). A partir de estos resultados, se seleccionaron los extractos más prometedores por su elevada capacidad antioxidante, alto contenido de polifenoles totales y/o por su uso etnobotánico en salud femenina, y se evaluó su capacidad estrogénica. El extracto tradicionalmente utilizado para favorecer la expulsión de la placenta exhibió la mayor actividad estrogénica entre los evaluados. Dado que los flavonoides constituyen una de las principales familias de polifenoles asociadas a estas actividades biológicas, se diseñó un biosensor sintético fluorescente de célula completa capaz de detectarlos. Los circuitos genéticos se desarrollaron mediante ensamblaje modular de tipo *Golden Gate* empleando la plataforma *Golden Standard.* Este biosensor permitirá realizar el cribado rápido, económico y sostenible de extractos vegetales, así como el monitoreo en tiempo real de bioprocesos destinados a la producción de flavonoides. En conjunto, se identificaron extractos vegetales con elevado potencial biotecnológico que aportan evidencia experimental en respaldo del conocimiento ancestral que guio su selección y se establecieron las bases para el desarrollo de herramientas sintéticas orientadas a la detección y producción sostenible de compuestos bioactivos de interés.

Presentación oral #27

Biosíntesis de salidroside en *Physcomitrium patens* mediante métodos de ingeniería metabólica

Álvarez-De León J.[1*], Diaz-Garrido ME.[1*], Gaggero-Villegas B.[1*], González-Gutierrez AC.[1*], Silva-Galluzzo E[1*], Fleitas AL.[1], Ruibal C.[1]

(1) Universidad de la República, Facultad de Ciencias, Instituto de Química Biológica, Laboratorio de Biología Molecular Vegetal. * Los autores aparecen en orden alfabético y participaron de este trabajo por igual.

El salidroside es un compuesto polifenólico natural perteneciente a la clase de los glucósidos de tirosol, identificado principalmente en la planta *Rhodiola rosea* L. (conocida comúnmente como “raíz dorada”). Diversos estudios farmacológicos han

demostrado que posee una amplia gama de propiedades biológicas, destacando sus efectos antioxidantes, antiinflamatorios, neuroprotectores, cardioprotectores, antienvejecimiento. A pesar de su potencial terapéutico, su disponibilidad comercial actual depende de un exhaustivo y costoso proceso de purificación a partir de su fuente natural, lo que representa un cuello de botella para su desarrollo clínico. Como antecedente a este trabajo, estudios del metaboloma del musgo *Physcomitrium patens* revelaron que esta planta modelo es capaz de acumular salidroside tanto en condiciones normales de crecimiento como bajo estrés lumínico. Basados en este hallazgo, nuestra hipótesis postula que la sobreexpresión heteróloga de los genes biosintéticos de *R. rosea* en *P. patens* permitirá incrementar el contenido de este metabolito. Para evaluar esta hipótesis, se diseñó una estrategia de sobreexpresión en tándem de dos genes clave de la vía biosintética: *RrHPAAS* y *RrT8GT*. La construcción génica correspondiente se introdujo mediante transformación en protoplastos de *P. patens*, dirigida al locus 108 para su integración genómica por recombinación homóloga. Actualmente, se están evaluando las colonias regeneradas para identificar aquellas que hayan integrado la construcción y expresen correctamente ambas enzimas. Las líneas transgénicas seleccionadas serán utilizadas en el corto plazo para cuantificar el contenido de salidroside y validar el éxito del sistema.

Presentación oral #28

Genómica funcional para el descubrimiento de oxidorreductasas de *Porphyromonas gingivalis*

María Karla Castro Montes de Oca[1], Elizabeth Ticona-Morales[1], Juan José Reinero[2], Andrea A.E. Méndez[2], Bruno Manta[1].

[1]Institut Pasteur de Montevideo.[2]Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario, Argentina.

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica originada por la disbiosis subgingival, en la cual la bacteria anaerobia *Porphyromonas gingivalis* (Pg) cumple un rol patógeno clave. Para ser virulenta, Pg necesita secretar y plegar correctamente proteínas en su periplasma (como fimbrias y gingipaínas), proceso que depende del sistema Dsb (Disulfide bond formation), encargado de introducir enlaces disulfuro para dar estabilidad a estas proteínas. Sin embargo, a diferencia de *Escherichia coli*, el sistema de plegamiento y la maquinaria redox de Pg siguen siendo prácticamente desconocidos y no han sido caracterizados. El objetivo del proyecto es identificar y caracterizar los componentes de este sistema utilizando genómica funcional y biología sintética. Para lograrlo, la estrategia contempla la construcción de bibliotecas genómicas de las cepas de referencia Pg W83 y ATCC 33277 en plásmidos de amplio rango (siguiendo a Flórez-Cardona *et al.*) y el

clonado de fragmentos sintéticos (*gBlocks*) para genes candidatos *Trx-like*. Ambos recursos se transformarán en cepas reporteras de *E. coli* deficientes en la vía redox (Δ*dsbA*, Δ*dsbB*, Δ*dsbC/G*), evaluando la funcionalidad mediante el rescate de fenotipos disulfuro-dependientes como la motilidad en agar blando al 0,3% (vía oxidasa) y otros sistemas reporteros redox. En este trabajo se presentan los avances y resultados preliminares en la implementación de esta estrategia. Mediante el *pipeline* bioinformático se diseñaron exitosamente los constructos sintéticos (gBlocks) y se estandarizó el protocolo molecular para la generación de las bibliotecas genómicas. Como primera etapa de validación de las cepas reporteras, se optimizaron las condiciones para la prueba de motilidad en agar blando al 0,3%, logrando el registro fotográfico diferencial entre la cepa silvestre y las cepas mutantes del sistema y su efectiva recuperación fenotípica mediante complementación con un plásmido control, lo que valida formalmente esta herramienta metodológica para la Pósterior evaluación del panel de candidatos de Pg.

Mesa XIV. Proteínas: estructura, función y regulación

Presentación oral #29

Producción y caracterización del extremo N-terminal de la Env del virus de la leucemia bovina: una herramienta alternativa para estudiar interacciones virus - célula.

Melissa De León[1] ; Yrupé Arhancet[1] ; Jeniffer Chá[1] ; Mariana Salinas[1] ; Camila Sagasti[1] ; Agustin Demarco[1,2] ; Lucía Carrasco[1] ; Sergio Bianchi[1,3] Martin Fló[1,2], Florencia Rammauro[1,2] ; Natalia Olivero-Deibe[1] ; Federico Carrión[1].

1 Laboratorio de Inmunovirología / Unidad de Biofísica de Proteínas “Prof. Dr. Otto. Pritsch”, Institut Pasteur de Montevideo. 2 Unidad Académica Inmunobiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República. 3 Unidad Académica de Fisiopatología, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República.

El virus de la leucemia bovina (VLB) es un deltaretrovirus que causa leucosis bovina enzoótica, provocando importantes pérdidas económicas en la industria láctea. En Uruguay la prevalencia ronda el 80% y el control de la enfermedad se ve limitado por la ausencia de alternativas terapéuticas y/o profilácticas y la imposibilidad de aplicar estrategias de control clásicas. La ausencia de datos estructurales de la glicoproteína de envoltura (Env) así como vinculados al mecanismo molecular de unión al receptor y fusión, son una limitante para el diseño racional de vacunas y otras estrategias dirigidas al bloqueo del inicio de la infección. El presente trabajo busca producir el extremo N-terminal de la glicoproteína de superficie Env (descrito como dominio de

unión al receptor celular, RBD) y estudiar su comportamiento en solución. Esto permitirá avanzar hacia la resolución de su estructura tridimensional, e identificar interacciones directas con proteínas de la superficie celular (potenciales receptores y/o co-receptores). Aquí mostramos la producción del RBD soluble utilizando células S2 de *Drosophila,* con rendimientos de 40 mg/L. El RBD purificado por gel filtración y analizado por SDS-PAGE teñido con Coomassie evidencia una proteína de alta pureza con peso molecular acorde a un monómero. Asimismo, los análisis de estabilidad por fluorimetría diferencial de barrido (nanoDSF), indican una *Tm* de 50 °C y estudios de *western blot* con sueros de ratones inmunizados con el ectodominio completo de Env demuestran sus propiedades antigénicas incluso tras la remoción del tag de purificación. Los análisis mediante cromatografía de intercambio iónico evidenciaron la presencia de una heterogeneidad de cargas en la proteína. En función de estos resultados, se evaluaron distintas condiciones de fuerza iónica y pH con el objetivo de optimizar su almacenamiento, monitoreando su impacto sobre la estabilidad conformacional mediante nanoDSF. De forma preliminar se observó interacción del RBD con células CHO-K1 transfectadas con CAT1 bovino (proteína propuesta como receptor de VLB) mediante citometría de flujo y microscopía confocal. Se procederá a realizar estudios proteómicos para identificar interactores en células que expresan la proteína CAT1, y otras proteínas de superficie candidatas a co-receptores. En conjunto, estos resultados demuestran la obtención de un RBD recombinante soluble, estable y antigénicamente funcional, aportando evidencia preliminar de su interacción con el potencial receptor celular CAT 1. Estos hallazgos constituyen una base para futuros estudios estructurales y la identificación de proteínas celulares involucradas en el mecanismo de entrada del virus en la célula.

Presentación oral #30

El papel de la HSA en el diseño racional de compuestos antitumorales de platino: un enfoque teórico-computacional

Fabiana Salazar y E. Laura Coitiño

Laboratorio de Química Teórica y Computacional (LQTC), Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias y Centro de Investigaciones Biomédicas (CeInBio), Universidad de la República, Iguá 4225, Montevideo 11400, Uruguay

La albúmina sérica humana (HSA) es la proteína más abundante del plasma sanguíneo, donde actúa como uno de los principales transportadores de ligandos exógenos y endógenos, incluidos los compuestos bioactivos basados en metales de transición, como los de Pt(II) cuadrado-planos, que desde el descubrimiento del uso clínico del cisplatino, han sido empleados para combatir diversos tipos de cáncer. Sin

embargo, su eficacia clínica está limitada por efectos secundarios adversos y el desarrollo de resistencia innata o adquirida, lo que ha motivado la búsqueda de nuevas propuestas con mejor perfil farmacológico. En este contexto, los compuestos octaédricos de Pt(IV) emergen como profármacos antitumorales prometedores al permitir incorporar ligandos axiales bioactivos (L/L') a *scaffolds* de Pt(II) y diseñar así especies multiacción. Su poder antitumoral se manifiesta tras la activación extra- o intracelular mediante procesos de reducción disociativa, con ganancia de dos electrones y liberación de L/L'. La interacción de la HSA con especies de Pt(II) y profármacos de Pt(IV) se ha documentado por décadas. Las primeras, particularmente el cisplatino, forman aductos con His ó Met cuyo papel como reservorio o vía de inactivación es materia de debate. Los segundos, forman complejos 1:1 en los que la HSA actúa como su transportadora. Mediante *docking* ligando-proteína, dinámica molecular y QM/MM, se estudió la interacción 1:1 de la HSA con una selección de compuestos de Pt(IV) y el mecanismo de formación de aductos HSA–cisplatino. Los resultados indican que la HSA puede transportar estos profármacos sin comprometer su integridad estructural. Los sitios de unión de Sudlow I/II y el subdominio IB fueron identificados como blancos preferenciales modulados por la naturaleza de L/L' y aminoácidos clave estabilizantes, resultando en diferencias de estabilidad entre los complejos formados. En la formación del aducto HSA-cisplatino en His105, el sitio de reacción está significativamente hidratado y la barrera del proceso se reduce según la disposición inicial del fármaco, la participación de moléculas de solvente y la estabilización del cloruro saliente por aminoácidos cargados y/o moléculas de agua. Estos resultados sugieren que, según las condiciones estudiadas, la formación del aducto sería un proceso irreversible (inactivación), sin llegar a descartar totalmente un papel de la HSA como reservorio de Pt. En conjunto, estos resultados muestran su rol en la distribución de antitumorales de platino y permiten establecer criterios relevantes para el diseño racional de nuevos compuestos.

Presentación oral #31

Caracterización estructural, funcional e inmovilización de la lectina de ceibo blanco, *Erythrina cristagalli* var. *Leucochlora Lombardo*

Luciana Ottonello[1]; Pablo Galeano[1]; Azalia Rodriguez[2]; Rosario Durán[2]; Laura Franco Fraguas[1]; Sonia Rodríguez Giordano[3]; Carolina Fontana[4]; Cecilia Porciúncula González[1].

1- Área Bioquímica, Departamento de Biociencias, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. 2- Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas, Institut Pasteur de Montevideo. 3- Área Microbiología, Departamento de Biociencias, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. 4- Departamento de Química del Litoral, Centro Universitario Paysandú, CENUR Litoral Norte Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Las lectinas son proteínas capaces de reconocer carbohidratos de forma específica y reversible, constituyendo herramientas ampliamente utilizadas en glicobiología y biotecnología. En Uruguay existe una importante biodiversidad de especies vegetales potencialmente productoras de lectinas, entre ellas *Erythrina cristagalli* var. *leucochlora Lombardo* (ceibo blanco), una variedad endémica cuya distribución natural se restringe a los bosques fluviales de la desembocadura del río Cebollatí y cuya lectina no ha sido caracterizada. En este trabajo se profundizó la caracterización estructural y funcional de la lectina de ceibo blanco (EC-IL) y se evaluó su potencial como herramienta para el reconocimiento y purificación de glicoproteínas. EC-IL fue purificada a partir de semillas mediante extracción salina, fraccionamiento con sulfato de amonio y cromatografía de afinidad en galactosil-agarosa. La caracterización estructural se realizó mediante SDS-PAGE, cromatografía de exclusión molecular y análisis proteómico por digestión tríptica seguida de LC-MS/MS. Asimismo, se evaluó su actividad hemaglutinante, su especificidad mediante ensayos de inhibición de la hemaglutinación con distintos carbohidratos y su desempeño tras la inmovilización en gel de agarosa activado mediante el metodo de CDAP (tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio) y en nanopartículas magnéticas conjugadas a estreptavidina. Los resultados confirmaron que EC-IL corresponde a una proteína dimérica de aproximadamente 56 kDa, constituida por subunidades de 28 kDa y glicosilada. El análisis proteómico reveló una cobertura del 93 % respecto a la lectina de *Erythrina crista-galli* ECA (ceibo rojo) reportada en UniProt. EC-IL presentó actividad lectínica, mediante el ensayo de hemaglutinación sobre eritrocitos de conejo tratados con tripsina y fijados con glutaraldehído. La especificidad de la misma se caracterizó mediante ensayo de inhibición de la hemaglutinación frente a un amplio panel de carbohidratos. EC-IL presentó gran afinidad frente a: galactosa, *N*-acetilgalactosamina, lactosa y rafinosa, confirmando su afinidad por glicanos que contienen residuos de galactosa. Se logró inmovilizar aproximadamente 3,6 mg de EC-IL por gramo de gel de agarosa activado con CDAP y 47 µg por mg de nanopartículas magnéticas. En ambos casos se obtuvieron soportes funcionales capaces de retener selectivamente asialofetuina, mientras que la fetuina no presentó interacción, evidenciando el reconocimiento específico de residuos de galactosa expuestos. Actualmente buscamos ampliar la estrategia de caracterización molecular de EC-IL, mediante la secuenciación del gen que la codifica a partir de ADN obtenido de semillas. En conjunto, estos resultados amplían la caracterización bioquímica, estructural y molecular de la lectina de ceibo blanco, consolidándola como una nueva herramienta con potencial aplicación en glicobiología.

2- Trabajos presentados en formato póster

Los Póster con número par se presentan el jueves 17 y los número impar se presentan el viernes 18

Póster #1

Identificación y caracterización de ARNs largos no codificantes expresados diferencialmente en una línea de papa sobreexpresante de un RLK.

Agustina Taglioretti[1], Alfonso Álvarez[1], Marcos Montesano[1].

1-Laboratorio de Fisiología Vegetal, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

En Uruguay, la papa (*Solanum tuberosum*) es uno de los principales cultivos hortícolas y está expuesta a estreses bióticos causados por diversos microorganismos fitopatógenos, entre ellos *Botrytis cinerea*, agente causal del moho gris. Los ARN largos no codificantes (lncRNAs) son moléculas de más de 200 nucleótidos que regulan la expresión génica mediante mecanismos transcripcionales, postranscripcionales y epigenéticos. En diferentes especies vegetales, se ha demostrado la participación de lncRNAs en procesos asociados al desarrollo vegetal y a las respuestas frente al estrés biótico y abiótico. En el Laboratorio de Fisiología Vegetal, se generó una línea de papa (StCRK) que sobreexpresa un receptor de membrana tipo quinasa (RLK) y presenta mayor resistencia frente a la infección con *B. cinerea* que las plantas WT. Dado el potencial de los lncRNAs como reguladores de la inmunidad vegetal y la escasa información disponible sobre su participación en la interacción papa-*B. cinerea*, el objetivo de este trabajo fue identificar y caracterizar lncRNAs candidatos asociados a la línea resistente StCRK. Para ello, se analizaron datos de ARN-seq previamente obtenidos de plantas StCRK y WT en condición basal, mediante un análisis transcriptómico orientado a la identificación de lncRNAs diferencialmente expresados. Se identificaron 1653 lncRNAs, de los cuales 66 mostraron expresión diferencial; 51 de ellos presentaron mayor expresión en StCRK respecto a WT. Estos lncRNAs fueron caracterizados mediante análisis bioinformáticos que incluyeron la evaluación del potencial codificante, marcos abiertos de lectura, búsqueda de dominios proteicos mediante Pfam, localización genómica, clasificación y análisis de genes vecinos. Tras este análisis, se seleccionaron 44 lncRNAs candidatos. El análisis de los genes codificantes localizados en regiones adyacentes a los lncRNAs candidatos permitió identificar genes relacionados con señalización hormonal, quinasas dependientes de calcio, factores de transcripción MYB y proteínas implicadas en el mantenimiento del estado redox, procesos

involucrados en la respuesta de defensa vegetal. Se clonaron cuatro de estos lncRNAs en el vector pROK2 para su sobreexpresión. La expresión diferencial de estos cuatro lncRNAs será validada por RT-qPCR. Pósteriormente, se evaluará su función mediante ensayos de sobreexpresión transitoria en *Nicotiana benthamiana* para determinar su posible participación en la respuesta frente a la infección por *B. cinerea*.

Póster #2

Estandarización de un protocolo para el estudio del viroma en muestras aviares

Camila Galó[1], Eddie Fuques[2], Ruben Pérez[1], Gonzalo Tomás[1], Ana Marandino[1]

[1]Sección Genética Evolutiva, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo Uruguay. [2]Vega Thurber Lab, Department of Ecology, Evolution, and Marine Biology, University of California, Santa Barbara, CA, USA.

Las enfermedades entéricas constituyen uno de los principales desafíos sanitarios de la producción avícola intensiva, afectando el rendimiento productivo y favoreciendo la aparición de otras patologías. Diversos virus han sido asociados a estos cuadros clínicos; sin embargo, la composición de las comunidades virales (viroma) involucradas es poco conocida. La secuenciación masiva de nueva generación (NGS) permite caracterizar el viroma, aunque la baja abundancia de material genético viral en las muestras requiere protocolos eficientes de enriquecimiento previo a la secuenciación. El objetivo de este trabajo fue estandarizar un protocolo para el análisis del viroma de ARN en hisopados cloacales de aves comerciales. Se evaluaron cuatro protocolos (H1 - H4), que combinaron la presencia o ausencia de una etapa inicial de filtración de la muestra con dos estrategias de preparación de bibliotecas. Los protocolos H2 y H4 incluyeron enriquecimiento de partículas virales mediante tratamiento con nucleasas, retrotranscripción, amplificación por MDA (multiple displacement amplification) y preparación de bibliotecas con el kit Illumina DNA Prep. Los protocolos H1 y H3 utilizaron el kit Zymo-Seq RiboFree Total RNA Library Kit, el cual incluye la síntesis de ADNc, depleción de ARN ribosomal, y la preparación de bibliotecas para secuenciación compatibles con plataformas Illumina. Los protocolos H1 y H3 no permitieron obtener bibliotecas con la concentración requerida para la secuenciación. Ante estos resultados, se modificó el protocolo recomendado por el fabricante del kit, incorporando una etapa de amplificación mediante MDA inmediatamente después de la depleción de ARN ribosomal, logrando obtener bibliotecas con la concentración necesaria para su secuenciación. En paralelo, los protocolos H2 y H4 generaron bibliotecas aptas para su análisis en la plataforma MiSeq i100. El análisis bioinformático incluyó control de calidad, eliminación de secuencias del hospedero y ARN ribosomal, ensamblaje *de novo* e identificación de contigs virales mediante VirSorter2 y geNomad. Los protocolos

presentaron bajas tasas de alineamiento al genoma del hospedero (<1,5%), confirmando la eficiencia del enriquecimiento viral. Los protocolos que incluyeron una etapa inicial de filtración de la muestra presentaron una proporción 2,4 veces mayor de contigs virales de alta confianza, lo que indica un enriquecimiento viral superior y una menor interferencia de secuencias del hospedero y otros microorganismos. En conjunto, estos resultados representan un avance en la estandarización de metodologías para el estudio del viroma aviar mediante NGS. Actualmente, se continúa evaluando estos protocolos en nuevos hisopados cloacales para validar su reproducibilidad y consolidar los resultados obtenidos.

Póster #3

Ensayo piloto de un modelo murino de imagenología in vivo para estudiar la contribución de miR-301b a la metástasis del cáncer de próstata

Diana Matich[1], Ana Paula Arévalo[2], Karina Hernández[3], Patricia Cassina[3], Martina Crispo[2], María Ana Duhagon[1,4], Cecilia Mathó[1]

[1] Unidad Académica de Genética, Facultad de Medicina, UdelaR, Montevideo, Uruguay. [2] Unidad de Biotecnología en Animales de Laboratorio (UBAL), Institut Pasteur, Montevideo, Uruguay. [3] Unidad Académica de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, UdelaR, Montevideo, Uruguay. [4] Sección Genómica Funcional, Facultad de Ciencias, UdelaR, Montevideo, Uruguay

El cáncer de próstata constituye el tumor de mayor incidencia y la tercera causa de muerte por cáncer en hombres en Uruguay, siendo la enfermedad metastásica responsable de la mayoría de los fallecimientos. Los microARNs participan en la regulación postranscripcional de genes implicados en la progresión tumoral. Estudios previos de nuestro grupo identificaron a miR-301b como un microARN con potencial función oncogénica en cáncer de próstata, asociado con la invasión y la metástasis. Sin embargo, su contribución a la progresión metastásica *in vivo* permanece escasamente caracterizada. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un modelo murino que permitiera evaluar el efecto de miR-301b sobre la colonización metastásica mediante seguimiento longitudinal por bioluminiscencia.Se utilizaron células DU145 con sobreexpresión estable de miR-301b o de un ARN control comercial , ambos transcritos a partir de un constructo que también expresa la proteína mCherry. Estas células fueron modificadas Posteriormente mediante la inserción estable del vector pGL4.51 (Promega) que codifica la luciferasa. Tras la selección clonal y la validación de la expresión de miR-301b y de la actividad luciferasa, se inocularon 1×10^6 células por vía intravenosa caudal en ratones machos NOD/SCID. Se realizó un ensayo piloto con cinco animales (n=2 DU145-controlARN, n=2 DU145- miR-301b y n=1 control inyectado únicamente con PBS 1X). Se realizó un seguimiento semanal mediante el sistema de imagenología *in vivo* Bruker Xtreme II y Posterior análisis macroscópico de los órganos. El modelo permitió detectar y

monitorear la diseminación tumoral de manera longitudinal. Los animales inoculados con células que sobreexpresan miR-301b desarrollaron metástasis detectables tempranamente, observándose compromiso de pulmón, hígado y riñón, mientras que los animales control presentaron una menor carga metastásica y una distribución más limitada de las lesiones. El protocolo permitió además optimizar las condiciones de adquisición de imágenes, la selección de clones y la recolección de tejidos para estudios moleculares e histológicos Posteriores. Estos resultados preliminares respaldan la utilidad del modelo desarrollado para estudiar la progresión metastásica del cáncer de próstata y sugieren que la sobreexpresión de miR-301b podría favorecer la colonización de órganos distantes. Como siguiente etapa, el modelo será aplicado en un estudio con un mayor número de animales y condiciones experimentales optimizadas para confirmar estos resultados y profundizar en los mecanismos moleculares involucrados.

Póster #4

Estudio funcional y transcriptómico de vtRNA1-2 en cáncer de próstata

Evangelina Coitiño[1], Camila Ladra[1], Felipe Victorica[1], Lucia Colantuono[1,2], Rafael Fort[1], María Ana Duhagon[1,2].

1- Sección Genómica Funcional. Facultad de Ciencias - UdelaR; 2- Departamento de Genética, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo 11800, Uruguay

El cáncer de próstata es el tumor más frecuente en hombres y una de las principales causas de mortalidad por cáncer a nivel mundial. La comprensión de su etiología y evolución molecular, así como la identificación de biomarcadores y blancos terapéuticos se ha centrado tradicionalmente en proteínas. Los ARNs no codificantes constituyen novedosos actores en la biología tumoral con potencial impacto en el diagnóstico y/o tratamiento de la patología. Entre ellos, los ARNs vault (vtRNAs) constituyen una familia de ARN no codificantes medianos transcritos por la ARN polimerasa III, originalmente descritos por su asociación con la aún enigmática partícula vault. Aunque diversos estudios vinculan a los vtRNAs con la biología tumoral, la información disponible sobre sus funciones y mecanismos de acción se limita principalmente a vtRNA1-1 y vtRNA2-1. En contraste, el vtRNA1-2 ha sido muy poco estudiado. Nuestros antecedentes indican que vtRNA1-2 se encuentra sobreexpresado en cáncer de próstata y asociado con peores parámetros clínicos de la enfermedad, lo que sugiere un posible rol oncogénico. En este contexto, este trabajo busca determinar la contribución de vtRNA1-2 a la biología del cáncer de próstata mediante su silenciamiento transitorio con oligonucleótidos antisentido (ASOs). Se utilizan líneas celulares que modelan diferentes estadios de metástasis del cáncer de próstata (LNCaP y PC3, derivadas de metástasis en nódulo linfático y

hueso, respectivamente, y representativas de tumores sensibles e insensibles a andrógenos). El silenciamiento de vtRNA1-2 redujo significativamente la proliferación celular, incrementó la apoptosis y promovió la acumulación de células en fase G2/M en ambos modelos celulares. El análisis transcriptómico mediante RNA-seq en células PC3 silenciadas identificó 3487 genes diferencialmente expresados y reveló alteraciones en vías vinculadas a la adhesión celular, la organización del citoesqueleto y otros procesos relevantes para la progresión tumoral. En conjunto, estos resultados respaldan un posible papel oncogénico de vtRNA1-2 en el cáncer de próstata y aportan nuevos elementos para comprender los mecanismos biológicos asociados a su función.

Póster#5

Estructuras tipo G4 modulan la interacción ARN-p53: ¿Posible plataforma de regulación postranscripcional?

Fabio Saavedra[1], Irene Larghero Valdivia[1], Mónica Marín[1], Ricardo Ehrlich[2], Laurence Malbert-Colas[3], Robin Fåhreus[3,4,5], Ignacio López[1,6].

1. Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, UdelaR. 2. Institut Pasteur de Montevideo. 3. INSERM UMR 1131, Institut de Recherche Saint Louis, Université Paris Cité, París, Francia. 4. Department of Medical Biosciences, Umeå University, Umeå, Suecia. 5. RECAMO, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno, República Checa. 6. Unidad de Biología Celular, Institut Pasteur de Montevideo. *Contribuyeron de igual manera.

La proteína supresora de tumores p53 desempeña un papel central en el mantenimiento de la homeostasis celular, lo que contribuye con la prevención del cáncer. p53 es un factor de transcripción que regula la expresión de genes involucrados en la detención del ciclo celular, la reparación del ADN y la apoptosis frente a la ocurrencia de distintos tipos de estrés, lo que ha sido ampliamente caracterizado. En los últimos años, sin embargo, han surgido más evidencias que sugieren que p53 también actúa como un regulador postranscripcional. Esta propiedad parece adquirir relevancia durante la respuesta a proteínas desplegadas (Unfolded Protein Response, UPR), una respuesta adaptativa frente al estrés en el retículo endoplasmático (RE) y que tiene como objetivo restaurar su homeostasis. La alteración de la UPR se ha asociado al desarrollo y progresión de diversas patologías, entre ellas el cáncer. Por tanto, resulta relevante estudiar el rol de p53 en esta respuesta y los mecanismos moleculares involucrados. Previamente, nuestro grupo realizó estudios transcriptómicos y proteómicos comparando células en condiciones basales y de UPR en presencia y ausencia de p53. Estos análisis identificaron un conjunto de proteínas con expresión diferencial dependiente de p53 durante el estrés sin detectar el mismo tipo de cambio en la expresión de los ARN mensajeros (ARNm) que las codifican. Análisis de enriquecimiento de secuencias mostraron que varios de estos transcritos contienen secuencias ricas en guaninas en

sus regiones no traducidas 5' (5'UTRs). A través de aproximaciones *in silico*, en este trabajo identificamos que las 5'UTRs de varios de los ARNm encontrados tienen potencial para plegarse en estructuras secundarias no canónicas de tipo G-cuádruplex (G4). Además, evaluamos la capacidad de algunas regiones derivadas de las 5'UTRs de ARNm candidatos de formar G4 *in vitro* mediante espectroscopía de dicroísmo circular. Asimismo, por ensayos de co-inmunoprecipitación (co-IP) acoplados a RT-qPCR, detectamos que las 5'UTRs de los genes *FXR2* y *CSNK1A1* establecen interacciones directas con p53 expresada en *Escherichia coli*. Más importante, el agregado de un compuesto que se une selectivamente a G4 de ARN (PhenDC3) en los ensayos de co-IP, resultó en una disminución de la interacción p53-ARN en un 60%. Esto sugiere que estas interacciones p53-ARN dependen, al menos en parte, de la presencia y/o disponibilidad de estructuras de tipo G4 en el ARN. Actualmente estamos caracterizando las interacciones e identificando nuevos transcritos potencialmente asociados a p53 en células durante la UPR mediante RIP-Seq.

Póster #6

Perfil transcriptómico y relevancia clinicopatológica de los svtRNAs en cáncer de próstata

Jake Sheppard[1], Pablo Smircich[1,2], María Ana Duhagón[1,3], Rafael Sebastián Fort[1]

1 Sección Genómica Funcional, Facultad de Ciencias, UdelaR, Montevideo 11400; 2 Departamento de Genómica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo 11600; 3 Departamento de Genética, Facultad de Medicina, UdelaR, Montevideo 11800, Uruguay.

Los vault ARNs (vtRNA) son ARNs no codificantes (ncRNA) transcritos por la ARNpol III. En humanos son cuatro en dos *loci* del cromosoma 5: tres agrupados en un *locus*, y el parálogo vtRNA2-1 en un *locus* más distante. Se descubrieron inicialmente en relación a la partícula vault, un organelo eucariota cuya caracterización funcional resulta elusiva. Sin embargo, los vtRNAs se distribuyen mayoritariamente en el citoplasma, sugiriendo otros roles en el metabolismo celular. Por otra parte, el paradigma actual reconoce que muchos ncRNAs se procesan para dar lugar a ARNs pequeños (sncRNA) con otras funciones. Si bien el ejemplo mejor descrito de esta clase son los microARNs (miRNA), se han descrito fragmentos de ARNs de transferencia, nucleolares, ribosomales, entre otros, motivando nuevos trabajos que exploran esta capa reguladora. A pesar de haber reportes sobre fragmentos de vtRNAs asociados a proteínas AGO, no existía una anotación exhaustiva y sistemática de estas moléculas, por lo que nuestro grupo desarrolló una estrategia de anotación a partir de datos transcriptómicos de sncRNAs, estableciendo la primera anotación abarcativa de vault ARNs pequeños (svtRNA) humanos, identificando varios de los svtRNAs previamente detectados en la literatura. The Cancer Genome Atlas (TCGA) es un repositorio masivo de múltiples capas ómicas para más de 30

tipos de cáncer. En particular, TCGA-PRAD se trata de una cohorte de aproximadamente 500 pacientes de cáncer de próstata, complementando muestras tumorales con 52 de tejido normal adyacente, así como metadatos clínicos y moleculares de cada paciente. A partir de datos de small RNA-seq se cuantificó la expresión de svtRNAs conjuntamente a miRNAs humanos. Se evaluó la expresión diferencial entre tejido normal y tumoral, revelando varios svtRNAs enriquecidos en el tumor que se priorizaron como candidatos para estudiar asociaciones con variables clinicopatológicas y moleculares, entre ellas el puntaje de Gleason, estadio patológico, carga mutacional, etc. Se identificaron svtRNAs derivados de tres de los vtRNAs precursores, uno asociado con atributos de mayor agresividad tumoral (svtRNA2-1b) y otros vinculados a estadios y puntaje de Gleason más bajos (svtRNA1-1e, svtRNA1-2d). Se integraron conteos de mRNAs en abordaje mediante redes de coexpresión, identificando módulos correlacionados con svtRNAs, particularmente svtRNA2-1a/2-1b, y svtRNA1-1e/1-1f. Se analizaron estos módulos para identificar posibles programas transcripcionales relacionados a los svtRNAs, hallando asociaciones con vías como la autofagia, la cadena respiratoria, la glicosilación y la organización de la matriz extracelular. Estos resultados resaltan la importancia de explorar la capa reguladora del "*fragmentoma"* humano.

Póster #7

Evaluación del rol de un elemento en CIS regulador en la traducción durante el ciclo proliferativo de *Trypanosoma cruzi*.

Molina-Caramelli, Leonardo[1,2]; Sotelo-Silveira, José[3]; Chavez, Santiago[1,2]; Duhagon, María Ana[1,2].

1. Sección Genómica Funcional, Facultad de Ciencias, UdelaR. 2. Departamento de Genética, Facultad de Medicina, UdelaR. 3. Departamento de Genómica, IIBCE.

El protozoario unicelular *Trypanosoma cruzi* es el causante de la tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas. Esta parasitosis afecta a más de 6 millones de personas a nivel mundial, principalmente afectando a Latinoamericanos donde el vector que la transmite es endémico. Solo un bajo porcentaje de individuos son diagnosticados y aproximadamente un tercio de estos sufrirán daños cardíacos, que eventualmente llevarán a una insuficiencia cardíaca progresiva o incluso a muerte súbita. *T. cruz*i presenta un ciclo de vida complejo, donde múltiples formas alternan entre su hospedero mamífero y el insecto. En este contexto, los mecanismos que controlan el ciclo celular de *T. cruzi* aún no están del todo comprendidos, aunque la evidencia reciente muestra que existe divergencia con los que operan en el hospedero mamífero. Como antecedente, en nuestro grupo de trabajo determinamos el transcriptoma, traductoma (mediante *Ribosome Profiling*) y proteoma de la transición proliferativa G1/S de epimastigotas de *T. cruzi*. Para grupos de genes

co-regulados se analizó el enriquecimiento de motivos de secuencia en las regiones UTR de sus ARNm. De esta forma se identificó un motivo de secuencia de 7 nucleótidos (uUAGAU) en las regiones 3'-UTR de 77 genes con mayor eficiencia de traducción durante la fase S. Entre ellos, se seleccionaron 2 genes TcKKT14 y TcPUF9 que presentaban cambios de gran magnitud en los niveles de traducción en la transición S/G1. Con estos genes nos propusimos evaluar la capacidad del motivo para modular la expresión de un sistema reportero a lo largo del ciclo celular de *T. cruzi*. Para esto, emplearemos un sistema reportero dual, donde se inserta la región 3'-UTR del gen de interés bajo un gen de luciferasa (Firefly), mientras que el vector codifica para otra luciferasa que actúa como control (Renilla). Diseñamos también controles con las regiones UTR de los genes deletadas y los transfectamos por electroporación en cultivos de epimastigotas de *T. cruzi.* Sincronizamos los cultivos empleando hidroxiurea para obtener muestras enriquecidas en las diferentes etapas del ciclo celular y analizamos el patrón de expresión del gen reportero bajo el control de las regiones 3'-UTR que portaban el motivo y los comparamos con las regiones UTR control sin motivo. Contamos con resultados preliminares donde se puede observar una modulación cuando las UTRs portan el motivo. Estos resultados serán corroborados con un mayor número de réplicas para ser presentados en las jornadas.

Póster #8

Evaluación de estrategias para la cuantificación y caracterización de vtARNs extracelulares en cáncer de próstata.

Lucía Boim[1,2], Rosina Servetto[3], Lucía Colantuono[1,4], Rafael Fort[1], Cecilia Mathó[4], María Ana Duhagon[1,4].

[1] Sección Genómica Funcional, Facultad de Ciencias, UdelaR [2] Universidad ORT, Montevideo [3]Unidad de Oncología, Hospital de Clínicas, UdelaR [4]Unidad Académica de Genética, Facultad de Medicina, UdelaR

Los ARN no codificantes extracelulares constituyen biomarcadores promisorios para biopsia líquida. Entre ellos, los “vault” RNAs (vtARNs) han despertado interés por su potencial participación en la biología tumoral y la comunicación intercelular; sin embargo, su cuantificación y caracterización en el compartimento extracelular presentan desafíos metodológicos por su tamaño pequeño, estructura secundaria y similitud de secuencia de sus miembros. El objetivo de este trabajo fue evaluar estrategias para la cuantificación de vtARNs y caracterizar su distribución en el medio extracelular de modelos de cáncer de próstata. Se compararon dos estrategias de retrotranscripción y cuantificación por RT-qPCR: 1- poliadenilación seguida de síntesis de ADNc con oligo(dT); y 2- retrotranscripción con cebadores aleatorios. Se analizó la especificidad, sensibilidad y desempeño de ambos métodos. La segunda estrategia

mostró mayor especificidad de amplificación y menor formación de productos inespecíficos que la primera, constituyendo una alternativa más robusta para la cuantificación de vtARNs. Asimismo, se evaluaron dos métodos de fraccionamiento extracelular, ultracentrifugación diferencial (UCD) y cromatografía de exclusión molecular (SEC), utilizando medios condicionados de células LNCaP y muestras de plasma de pacientes con cáncer de próstata diseminado previo al inicio del tratamiento. La distribución de los vtARNs se determinó mediante RT-qPCR en las fracciones obtenidas. Los análisis de fraccionamiento detectaron vtARNs en el compartimento extracelular y evidenciaron una distribución diferencial entre las fracciones obtenidas por UCD. En contraste, la SEC presentó menor rendimiento para su detección bajo las condiciones evaluadas. Se realizó además un ensayo piloto de cuantificación de vtRNAs en plasma de pacientes, mediante el cual se pudo detectar los 4 vtARNs de forma sensible y específica, apoyando la factibilidad de su análisis en biopsia líquida. Sobre la base de estos resultados se estableció una cohorte prospectiva de 10 pacientes con cáncer de próstata diseminado y 10 donantes sanos para evaluar la expresión sérica de los vtARNs y su asociación con parámetros clínicos, incluyendo niveles de PSA. Hasta el momento se completó el reclutamiento y la extracción de ARN de todas las muestras, obteniéndose cantidades y calidades compatibles con los análisis moleculares previstos. En conjunto, estos resultados establecen una estrategia experimental robusta para el estudio de vtARNs extracelulares y aportan evidencia sobre su distribución en modelos de cáncer de próstata. La implementación de esta metodología en una cohorte clínica prospectiva permitirá evaluar la utilidad de los vtARNs séricos como biomarcadores no invasivos y explorar su asociación con variables clínicas y de respuesta al tratamiento.

Póster #9

Identificación de proteínas arquitectónicas de *Trypanosoma cruzi*

Sofía Camejo[1], Carlos Robello[1,2], Florencia Díaz-Viraqué[1]

1 Laboratorio de Interacción Hospedero-Patógeno, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay. 2 Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

La organización tridimensional de la cromatina desempeña un papel fundamental en la regulación de la expresión génica y en el mantenimiento de la identidad celular. *Trypanosoma cruzi*, parásito protozoo causante de la enfermedad de Chagas, presenta una arquitectura genómica tridimensional con características distintivas respecto de otros organismos eucariotas modelo. En este contexto, el objetivo de este trabajo fue desarrollar y optimizar un protocolo para la identificación de proteínas arquitectónicas asociadas a regiones específicas del genoma de *T. cruzi* mediante

espectrometría de masas. La metodología se estructuró en diferentes etapas. En primer lugar, se realizó un análisis *in silico* para identificar regiones genómicas potencialmente relevantes para la organización estructural de la cromatina y se diseñaron sondas de ADN antisentido específicas para su aislamiento dirigido. Posteriormente, se obtuvieron cultivos de *T. cruzi* en fase exponencial y se optimizaron las condiciones de fijación de las interacciones ADN-proteína. Los complejos nucleoproteicos fueron aislados mediante la formación de quimeras y un sistema de enriquecimiento por *pull-down*, basado en la interacción estreptavidina-biotina y el empleo de nanopartículas magnéticas. Finalmente, las muestras enriquecidas fueron procesadas mediante espectrometría de masas y los datos obtenidos fueron analizados computacionalmente. El análisis permitió identificar un grupo reducido de proteínas del parásito asociadas a la región genómica estudiada, postulándolas como candidatas de alta confianza a participar en su organización estructural y regulación biológica. Estos resultados permitieron establecer un protocolo optimizado para la captura e identificación de proteínas arquitectónicas, con potencial para su adaptación al estudio de diferentes regiones de la cromatina y otros organismos. En conjunto, este trabajo contribuye al conocimiento de los mecanismos de organización y regulación de la cromatina en *T. cruzi* y proporciona una herramienta para el estudio de la arquitectura genómica en tripanosomátidos, así como para la identificación de nuevos candidatos involucrados en su regulación epigenética y estructural.

Póster #10

Permaneciendo juntos tras la ruptura: estabilidad y reparación de “mitades” de tRNAs circulantes

S. Dacosta[1], V. Blanco[1], B. Costa[1,2], A. Cabrera[1], JP. Tosar[1,2]

1- Laboratorio de Genómica Funcional, IPMon, 2- Unidad de Bioquímica Analítica, Fcien, UdelaR

Múltiples estudios independientes han reportado niveles significativamente menores de fragmentos derivados de tRNA (tDR) en plasma anticoagulado con EDTA, en contraste con su persistente detección en plasma anticoagulado con heparina y en suero. Este fenómeno se ha interpretado como evidencia de que los quelantes desestabilizan complejos ribonucleoproteicos extracelulares conteniendo tDRs. Sin embargo, no existe evidencia directa que sustente este modelo, y los mecanismos que determinan la estabilidad de los tDRs extracelulares permanecen desconocidos. Por lo tanto, nos propusimos entender la enigmática desaparición de los tDRs circulantes en plasma a la luz de un hallazgo reciente de nuestro grupo: la existencia de los “nicked tRNAs” y su potencial como reservorio de tDRs en fluidos biológicos. Nuestros resultados muestran que la estabilidad de los “nicked tRNAs” en fluidos

extracelulares depende de la presencia de cationes Mg^{2+}. En ausencia de ellos, la estructura compacta de estos RNAs se relaja, volviéndose susceptibles a las RNasas extracelulares. Lo que demuestra que la pérdida de tDRs en plasma con EDTA se debe a una desestabilización de los “nicked tRNAs” más que a una rotura de complejos ribonucleoproteicos conteniendo mitades de tRNA. Asimismo, presentaremos REJOIN-seq, un método que permite reparar tanto “nicked tRNAs” como otros RNAs discontinuos circulantes, recuperando información estructural con múltiples beneficios para el estudio del RNA extracelular. Una de las aplicaciones más prometedoras de esta técnica es en el campo de las biopsias líquidas, como herramienta de diagnóstico temprano del cáncer. Ya que mediante modelos de aprendizaje automático, las lecturas de “nicked tRNAs” reparados permiten clasificar muestras de pacientes oncológicos y de donantes sanos con alta especificidad y sensibilidad.

Póster #11

¿Cuánto aporta el sexo genético de las células a su fenotipo? Análisis transcriptómico de tejido adiposo de animales Bbs4-/-

Ileana Sosa Redaelli[1], Luisa Berná[2,3,4], Victoria Prieto-Echagüe[1]

[1]Laboratorio de Genética Molecular Humana, Institut Pasteur de Montevideo. [2]Unidad de Bioinformatica, Institut Pasteur de Montevideo. [3]Laboratorio de Biología de Apicomplejos, Institut Pasteur de Montevideo. [4]Laboratorio de Biología de Genómica Evolutiva, Facultad de Ciencias, UdelaR, Montevideo, Uruguay.

La obesidad es una epidemia mundial. Su prevalencia, la distribución del tejido adiposo y parámetros metabólicos presentan dimorfismo sexual. En el síndrome de Bardet-Biedl (BBS) que estudiamos como un modelo de obesidad, los ratones Bbs4-/- ganan más peso que los WT y las hembras Bbs4-/- lo hacen antes y en mayor magnitud que los machos. Antes de que se detecten diferencias de peso corporal, las hembras Bbs4-/- acumulan más tejido adiposo subcutáneo que las hembras WT, mientras que esta diferencia es menos pronunciada en los machos. Considerando el concepto de que «cada célula tiene un sexo» y la recomendación de incluir el sexo como variable biológica, proponemos determinar si estas diferencias pueden deberse a características celulares propias del tejido adiposo. Hipotetizamos que las diferencias en la ganancia de peso entre hembras y machos Bbs4-/- reflejan diferencias intrínsecas en las células progenitoras del tejido adiposo, que condicionan su capacidad de generar y acumular adipocitos. Para evaluar esta hipótesis, obtuvimos tejido adiposo subcutáneo inguinal de ratones machos y hembras, WT y Bbs4-/-. Aislamos la fracción estromal vascular, que contiene células progenitoras de adipocitos, y establecimos cultivos primarios. Realizamos secuenciación de ARN en tejido y células cultivadas y evaluamos los efectos del sexo, el genotipo y su

interacción mediante análisis multifactorial de expresión diferencial y análisis de componentes principales. El primer componente explicó el 80 % de la variabilidad en tejido y el 74 % en cultivo, separando marcadamente las muestras de hembras y machos; los componentes secundarios mostraron separaciones asociadas al genotipo. Considerando genes con cambios de expresión, en tejido identificamos 5056 genes diferencialmente expresados por sexo, 1113 por genotipo y 527 asociados a la interacción (para los que el genotipo afecta diferencialmente segun el sexo). En cultivo identificamos 2789, 14 y 87 genes, respectivamente. Al analizar cada sexo por separado, la comparación Bbs4-/- frente a WT identificó 417 genes diferencialmente expresados en machos y 28 en hembras. Estos resultados preliminares indican que el sexo es una fuente principal de variación transcripcional en tejido y cultivo, y orientan futuros estudios que profundizarán en el efecto diferencial de la depleción de Bbs4 en función del sexo.

Póster #12

Generación de un modelo celular de cáncer de próstata *knock-out* para el gen vtRNA1-2 humano

Matilde Rodriguez[1*], Inés Lamela[1*], Eugenia Casella[1*], Evangelina Coitiño[1], María Ana Duhagon[1,2], Rafael Sebastián Fort[1]

1- Sección Genómica Funcional, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo 11400, Uruguay; 2- Departamento de Genética, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo 11800, Uruguay. *contribución equivalente

El gen vtRNA1-2 ha emergido como un regulador clave en procesos asociados a la transformación tumoral. Sin embargo, su función molecular en cáncer prostático permanece poco caracterizada, en parte, debido a la falta de modelos celulares que permitan estudiar su pérdida completa. En una tesina previa (llevada a cabo en nuestro laboratorio) se intentó generar un *knock-out* (*KO*) de vtRNA1-2 mediante CRISPR/Cas9 en las líneas celulares PC-3 y LNCaP, pero no se logró obtener clones editados, lo que se atribuyó a baja eficiencia teórica de los sgRNAs diseñados. En este proyecto inscripto en el Programa de Apoyo a la Investigación Estudiantil (PAIE), nos propusimos optimizar la estrategia de edición génica implementando la estrategia de doble corte, para inducir una deleción completa del locus vtRNA1-2 utilizando nuevos sgRNAs. El diseño bioinformático de sgRNAs se realizó mediante la plataforma CRISPOR, evaluando la ubicación, proximidad a PAMs (NGG), puntajes de eficiencia teórica y de corte, priorizando un bajo perfil de *off-targets* e impacto en regiones génicas. Se seleccionaron 6 candidatos de sgRNAs: 3 ubicados *upstream* y 3 *downstream*. Para los sgRNAs se diseñaron oligonucleótidos solapantes para realizar una reacción de extensión por PCR utilizando la polimerasa KAPA-HiFi, generando moldes de ADN bicatenario extendidos. Posteriormente, se purificó

mediante columnas de sílica para eliminar elementos residuales. Como modelo celular seleccionamos la línea LNCaP (Lymph Node Carcinoma of the Próstata). Las células fueron extraídas de una metástasis de nódulo linfático derivado de cáncer prostático. LNCaP posee una alta expresión de vtRNA1-2, constituyendo un sistema biológico óptimo para evaluar las consecuencias funcionales de su inactivación. Bajo condiciones asépticas, realizamos el mantenimiento y la expansión de esta línea celular, cultivándolas en medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino y antibiótico en condiciones de incubación estándar. Implementamos recambios periódicos de medio y subcultivos tras alcanzar la confluencia adecuada. A continuación, proyectamos co-transfectar los sgRNAs junto con un plásmido que expresa eCas9 en células LNCaP, respaldada por ensayos *in vitro* que evaluarán la efectividad de corte de la enzima. El resultado principal de este trabajo será la generación de un modelo celular *KO* para vtRNA1-2 que habilitará estudios Posteriores sobre su potencial rol oncogénico.

Póster #13

Estructura 3D, dinámica conformacional y mecanismos de inhibición de la NADH-Fumarato Reductasa de *Trypanosoma cruzi*: Claves moleculares para el diseño selectivo de antichagásicos

E. Laura Coitiño* y Fabiana Salazar

Laboratorio de Química Teórica y Computacional (LQTC), Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias y Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Universidad de la República, Montevideo 11400, Uruguay

La enfermedad de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) requiere el desarrollo de terapias selectivas dirigidas a blancos indispensables para la supervivencia del parásito, sin expresión en el hospedero. La fumarato reductasa NADH-dependiente [EC 1.3.16] de *T. cruzi* (NADH:*Tc*FR) es una enzima monomérica de 1215 aminoácidos que cataliza la reducción de fumarato a succinato y cumple con este criterio. A pesar de su interés biotecnológico y farmacológico y de disponer de su secuencia, la falta de una estructura 3D experimental ha obstaculizado durante mucho tiempo la comprensión de su mecanismo y el diseño racional de inhibidores. Aquí presentamos el modelo estructural 3D más completo y confiable de NADH:*Tc*FR disponible, construido mediante predicción con AlphaFold2 y *docking* del cofactor y refinado mediante simulaciones de dinámica molecular (MD). Por análisis de secuencia y estructura se evaluó críticamente la hipótesis sostenida en la literatura por homología, de que la enzima utilizaría simultáneamente $FADH_2$ y NAD(P)H como cofactores. En otras FR mejor caracterizadas, el bolsillo de unión a flavinas con motivos GXGXXG se localiza en los primeros 300 residuos del dominio N-terminal. En NADH:*Tc*FR ese segmento (descartado al construir el modelo actual) se sitúa en una zona distal al sitio activo y

es predicho con muy baja confianza por AlphaFold2, en una región estructuralmente desordenada, incompatible con la formación de un bolsillo estable para FAD/$FADH_2$. En cambio, el dominio catalítico presenta plegamiento y motivo característicos y electrostáticamente adecuados para alojar al NADH, con ocupación estable en MD extensa, posicionando el anillo nicotinamídico en orientación catalíticamente competente. Estas evidencias sustentan un mecanismo directo dependiente de NADH. La simulación MD revela una arquitectura estable, con 3 dominios globulares, desplazamientos interdominio 1-2 y 2-3 e internos al dominio catalítico central 2, articulando hemidominios que definen el sitio activo alternando entre conformaciones abiertas -requeridas para ingresar el sustrato-, cerradas -competentes para la catálisis- e intermedias. La transición es controlada por una región bisagra profunda, situada en el fondo del dominio catalítico, bajo el bolsillo del NADH. Esta flexibilidad conformacional intrínseca explica la dificultad para cristalizar la proteína y permite proponer mutaciones estratégicas para restringir su movilidad, así como identificar dos regiones susceptibles de inhibición: (a) la entrada del canal de acceso al sitio activo, donde actuarían inhibidores competitivos, y (b) la región bisagra, desde donde la disposición del cofactor y la transición abierta/cerrada pueden alterarse, lo que ejercería una inhibición alostérica. Incluimos aquí ejemplos de ambos tipos, con complejos de metales de transición ya estudiados como antichagásicos, cuyas interacciones con la enzima permiten racionalizar su actividad inhibitoria. En conjunto, estos hallazgos clarifican la regulación funcional de NADH:*Tc*FR y sientan las bases racionales para el desarrollo de nuevos antichagásicos selectivos.

Póster #14

Inactivación de peroxiredoxina 5 humana por hidroperóxidos de ácidos grasos

Cardozo, Giuliana [1, 2]; Viera, Nicolás [3, 2]; Radi, Rafael [3, 2, 4]; Reyes, Aníbal M. [3, 2, 4]; Trujillo, Madia [3, 2]

1- Departamento de Educación Médica, Facultad de Medicina, Universidad de la República 2- Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad de la República 3- Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República 4- Programa de Alimentos y Salud Humana (PAyS), Facultad de Medicina, Universidad de la República

El compartimiento mitocondrial es uno de los principales sitios de formación de especies oxidantes, tales como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), peroxinitrito e hidroperóxidos orgánicos. Para regular la concentración de dichas especies, varias enzimas con localización mitocondrial presentan actividad reductora de hidroperóxidos. Una de ellas es la peroxiredoxina 5 (Prdx5), una peroxidasa basada en tioles, cuya reactividad frente a H_2O_2 y peroxinitrito se encuentra ampliamente caracterizada. Considerando que se ha descrito que otras peroxirredoxinas son capaces de reducir hidroperóxidos de naturaleza orgánica, se propuso evaluar la

reactividad de Prdx5 frente a hidroperóxidos de ácidos grasos (AG-OOHs). A pesar de que fue posible identificar actividad reductora de estas especies oxidantes mediante diferentes metodologías, no se registró actividad bajo condiciones catalíticas. En presencia del sistema reductor tiorredoxina (Trx)/tiorredoxina reductasa (TR)/NADPH, Prdx5 fue incapaz de reducir H_2O_2 luego de ser incubada con AG-OOHs derivados de ácido linoleico y ácido eicosapentaenoico, evidenciando un fenómeno de inactivación enzimática. En cambio, la enzima retuvo su actividad reductora de H_2O_2 cuando fue incubada con el alcohol correspondiente al producto de reducción de AG-OOHs así como con el ácido graso precursor del AG-OOH, demostrando que la inactivación es dependiente de la presencia del grupo -OOH. Dado que la fluorescencia intrínseca de *Ec*Trx varía según su estado de oxidación, fue posible confirmar los anteriores resultados siguiendo el cambio de dicha fluorescencia en condiciones catalíticas. La observación del fenómeno de inactivación en ausencia de TR permitió además controlar que la falta de actividad registrada en el ensayo acoplado fuese consecuencia directa de la inhibición de Prdx5 y no de TR. Alternativamente, mediante la medida de actividad tiorredoxina reductasa por reducción de insulina y de selenito, se corroboró que la actividad de TR en presencia y en ausencia de AG-OOHs, en condiciones similares a las utilizadas en el ensayo acoplado, es análoga. Por lo tanto, Prdx5, pero no TR, es inactivada por AG-OOHs. Considerando que el mecanismo de inactivación es dependiente de la presencia del grupo -OOH, se evaluó la sobreoxidación de Prdx5 como potencial responsable de la inactivación de la enzima. Sin embargo, el análisis por espectrometría de masas no evidenció Prdx5 sobreoxidada luego de ser tratada con AG-OOHs, en forma consistente con la baja susceptibilidad a la sobreoxidación previamente reportada para H_2O_2. A partir de estos resultados se explorará la posibilidad de que la interacción Prdx5-AG-OOH impida la progresión del ciclo catalítico hacia la reducción por Trx.

Póster #15

¿Las mercaptopiruvato azufretransferasas son persulfuradoras de proteínas? Evidencia de un mecanismo alternativo

J. J. Ríos-Ferreira[1,2], M. Mastrogiovanni[3,4,5], M. Bonilla[4,6], E. Cuevasanta[1,4]

1 Laboratorio de Fisicoquímica Biológica, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias - UdelaR, Uruguay; 2 Laboratorio de Enzimología, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias – UdelaR, Uruguay; 3 Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina - UdelaR, Uruguay ; 4 Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO) - UdelaR, Uruguay; 5 Programa en Alimentos y Salud Humana (PAyS) - UdelaR, Uruguay 6 Laboratory Redox Biology of Trypanosomes, Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay.

Las mercaptopiruvato azufretransferasas (MSTs) son enzimas ampliamente distribuidas en todos los dominios de la vida, desde bacterias y levaduras hasta plantas y animales. Catalizan la transferencia del átomo de azufre del

3-mercaptopiruvato (3MP, dador de azufre) hacia diversas moléculas aceptoras. Este proceso involucra la formación inicial de un persulfuro en la cisteína catalítica del sitio activo de la enzima (MST-SSH). En una segunda etapa, los aceptores captan el azufre externo para generar productos azufrados, restaurando el tiol de la cisteína catalítica (MST-SH). Recientemente, se le adjudicó a las MSTs un rol en la persulfuración de cisteínas, una modificación postraduccional capaz de modular la función y/o actividad de las proteínas, además de proteger a los tioles frente a la oxidación irreversible. Sin embargo, el mecanismo preciso por el cual las MSTs transfieren el azufre a otras proteínas continúa siendo motivo de debate. En la bibliografía más reciente del área, se ha propuesto que estas enzimas persulfuran proteínas únicamente mediante la transferencia directa del persulfuro desde la cisteína catalítica del sitio activo hacia proteínas aceptoras. En este trabajo se utilizó la MST recombinante de *Escherichia coli* (SseA) como modelo debido a que presenta una única cisteína (la cisteína catalítica). Se realizaron estudios cinéticos pre-estacionarios monitoreando los cambios en la fluorescencia intrínseca de la enzima en un equipo de flujo detenido (stopped-flow) al formarse el persulfuro del sitio activo (SseA-SSH), empleando distintos dadores de azufre (3MP, tiosulfato y benzenotionosulfonato). Se estableció un procedimiento para obtener muestras enriquecidas en SseA-SSH y se corroboró su formación mediante espectrometría de masas. La SseA-SSH se usó Pósteriormente para estudiar la cinética de transferencia de azufre hacia distintos aceptores fisiológicos (glutatión, cisteína, cianuro, sulfito y H_2S). De esta forma, se obtuvieron parámetros cinéticos para la formación y el desmantelamiento del persulfuro del sitio activo para distintos sustratos, así como valores de pK_a para el tiol y persulfuro. Adicionalmente, mediante ensayos cinéticos en estado estacionario en un sistema enzimático acoplado, se demostró que la tiorredoxina no reduce directamente al persulfuro de la SseA. Los resultados obtenidos indican que la persulfuración de proteínas está mediada por especies azufradas de bajo peso molecular generadas por la MST al procesar 3MP y no por transferencia directa del azufre desde el sitio activo. Estos hallazgos aportan nueva evidencia experimental que contradice el modelo más recientemente aceptado, y redefine el mecanismo catalítico de las MSTs.

Póster #16

Estudio DFT/PCM del efecto de la polaridad del entorno sobre el mecanismo catalítico de la enzima NADH:*Tc*FR blanco selectivo para antichagásicos

Julieta Schmidt Smerdiner, Fabiana Salazar y E. Laura Coitiño*

Laboratorio de Química Teórica y Computacional (LQTC), Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias y Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Universidad de la República, Iguá 4225, Montevideo 11400, Uruguay.

El mal de Chagas afecta mundialmente a más de 7 millones de personas, principalmente en Latinoamérica. Causado por la infección de *T. cruzi*, un parásito

protozoario, comienza con una fase aguda, que suele pasar inadvertida y sigue con otra crónica en la que ocurre mayoritariamente el diagnóstico. Siendo los tratamientos disponibles eficaces en la fase aguda, con fuertes efectos adversos en la crónica, la búsqueda de nuevas dianas selectivas resulta imperativa. Dentro del hospedero, *T. cruzi* respira anaeróbicamente. El fumarato, aceptor final en su cadena de electrones, se transforma en succinato por acción de la fumarato reductasa NADH-dependiente (EC 1.3.1.6; NADH:*Tc*FR), enzima no expresada en mamíferos y blanco selectivo ideal para antichagásicos. Soluble en citosol y glicosoma o asociada a la membrana mitocondrial, no hay a la fecha estructuras 3D elucidadas experimentalmente. Su secuencia (Q4CYX1_TRYCC, 1215 aminoácidos) se organiza en tres dominios, siendo el catalítico central y conteniendo al NADH. Combinando secuencia, bioinformática estructural y simulaciones computacionales, se crearon dos modelos 3D en el LQTC: uno limitado al dominio central catalítico (Merlino&Coitiño, 2014) y otro más reciente, confiable y completo, abarcando los tres (Salazar&Coitiño, 2023). Del primero se extrajo un recorte del sitio activo, incluyendo parte del cofactor, $ArgH^+$, fumarato y 2 aguas explícitas, buscando elucidar a nivel DFT/PCM un mecanismo detallado de catálisis en 2 etapas: **(a)** transferencia acoplada de H^+ y 2e del anillo nicotinamida de NADH al fumarato, limitante; **(b)** transferencia protónica post-TS desde Arg al intermediario cargado resultante en la 1^{era} etapa (Sastre&Coitiño, 2017). Partiendo de las estructuras de especies estables y estado de transición (TS) de cada etapa, derivadas del modelo reducido en agua al nivel ωB97XD/6-31+G** y usando IEFPCM, se evaluó la sensibilidad al entorno en 7 medios de $\varepsilon \cong$ 2-4-10-25-33-37-47-78. Se identificó un rango con ε entre 10 y 33 de estabilización óptima de las especies, en el que se profundizó caracterizando caminos de reacción IRC al mismo nivel, con seguimiento de la evolución de parámetros geométricos y electrónicos (cargas atómicas NPA y órdenes de enlace de Wiberg). Los resultados indican que la polaridad del entorno modula la estabilidad de las especies participantes y el ancho de ambas barreras de reacción (relevante en efecto túnel) sin cambiar el mecanismo planteado, permitiendo definir condiciones óptimas para modelar la reacción en la enzima completa y hacia el diseño racional de inhibidores selectivos de *Tc*FR.

Póster #17

Caracterización y análisis funcional de proteoformas de citocromo c

Lorena Herrera[1,2,3], Manuela Pose[1,3], Ulises Zitare[4,5], Daniel Murgida[4,5], Mauricio Mastrogiovanni[1,3,2], Ari Zeida[1,2,3], Lucía Piacenza[1,3], Rafael Radi[1,3,2]

1-Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República. 2-Programa en Alimentos y Salud Humana (PAyS), Facultad de Medicina, Universidad de la República. 3-Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Facultad de Medicina, Universidad de la República. 4-Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química-Física, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. 5-Instituto de Química Física de los Materiales, Medio Ambiente y Energía (INQUIMAE, CONICET-UBA), Argentina.

El citocromo c (cyt c) es una hemoproteína localizada en el espacio intermembrana mitocondrial que participa en la cadena de transporte de electrones durante la respiración celular. Bajo condiciones de estrés, puede liberarse al citosol y desencadenar apoptosis. Además, puede sufrir modificaciones oxidativas, como nitración de tirosinas, oxidación de metioninas o dimerización, entre otras, que podrían conferirle nuevas funciones biológicas. Con el objetivo de estudiar el impacto funcional de estas modificaciones, se generaron distintas proteoformas. Se obtuvo MetSO-cyt c mediante la oxidación de la metionina 80, residuo responsable de la hexa coordinación del grupo hemo, utilizando cloramina T como agente oxidante. Se generó apo-cyt c mediante la extracción del grupo hemo con sulfato de plata, se produjo de forma recombinante la mutante M80A y se marcó la mutante E66C con una maleimida fluorescente. Estas proteoformas fueron caracterizadas desde el punto de vista bioquímico y estructural. Se estudió su actividad peroxidasa, su composición por espectrometría de masas, su estructura secundaria y temperatura de desnaturalización mediante dicroísmo circular, el entorno del grupo hemo por espectroscopía Raman resonante y su reconocimiento por anticuerpos, en particular R1D3 (que discrimina algunas de estas conformaciones respecto de la proteína nativa). Además, se está investigando su función *in cellula* mediante ensayos de micropinocitosis. Estudios anteriores del grupo han demostrado que la incorporación de MetSO-cyt c por micropinocitosis no induce apoptosis, y a su vez que la proteína migra al núcleo celular. Surge la interrogante de conocer con qué blancos interacciona. Para detectar potenciales interactores de MetSO-cyt c, células HeLa fueron micropinocitadas con esta proteoforma. Luego de 2,5 h, se realizó la inmunoprecipitación sobre el lisado celular utilizando el anticuerpo conformacional R1D3. Las proteínas co-inmunoprecipitadas fueron identificadas por espectrometría de masas. Actualmente, los resultados se encuentran en análisis. También se realizaron análisis proteómicos comparativos de lisados de células HeLa incubadas con MetSO-cyt c y su respectivo control. Si bien no se identificaron proteínas con significancia estadística utilizando los métodos convencionales (luego de cinco horas

de tratamiento), se observaron varias proteínas con cambios de abundancia (y p-valor menor a 0,05) que seguirán siendo exploradas. Se prevé repetir estos experimentos utilizando tiempos de incubación más prolongados. Paralelamente, se están analizando los datos transcriptómicos obtenidos de células micropinocitadas con distintas proteoformas de cyt c. La integración de los resultados proteómicos y transcriptómicos permitirá acercarnos a la comprensión del rol de cyt c y sus proteoformas en el entorno celular.

Póster #18

Producción y caracterización del ectodominio de la proteína de envoltura del virus HTLV-1

Lucía Carrasco ; Melissa De León ; Camila Sagasti ; Yrupé Arhancet, Mariana Salinas ; Agustin Demarco ; Martin Fló ; Natalia Olivero-Deibe ; Sergio Bianchi ; Federico Carrión ; Florencia Rammauro

1 Laboratorio de Inmunovirología / Unidad de Biofísica de Proteínas “Prof. Dr. Otto. Pritsch”, Institut Pasteur de Montevideo. 2 Unidad Académica Inmunobiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República 3 Unidad Académica de Fisiopatología, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República.

El virus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1) es un retrovirus oncogénico, asociado al desarrollo de la leucemia/linfoma de células T del adulto (ATL) y la mielopatía asociada a HTLV-1 (HAM), enfermedades de elevada morbilidad y mortalidad. La infección por HTLV ha sido históricamente desatendida requiriéndose mejoras en su diagnóstico, profilaxis y tratamiento. Se estima que entre 5 y 10 millones de personas viven con HTLV-1 a nivel mundial, con focos endémicos en diversas regiones, incluyendo América del Sur. La glicoproteína de envoltura Env cumple un rol central en la fusión y entrada del virus a la célula. Se expresa como un precursor que es escindido por proteasas de tipo furina dando lugar a las subunidades gp46 (SU) y gp21 (TM). Anticuerpos dirigidos contra Env bloquean la infección, y estudios en modelos animales demostraron que vacunas basadas en esta proteína pueden inducir respuestas humorales capaces de inhibir la transmisión célula-célula, convirtiéndola en un blanco inmunológico de interés. El presente trabajo tiene por objetivo producir de forma recombinante y soluble el ectodominio de Env de HTLV-1 en células S2 de *Drosophila*. Para ello, se diseñó una construcción génica que fue clonada en dos vectores de expresión: pMT-puro-iEcto-Env y pT350-iEcto-Env. Ambas contienen la secuencia codificante del ectodominio de Env de HTLV-1, carente del dominio transmembrana y de la región citoplasmática, con el sitio de clivaje por furinas mutado, precedida por el péptido señal BiP de *Drosophila* y fusionada a un doble Strep-tag en el extremo C-terminal. Para generar líneas de expresión estable por selección con puromicina, el vector pT350 requiere de la co-transfección con el plásmido de selección pCoPUR, mientras que el pMT-puro

incluye el gen de resistencia. Actualmente estamos trabajando en la transfección y selección de células S2 de *Drosophila melanogaster* para la expresión recombinante y estable de iEcto-Env. Las proteínas obtenidas serán purificadas mediante técnicas cromatográficas y su identidad y pureza se confirmarán por espectrometría de masas. Asimismo, serán caracterizadas mediante técnicas bioquímicas, incluyendo SDS-PAGE y Western blot, y biofísicas, como dispersión dinámica de luz, fluorimetría diferencial de barrido, gel filtración analítica y dicroísmo circular, evaluando su tamaño, estabilidad, solubilidad y plegamiento molecular. Finalmente, se evaluará la antigenicidad de iEcto-Env mediante su reconocimiento por un anticuerpo comercial contra gp46, su reactividad frente a sueros humanos positivos para HTLV-1 mediante ELISA y su capacidad de unión a la línea de células T humanas Jurkat mediante citometría de flujo.

Póster #19

Inactivación Oxidativa de la Glutamina Sintetasa Astrocitaria Humana: Mecanismos Bioquímicos y Consecuencias Celulares

Marcela Haberkorn[1,2], Nicolás Campolo[1,2], Silvina Bartesaghi[1], Rafael Radi[1,2]

1. Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. 2. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

La glutamina sintetasa (GS) es la enzima metabólica que cataliza la síntesis ATP-dependiente de glutamina (Gln) a partir de glutamato (Glu) y amonio. En mamíferos es altamente expresada en astrocitos, donde desempeña un rol crucial en la detoxificación del Glu sináptico en exceso, previniendo eventos de excitotoxicidad. En cerebros de pacientes humanos y modelos animales de la enfermedad de Alzheimer (AD), se ha constatado una disminución de la expresión y actividad GS, que presenta correlación con la acumulación de marcadores de oxidación proteica, conduciendo a la postulación de una hipótesis de inactivación oxidativa. Dicha inactivación fue replicada *in vitro*, empleando GS de diferentes organismos, constatándose a su vez que la pérdida de actividad se ve acompañada por la nitración de múltiples residuos de tirosina, con la Tyr336 como diana preferencial. No obstante, estudios realizados por nuestro grupo empleando la GS humana (HsGS) recombinante, y exponiéndola *in vitro* al agente nitro-oxidante endógeno peroxinitrito ($ONOO^-$), permitieron establecer que su inactivación es un proceso complejo y multicausal, que no depende de la nitración de una única Tyr, sino de la modificación de múltiples aminoácidos, con un rol preponderante de la oxidación de cisteínas (Cys) y contribución significativa de la agregación. Por ende, en el trabajo actual se profundizó en el rol desempeñado por la oxidación de Cys y la agregación proteica en la inactivación oxidativa de la HsGS. Se observó, pues, que el tratamiento *in vitro* con

el oxidante específico de tioles diamida provoca la agregación e inactivación de HsGS en forma dosis-dependiente, siendo la misma parcialmente prevenida por el ligando estabilizador Mg-ATP. Además, se trabajó con una mutante sitio-específica, HsGS C53A, para la cual se constató una tendencia marcadamente menor a agregarse e inactivarse al ser expuesta a diamida o $ONOO^-$, lo que señala a la oxidación de la Cys53 como un suceso clave en la inactivación de la GS. Paralelamente, se recurrió a un modelo basado en la línea U87-MG, para el estudio de las consecuencias celulares de la inactivación de esta enzima. En el mismo se evidenció la existencia de un mecanismo de regulación de la expresión enzimática en respuesta a la presencia de Gln en el medio de cultivo. Asimismo, mediante el uso del inhibidor farmacológico metionin-sulfoximida se logró la inactivación específica de la GS celular, observándose que esta compromete significativamente la proliferación y provoca un incremento en la respiración oxidativa celular, replicando los cambios metabólicos experimentados por los astrocitos en AD.

Póster #20

Desarrollo de herramientas genéticas para estudiar el rol de MsrC como sensor metabólico y regulador transcripcional en Escherichia coli

Pilar Casal, Bruno Manta

Institut Pasteur de Montevideo

Las enzimas conocidas como metionina sulfóxido reductasas (Msr) participan en la defensa antioxidante celular mediante la reducción de metionina sulfóxido (MSO) a metionina. MsrC, de distribución mayoritariamente procariota, actúa específicamente sobre MSO libre, aunque su función fisiológica sigue poco esclarecida. Evidencias previas indican que alterar su expresión en *Escherichia coli* (Ec) impacta en el metabolismo redox, vías de aminoácidos y la respiración bacteriana. El objetivo de este trabajo es desarrollar un conjunto de herramientas genéticas y moleculares para estudiar la regulación, localización e interacciones de MsrC en su entorno celular nativo. Para ello, se implementaron tres estrategias complementarias: 1) generación de un panel de cepas silvestres mutantes en vías redox portando biosensores fluorescentes para monitorear GSH/GSSG, H_2O_2, tiorredoxina y MSO, en presencia o no del gen MsrC; 2) el reemplazo del gen MsrC por GFP en el cromosoma del Ec mediante CRISPR-Cas9 asistido por λ-Red (sistema plásmidos pCas/pTargetF) y, 3) la construcción de variantes de MsrC fusionadas a una etiqueta de afinidad de manera de etiquetar la proteína in vivo. En conjunto, estos avances consolidan una plataforma experimental que permitirá entender los mecanismos de adaptación respiratoria y la red de interacciones de MsrC, aportando nuevas perspectivas sobre el metabolismo del MSO en bacterias. En este trabajo se presentara la construcción de las herramientas y los resultados que las mismas nos han permitido obtener en el

entendimiento de la fisiología de la proteína MsrC, mas allá de su rol redox.

Póster #21

Coexistencia de actividades β-mananasa y α-galactosidasa en una fracción enzimática purificada de *Penicillium* sp. VA8

Yamira Quintero[1,2]; Fabián Mancioni[1]; Cesar Iglesias[2,3]; Paula Rodríguez [3,4], Rosario Durán[5], Magdalena Portela [5,6], Carolina Fontana[7] y Cecilia Giacomini[1]

[1]Laboratorio de Bioquímica, DepBio, Facultad de Química, UdelaR, Montevideo, Uruguay. [2]Laboratorio de Microbiología Molecular, DepBio, Facultad de Química, UdelaR, Montevideo, Uruguay. [3]Laboratorio de Biocatálisis y Biotransformación, DepBio-DQO, Facultad de Química, UdelaR, Montevideo, Uruguay. [4]Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, UdelaR, Montevideo, Uruguay. [5]Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas, IIBCE & Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay. [6]Facultad de Ciencias, UdelaR, Montevideo, Uruguay Montevideo, Uruguay. [7]Laboratorio de Química Orgánica, Departamento de Química del Litoral, CENUR Litoral Norte (S.R.A. Facultad de Química), UdelaR, Ruta 3 km 363, Paysandú 60000, Uruguay

La 1,4-β-D-manan manohidrolasa (EC 3.2.1.78), conocida como endo-β-mananasa, cataliza la hidrólisis de enlaces internos al azar β-1,4-manosídicos en β-mananos, generando β-manooligosacáridos (β-MOS) con distintos grados de polimerización y potencial prebiótico. Debido a la relevancia en la valorización de biomasa y subproductos agroindustriales ricos en β-mananos, la identificación de nuevas β-mananasas con propiedades biotecnológicas constituye un área de interés. En este contexto, una fracción enzimática extracelular purificada de Penicillium sp. VA8 fue caracterizada bioquímicamente, evidenciando actividad β-mananasa y producción de β-MOS a partir del galactomanano goma guar (GG). Con el propósito de identificar la proteína responsable de dicha actividad, se realizó la secuenciación del genoma y el análisis proteómico mediante LC-MS/MS. El análisis genómico permitió identificar genes candidatos de β-mananasas pertenecientes a las tres familias de glicosil-hidrolasas descritas para estas enzimas. Sin embargo, el análisis proteómico de la fracción purificada reveló una α-galactosidasa como proteína predominante y una β-mananasa en menor proporción. Este hallazgo condujo a la evaluación de la actividad α galactosidasa y la verificación de la actividad β-mananasa en la fracción enzimática utilizando rafinosa y GG como sustratos, evidenciándose la coexistencia de ambas actividades. A partir de estos resultados, se realizaron ensayos adicionales para profundizar el estudio de la actividad hidrolítica de la fracción purificada. En particular, se evaluó la actividad β-mananasa de la fracción enzimática mediante la hidrólisis de ivory nut mannan y glucomanano de konjac, sustratos sin sustituciones de galactosa, para determinar si dicha actividad era independiente de la actividad α-galactosidasa. La formación de oligosacáridos tras la hidrólisis, observada por cromatografía en capa fina, confirmó la capacidad de la fracción enzimática para hidrolizar enlaces β-1,4- manosídicos en estos sustratos. Por otro lado, para confirmar

la coexistencia de las actividades α-galactosidasa y β-mananasas de la fracción enzimática, se purificaron mediante HPLC las fracciones de monosacáridos y oligosacáridos de bajo peso molecular obtenidas de la hidrólisis de GG. La cuantificación de galactosa libre en las fracciones de monosacáridos, mediante un kit enzimático comercial, confirmó la actividad α-galactosidasa (0,255 g L^{-1}). Actualmente, se trabaja en la caracterización estructural de estos productos mediante resonancia magnética nuclear (RMN). Los resultados obtenidos aportan nuevas evidencias de la coexistencia de las actividades β-mananasa y α-galactosidasa en la fracción enzimática purificada de Penicillium sp. VA8. La expresión recombinante de los genes candidatos permitirá determinar si ambas actividades corresponden a una misma proteína o a proteínas diferentes.

Póster #22

Puesta a punto de modelos murinos de cáncer colorrectal para evaluación del potencial antitumoral de *Salmonella* en combinación con un anticuerpo anti-VEGF

Quintana, Antonella[1]; Chabalgoity, José Alejandro[1]; Moreno, María[1] ; Mónaco, Amy[1]

[1]Unidad Académica de Desarrollo Biotecnológico, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

El cáncer colorrectal constituye una de las principales causas de mortalidad por cáncer a nivel mundial. Si bien los tratamientos convencionales y las terapias dirigidas han mejorado el pronóstico de algunos pacientes, la respuesta continúa siendo heterogénea y la resistencia a los tratamientos representa una limitación importante. En este contexto, la utilización de bacterias como agentes antitumorales ha despertado un creciente interés debido a su capacidad de colonizar selectivamente el tejido tumoral, inducir muerte celular y promover una respuesta inmune proinflamatoria. Nuestro grupo ha demostrado previamente, en ensayos preclínicos, el potencial terapéutico de la cepa atenuada *Salmonella* Typhimurium LVR01 en modelos tumorales de melanoma y linfoma no Hodgkin, entre otros. En este trabajo nos propusimos desarrollar modelos murinos de cáncer colorrectal en los que evaluar el efecto de LVR01, sola o en combinación con terapias de bloqueo de la angiogénesis, ampliamente utilizadas para este tipo de tumores.

Como etapa inicial, se desarrollaron modelos tumorales singénicos heterotópicos utilizando las líneas celulares CT26 y MC38. En los mismos se evaluaron distintos regímenes de administración de LVR01 y de anticuerpos anti-VEGF, tanto humano como murino, monitoreando toxicidad así como su impacto sobre el crecimiento tumoral y la supervivencia. Todos los tratamientos fueron bien tolerados, no evidenciándose pérdida significativa de peso corporal, y tampoco se observaron

signos de toxicidad relevantes. Sin embargo, hasta el momento ninguno de los esquemas evaluados mostró una inhibición consistente del crecimiento tumoral ni un aumento significativo de la sobreviva global respecto a los controles. Estos resultados indican que aún no contamos con condiciones ideales en las que podamos evaluar el beneficio agregado del bloqueo de VEGF al tratamiento tumoral con *Salmonella*. En conjunto, estos hallazgos orientan la siguiente etapa del proyecto hacia la caracterización de los mecanismos asociados a la angiogénesis y a la respuesta al tratamiento en cáncer colorrectal. Actualmente estamos desarrollando estudios *in vitro* utilizando las líneas celulares antes mencionadas, para evaluar la expresión de genes y proteínas relacionadas con la angiogénesis mediante qPCR y ELISA. Estos estudios permitirán determinar si los tratamientos inducen modificaciones biológicas que no se reflejan inicialmente en el crecimiento tumoral y aportarán información que contribuya a dilucidar los mecanismos involucrados en la respuesta al tratamiento, permitiendo optimizar la combinación de inmunoterapia bacteriana y bloqueo de la angiogénesis.

Póster #23

Selección de candidatos vacunales de *Haematobia irritans* y producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli* para el desarrollo de vacunas

Rocca Camilo[3], Elerd, Erika[1]; Rocha, Sergio[1,3]; Breijo, Martín[1] Pastro, Lucía[2].

[1]Unidad de Reactivos y Biomodelos de Experimentación, Facultad de Medicina, UdelaR.[2] Unidad Académica de Genética, Facultad de Medicina UdelaR. [3] Centro de Producción de Animales de Experimentación, Udelar.

Haematobia irritans (mosca de los cuernos) es un ectoparásito hematófago de distribución mundial que afecta principalmente al ganado bovino, ocasionando importantes pérdidas económicas debido a la disminución de la productividad. En Uruguay fue detectada por primera vez en 1991 y actualmente se encuentra distribuida en todo el territorio nacional. Su control depende principalmente del uso de insecticidas químicos, cuyo empleo intensivo favorece el desarrollo de resistencia y genera un impacto ambiental significativo. En este contexto, el desarrollo de vacunas constituye una alternativa sustentable para el control de este parásito. Con el objetivo de identificar nuevos candidatos vacunales y producir proteínas recombinantes para su evaluación biológica, se realizó un proceso de selección basado en herramientas de vacunología reversa. Como punto de partida se utilizó la biblioteca de transcriptomas de glándula salival (427 secuencias) e intestino medio (1479 secuencias) publicada previamente por nuestro grupo de investigación. La selección primaria consideró el nivel de expresión génica (número de lecturas), la ausencia de sitios de glicosilación, la clasificación funcional de las proteínas y su desvinculación de mecanismos asociados al control antimicrobiano del insecto. Esta etapa permitió

seleccionar 99 secuencias (61 provenientes de glándula salival y 38 de intestino medio). Posteriormente, las secuencias fueron analizadas *in silico* para estimar su potencial inmunogénico. Se establecieron como criterios de selección un puntaje superior a 0,7 en AntigenPro y VaxiJen 2.0, ausencia de toxicidad predicha mediante ToxinPred 2.0 y un valor superior a 2 en la predicción de epítopos B utilizando BCEPred. Como resultado se identificaron 14 proteínas candidatas, de las cuales 11 correspondieron a glándula salival y 3 a intestino medio. Las proteínas Trombostasina, Hematobina, Antígeno 5 y miembros de una familia de endopeptidasas intestinales fueron expresadas en *Escherichia coli*, abarcando las etapas de construcción de plásmidos, expresión heteróloga y purificación de proteínas recombinantes. Este trabajo preliminar permitió establecer una estrategia racional para la selección de antígenos vacunales y la obtención de proteínas recombinantes de *H. irritans*. Estas moléculas constituyen la base para el desarrollo y evaluación de nuevas vacunas experimentales destinadas al control sostenible de este ectoparásito en bovinos.

Póster #24

Optimización estructural de las glicoproteínas E1 y E2 en prefusión como candidatos para una vacuna de ARNm contra el virus Mayaro.

Celeste Cordero[1,2], Mariano Dellarole[4], Pilar Moreno[1,2,3], Gonzalo Moratorio[1,2,3], Alicia Costábile[1,2,3,5]

1: Laboratorio de Virología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. 2: Laboratorio de Evolución Experimental de Virus, Institut Pasteur de Montevideo. 3: Centro de Innovación en Vigilancia Epidemiológica, Institut Pasteur de Montevideo. 4: Centro de Investigaciones en Bionanociencias, CONICET. 5: Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República

El virus Mayaro (MAYV) es un alfavirus emergente causante de la fiebre de Mayaro, una enfermedad tropical desatendida sin tratamientos ni vacunas aprobadas. La creciente deforestación y urbanización han intensificado el riesgo de transmisión por vectores como *Aedes aegypti*, exponiendo a poblaciones sin inmunidad previa. Frente a estos escenarios, las vacunas a base de ARNm han demostrado ser una plataforma tecnológica sumamente versátil, segura y de rápida escala para el desarrollo de contramedidas eficaces. El diseño de un antígeno adecuado es clave para el éxito de esta estrategia: en el caso de MAYV, la entrada viral a la célula depende de las glicoproteínas E1 y E2, cuyo estado de prefusión expone los epítopes reconocidos por anticuerpos neutralizantes, conformación que se pierde tras la fusión de membranas. En este contexto, este trabajo tiene como objetivo generar mutantes estructurales de E1 y E2 de MAYV estabilizadas en su estado de prefusión para su evaluación como antígeno en vacunas de ARNm . Para ello, a partir de análisis *in*

silico previos, se diseñaron cuatro doble mutantes y dos tetramutantes para incorporar residuos de cisteína estratégicos en posiciones flexibles que promuevan la formación de puentes disulfuro. Utilizando plásmidos con las secuencias salvajes, distintas regiones UTR optimizadas (H12 y H9), promotor T7 y cola poli(A), se introdujeron las mutaciones mediante PCR de mutagénesis dirigida seguida de transformación bacteriana, selección de colonias y validación por secuenciación (Oxford Nanopore). Hasta el momento, se logró la construcción de las variantes mutantes dobles y combinadas, incluyendo las construcciones H12 (M1, M2, M3 y M4), H9 (M1, M3 y M4) y sus respectivos tetramutantes. A partir de las primeras variantes obtenidas, se inició la producción de ARNm mediante ensayos de transcripción *in vitro* (IVT) incorporando Clean-CAP y metil-pseudouridina para mejorar su estabilidad y traducibilidad. Los siguientes pasos del proyecto contemplan el avance en la producción del resto de las variantes generadas y en la evaluación de su expresión en células HeLa mediante Western blot, en condiciones reductoras y no reductoras, lo que permitirá determinar la formación de los puentes disulfuro introducidos e identificar los candidatos antigénicos más estables para continuar con su caracterización.

Póster #25

Optimización de técnicas moleculares para la construcción de una biblioteca de nanobodies (VHH) de alta diversidad, como alternativa reutilizable sin inmunización animal.

Kevin Karlen, Paula Segovia, Gabriel Lassabe

Unidad Académica de Inmunología, DEPBIO, Facultad de Química UdelaR

Los anticuerpos de dominio único (VHH o nanobodies) representan herramientas clave en biotecnología y terapia gracias a su alta estabilidad, versatilidad y reducido tamaño. Generalmente se obtienen mediante la tecnología phage display a partir de bibliotecas inmunes generadas mediante inmunización de camélidos con el antígeno de interés. Como alternativa surgen las bibliotecas libres de inmunización (naïve), capaces de proveer nanobodies contra cualquier antígeno sin inmunización animal. Sin embargo, su potencial depende críticamente de alcanzar una alta diversidad de clones (>10^9 clones), lo que exige una rigurosa optimización de las técnicas de biología molecular empleadas en su construcción. Con este objetivo, se evaluaron diversas estrategias a partir de ARN total extraído de PBMC de llamas no inmunizadas. Se comparó la síntesis de ADNc con cebadores Oligo-dT frente a cebadores específicos de la región bisagra (Hinge). La amplificación de los dominios VHH se realizó contrastando Taq polimerasa convencional frente a una polimerasa de alta fidelidad. Para el ensamblado en el vector fagémido se implementó Golden Gate Assembly, frente al clonado tradicional por enzimas de restricción. En paralelo,

se estandarizó la preparación in house de células electrocompetentes de E. coli ER2738 con alta eficiencia de transformación. La polimerasa de alta fidelidad disminuyó sustancialmente los clones con desplazamiento del marco de lectura, mientras que Golden Gate Assembly simplificó el flujo de trabajo al evitar purificaciones intermedias, mejorando la integridad de los insertos. La comparación de cebadores no evidenció diferencias en la recuperación de dominios VH solubles. Finalmente, las células electrocompetentes in-house alcanzaron eficiencias reproducibles de entre 10^9 y 10^{10} transformantes/µg de ADN plasmídico control (pUC19).

Estas implementaciones permitirán la construcción de una biblioteca naïve, una plataforma reutilizable para la selección de nanobodies contra múltiples antígenos de interés mediante phage display, sin requerir inmunización previa para cada nuevo blanco. Esto no solo reduce significativamente los tiempos de desarrollo respecto a las estrategias inmunes convencionales, sino que también disminuye el uso de animales de experimentación, alineándose con los principios de reemplazo, reducción y refinamiento (3Rs) en investigación biomédica.

Póster #26

Desarrollo de una vacuna oral contra virus Chikungunya

Gutiérrez, ME; Mónaco, A; Chilibroste, S; Chabalgoity, JA; Yim, L; Moreno, M.

Unidad Académica de Desarrollo Biotecnológico / Instituto de Higiene / UDELAR

El virus Chikungunya (CHIKV) es un virus emergente transmitido por mosquitos, principalmente Aedes aegypti y Aedes albopictus, que también transmiten los virus del dengue y Zika. El CHIKV causa una enfermedad caracterizada por artralgia/artritis debilitante, mialgia, fiebre, cefalea, náuseas, vómitos y erupción cutánea. Desde su notificación en América en 2013, el CHIKV se ha propagado a más de 45 países. Recientemente, fue incorporado a la lista de patógenos bioseguridad nivel 3 y declarado patógeno prioritario de categoría C por el NIAID de Estados Unidos. En el presente trabajo se propone diseñar, construir y evaluar una vacuna contra Chikungunya utilizando como vector Salmonella Typhimurium LVR01, aislada de perro y atenuada por interrupción del gen aroC. Durante la infección del hospedero, tanto los antígenos propios de Salmonella como los antígenos heterólogos expresados son internalizados, procesados y presentados al sistema inmune, habilitando una amplia gama de respuestas inmunológicas. Para el diseño antigénico se identificaron secuencias de la proteína de envoltura E2 previamente asociadas con la inducción de anticuerpos neutralizantes y protección. El antígeno diseñado incluye el dominio B de E2, involucrado en la unión del virus a la superficie celular, y la secuencia lineal sA, correspondiente al dominio A. Para aumentar su

inmunogenicidad, el antígeno se fusionó al fragmento C de la toxina tetánica (TetC). Mediante análisis in silico se seleccionó la construcción que codifica la proteína de fusión TetC-sAB+. Posteriormente, se construyeron y evaluaron las cepas recombinantes y se confirmó la expresión del antígeno mediante Western blot. Actualmente se están desarrollando los estudios de bioseguridad e inmunogenicidad, cuyos resultados permitirán evaluar el potencial de esta estrategia como candidata vacunal frente al CHIKV. Para esto se implementó una estrategia de vacunación heteróloga. La dosis inicial consistió en S. LVR01, vía oral, que expresa la proteína de fusión TetC-sAB+. La dosis de refuerzo consistirá en un booster subcutáneo con 100 µg de la proteína recombinante sAB+, con o sin adyuvante, producida y purificada en Escherichia coli BL21(DE3). Para ello, se utilizará un plásmido pET15b recombinante que expresa sAB+. La administración oral de antígenos heterólogos mediante Salmonella ha sido ampliamente documentada. En este trabajo, mediante un esquema de vacunación heteróloga, esperamos demostrar también su capacidad para inducir respuestas inmunes humorales sistémicas y celulares protectoras contra CHIKV, consolidando a S. LVR01 para el diseño racional de nuevas vacunas recombinantes, capaces de inducir respuestas inmunes robustas mediante la activación coordinada de la inmunidad innata y adaptativa.

Póster #27

Resolviendo la estructura del nanoadyuvante de vacunas IMXQB mediante tecnología MANTA y modelado con gemelos digitales 3D

Berasain, P.[1], Morais, V.[2], García, F.[2], Deutsch, N.[2], Silveira, F.[2]

[1]*Laboratorio de Biología Parasitaria, Facultad de Ciencias - Instituto de Higiene, Universidad de la República.* [2]Unidad Académica *de Desarrollo Biotecnológico, Facultad de Medicina - Instituto de Higiene, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.*

Las matrices ISCOM basadas en saponinas nativas de *Quillaja brasiliensis* (IMXQB) representan una plataforma biotecnológica de gran interes para optimizar la eficacia de las vacunas. Las distribuciones de tamaño hidrodinámico de las IMXQB libres y sus perfiles estructurales tras la interacción con albúmina de suero bovino (BSA), se caracterizaron mediante análisis multiespectral de seguimiento de nanopartículas (MANTA, ViewSizer 3000) utilizando tres láseres simultáneos. A diferencia del modelo monodisperso idealizado propuesto en la literatura clásica, las mediciones *partícula por partícula* obtenidas con tecnología MANTA revelaron que la matriz IMXQB en estado nativo exhibe un comportamiento coloidal polidisperso de tipo jerárquico. Si bien las jaulas individuales (monómeros) se registran en el límite inferior de la muestra (D10: 51.98 nm), la moda principal se ubica en los 67 nm, representando el rango de los ensamblajes diméricos nativos. El recuento absoluto de partículas permitió identificar subpoblaciones discretas en rangos de tamaño superior, extendiéndose

hasta un D90 de 205.60 nm. A partir de estos datos empíricos, junto con modelos de difracción y leyes de escala, se desarrolló un entorno de inferencia geométrica y un gemelo digital tridimensional en Blender 5.2.1 para validar la configuración espacial de las partículas. El modelado tridimensional toma como base el modelo geométrico canónico de la jaula individual semejante a una pelota de fútbol (Pedersen, 2012) para correlacionar las señales experimentales con fenómenos de autoensamblaje secundario abierto. Estructuras como la tríada (promedio: 114 nm) y el súper-clúster integrado por la fusión de dos tríadas (~205 nm) demuestran que las matrices no constituyen agregados amorfos desordenados, sino redes porosas extendidas. El software MANTA logra resolver estas superestructuras debido a su menor coeficiente de difusión traslacional (Dt), consecuencia de la alta resistencia friccional que impone su geometría abierta, lo que permite evadir el enmascaramiento matemático que sufre la dispersión de la luz (DLS) convencional frente a muestras polidispersas. Por el contrario, la interacción con BSA indujo una macroagregación masiva e inespecífica. En conjunto, este marco metodológico proporciona una herramienta robusta para el control de calidad, el monitoreo estructural y el diseño biofísico de nanoadyuvantes particulados.

Póster #28

Fenotipo de macrófagos estimulados con *Salmonella* Typhimurium y papel de las trampas de ADN extracelular en la actividad antitumoral de la bacteria

Yamila Martínez[1], María Moreno[1] & Amy Mónaco[1]

[1]Unidad Académica Desarrollo Biotecnológico, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, UdelaR

Salmonella Typhimurium LVR01 (*aroC*$^{-}$) es una cepa atenuada con actividad antitumoral demostrada en modelos experimentales murinos de melanoma. Previamente nuestro grupo demostró que LVR01 activa el inflamasoma y promueve la liberación de trampas extracelulares de macrófagos. En este trabajo estudiamos la contribución de la viabilidad bacteriana y del flagelo a la activación de los macrófagos y evaluamos el papel del ADN extracelular en la actividad antitumoral de la bacteria en un modelo murino de melanoma. La estimulación con LVR01 indujo un aumento en la producción de óxido nítrico en macrófagos tanto de la línea murina J774A.1 como en la monocítica humana THP-1. En las células J774A.1, la estimulación con las variantes aflagelada e inactivada produjo niveles menores de óxido nítrico, respecto a la cepa parental. Por su parte, en las THP-1, la producción de este compuesto fue nula en respuesta a la cepa inactivada y marcadamente baja frente a la aflagelada. Adicionalmente, el número de unidades formadoras de colonias intracelulares fue significativamente menor en ambas líneas celulares tras la

estimulación con la cepa aflagelada. Estos hallazgos sugieren que la producción de óxido nítrico en las células J774A.1 depende tanto de mecanismos asociados a la internalización bacteriana como de mecanismos independientes de ella, mientras que en las THP-1 la internalización sería el principal determinante de la respuesta. En el modelo murino de melanoma, el tratamiento diario con DNAsa I durante una semana luego de la inmunoterapia con LVR01 no produjo diferencias estadísticamente significativas en el volumen tumoral ni en la sobrevida de los animales. Sin embargo, se observó una tendencia a la disminución del efecto antitumoral tras la degradación del ADN extracelular, lo que sugiere que el mismo podría contribuir parcialmente a la eficacia terapéutica de LVR01. En conjunto, nuestros resultados indican que la viabilidad bacteriana y la presencia del flagelo son determinantes para la activación proinflamatoria de los macrófagos y sugieren que el ADN extracelular podría contribuir, al menos parcialmente, al efecto antitumoral de *Salmonella* Typhimurium LVR01.

Póster #29

Producción de una proteasa aspártica homóloga a la cardosina en *Physcomitrium patens*

Baroffio, Agustín[1]; Vivas Panario, Andrés[1]; Villadóniga, Carolina[2]; Pérez, Leticia[3]; Ruibal, Cecilia[1]

[1] Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. [2] Laboratorio Biocatalizadores y sus aplicaciones, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. [3] Sección Genómica Funcional, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República

En diversos países de la región del mediterráneo, los quesos tradicionales de oveja y cabra son elaborados utilizando extractos de flores de cardo (Cynara cardunculus L) como coagulante de la leche. Esta actividad coagulante se debe a que los extractos son ricos en proteasas aspárticas denominadas cardosinas y ciprosinas, que hidrolizan específicamente la K-caseína, produciendo la coagulación de la leche. Aunque estos productos suelen constituir un nicho de mercado, representan una fuente importante de ingresos para las comunidades locales y contribuyen a la conservación y puesta en valor de las razas animales específicas empleadas en su elaboración. A pesar de su amplio uso como coagulantes de la leche, los extractos de flores de cardo presentan una considerable variabilidad en su composición enzimática y actividad coagulante. Esta variabilidad se debe, en parte, a que las flores utilizadas provienen mayoritariamente de poblaciones silvestres y no de materiales vegetales obtenidos mediante programas de selección y mejoramiento. Estas limitaciones han impulsado la búsqueda de sistemas alternativos para la producción de proteasas aspárticas de origen vegetal con propiedades más homogéneas y reproducibles. En

este contexto, Physcomitrium patens constituye una plataforma biotecnológica de particular interés. El musgo P. patens se ha convertido en una especie modelo en investigación básica y biotecnología, con un genoma secuenciado y posibilidades excepcionales para una ingeniería genómica, mediante el cual se pueden generar mutantes o sobreexpresantes por recombinación homóloga. Este sistema ofrece una producción certificada GMP en biorreactores con un escalado exitoso a 500 L, excelente homogeneidad en la glicosilación de proteínas, estabilidad entre lotes y criopreservación segura. Además, las plantas carecen de patógenos humanos, endotoxinas y secuencias de ADN oncogénicas y, por lo tanto, son más seguras que los hospederos microbianos o animales para producir proteínas para la industria alimentaria. En este trabajo se generaron plantas de P. patens que sobreexpresan una proteasa aspártica endógena, homóloga a la cardosina de la flor del cardo. Los extractos proteicos de estas plantas se analizaron en cuanto a la capacidad de coagular la leche, generando prometedores avances en la tecnología de procesamiento de alimentos.

Póster #30

Receptores nucleares Eg2DBDα y Eg2DBDβ de *Echinococcus granulosus*: expresión, purificación y aproximación al estudio de ligandos

Rojo, Ana[1]; Galaretto, Sofía[1]; Martínez, Mariana[1]; Vallés, Diego[2]; Alvite, Gabriela[1].

[1] Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. [2] Laboratorio de Biocatalizadores y sus aplicaciones, IQB, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

La larva del platelminto parásito Echinococcus granulosus sensu lato causa la Echinococcosis quística, una zoonosis mundial que constituye un problema de salud pública y económico. A pesar del considerable impacto socio-económico, sigue siendo una enfermedad desatendida que carece de estrategias terapéuticas efectivas. En este contexto, es fundamental caracterizar nuevos blancos específicos del parásito y vitales para su supervivencia como podrían ser los Eg2DBDs. Estos receptores nucleares (NRs) pertenecen a la subfamilia 2DBD, cuyos miembros contienen dos dominios de unión al ADN y se han encontrado solamente en algunos invertebrados. Nuestro grupo de investigación ha identificado a Eg2DBDα, Eg2DBDβ, Eg2DBDɣ y Eg2DBDα.1 (isoforma de Eg2DBDα) en la forma larvaria del parásito; centrándonos en el estudio de este último. Hemos demostrado que Eg2DBDα y Eg2DBDβ son los Eg2DBDs de mayor expresión en este estadio. Dado que los 2DBD-NRs no están presentes en los hospederos y los NRs de helmintos parásitos son considerados blancos putativos de nuevas drogas antihelmínticas, nos planteamos contribuir al conocimiento de los mecanismos de acción de los receptores nucleares 2DBDs de E. granulosus. En este trabajo nos proponemos generar las proteínas Eg2DBDα y Eg2DBDβ recombinantes para determinar sus posibles ligandos. Nos centramos en

los dominios de unión a ligandos (LBD, E) y C-terminal (F) ya que se dispone de más datos estructurales y funcionales de éstos. Para ambas proteínas, hemos puesto a punto los métodos de expresión en E. coli a partir de dos construcciones plasmídicas (pT7 y pT7-MBP), y de purificación a partir de la fracción soluble utilizando técnicas cromatográficas. En base a esto, se seleccionó el vector pT7 para la expresión de las proteínas. La purificación de Eg2DBDα-EF se llevó a cabo mediante cromatografías de afinidad IMAC y de exclusión molecular, mientras que la de Eg2DBDβ-EF involucró una sola cromatografía IMAC, obteniéndose buenos rendimientos para los dos casos. Se verificó la identidad de ambas proteínas recombinantes mediante espectrometría de masa LC-MS/MS. Por último, la capacidad de unión de ligandos de estos NRs fue evaluada mediante ensayos de electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturalizante (PAGE nativo) con el análogo de ácido graso fluorescente BODIPY FL-C_{16}. Así, hemos demostrado que tanto Eg2DBDα como Eg2DBDβ son capaces de unir este ácido graso fluorescente de 16 C. A partir de este trabajo hemos generado herramientas valiosas para futuros estudios estructurales y funcionales, como ensayos de competición con ácidos grasos no marcados para identificar los mejores ligandos.

Póster #31

Estrategias biocatalíticas para la producción sostenible de alcaloides derivados de indoletilamina

Belén Gloria[1], Silvina Luongo[2], Gabriela Irazoqui[1], Diego Umpierrez[1,2], Agustina Vila[2]

[1]Área Bioquímica, Departamento de Biociencias, Facultad de Química, Udelar. [2]Laboratorio de Biocatálisis y Biotransformaciones, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Udelar

En los últimos años, el estudio de alcaloides psicodélicos derivados de la indoletilamina cobró gran relevancia por tener potencial aplicación en el tratamiento de diversas enfermedades mentales, como ansiedad y depresión, entre otras. Existe interés en sintetizar este tipo de compuestos por métodos más eficientes, que permitan obtener mayores cantidades de producto para posibilitar su evaluación biológica y potencial uso terapéutico. Si bien la biosíntesis de estos productos no ha sido totalmente dilucidada, se conoce que la metilación de la indoletilamina es un paso central, por lo que surge desde la biocatálisis la aplicación de N-Metiltransferasas (NMT). Estas enzimas catalizan reacciones de adición de grupos Metilo sobre átomos de Nitrógeno. En un reporte reciente se describió una N-Metiltransferasa del sapo de caña (*Rhinella marina*)[1], denominada RmNMT, que presenta mayor eficacia en la síntesis de alcaloides respecto a otras N-Metiltransferasas similares y además presenta menor inhibición por sustrato. En este trabajo, se planteó el desarrollo de un biocatalizador eficiente para la producción

de Dimetiltriptamina, a partir de Triptamina, utilizando RmNMT. Para ello se optimizaron las condiciones de expresión heteróloga de la enzima en *E.coli BL21 (DE3)* Δ*mnt* y de purificación mediante cromatografía de afinidad (IMAC). Pósteriormente se realizó un screening de actividad con Triptamina y una caracterización detallada de sus propiedades bioquímicas (pH y temperatura óptimos, estabilidad con pH y temperatura) y parámetros cinéticos (Km, kcat). En las condiciones estudiadas, la enzima presentó un pH óptimo de 9,5 y una temperatura óptima de 45 °C. Además, retuvo más del 80% de su actividad residual durante 24 h a 37 °C y pH 7,5. La Km para triptamina es 3,1 μM y la kcat 41 min^{-1} determinados a pH 7,5 y 45 ºC. La enzima fue inmovilizada en agarosa activada con CDAP (tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio) mediante un enlace covalente estable tipo isourea. Se obtuvo un 100% de rendimiento de inmovilización en proteínas y el derivado expresó un 50% de la actividad de la enzima soluble. En este trabajo se presentan los resultados de la obtención de la enzima RmNMT purificada y su caracterización bioquímica y cinética, tanto en su forma soluble como en el derivado inmovilizado CDAP.

Póster #33

Remodelado del ribosoma bacteriano a bajas temperaturas en una *Pseudomonas* antártica

Cecilia Letona**,** Patricia Opiolo, Hanna Zehnle, César X. García-Laviña y Susana Castro-Sowinski

Sección Bioquímica, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Udelar

Pseudomonas sp. AU10, una bacteria psicrotolerante aislada a partir de una muestra de agua dulce en la Antártida, constituye un modelo de estudio en nuestro laboratorio para dilucidar los mecanismos de adaptación microbiana a bajas temperaturas. Mediante proteómica diferencial cuantitativa por LC-MS/MS en células cultivadas a 30 °C y 4 °C, así como tras un choque térmico (30 °C a 4 °C durante 75 min), determinamos que AU10 remodela su maquinaria ribosomal para operar eficientemente en frío. Esta adaptación involucra la modulación de su perfil proteico, incluyendo proteínas estructurales, GTPasas y ATPasas, lo que permite preservar la actividad traduccional y prevenir el eventual estancamiento a 4 °C en comparación con 30 °C. Asimismo, observamos la sobreexpresión a nivel proteico de diversas proteínas ribosómicas estructurales, rRNA metiltransferasas, ARN helicasas de la familia DEAD-box y una proteína reguladora del silenciamiento ribosomal. Dado que estas proteínas no incrementaron su abundancia durante el choque térmico, proponemos que actúan como proteínas de aclimatación al frío (CAPs, cold acclimation proteins) y no como proteínas de respuesta inmediata o inducibles por frío

(CIPs, cold-inducible proteins). Entre los hallazgos destaca TypA/BipA, una GTPasa involucrada en el ensamblaje de la subunidad ribosomal 50S. Esta proteína presentó un incremento de 4.4 veces en su abundancia relativa por LC-MS/MS y su gen mostró una sobreexpresión de 3.5 veces a baja temperatura, determinada mediante RT qPCR. Utilizando mutagénesis al azar con el transposón mini-Tn5, aislamos un mutante nulo en el gen *typA/bipA* incapaz de desarrollarse a 4 °C en medio LB-agar, lo que evidencia el carácter esencial de TypA/BipA para la viabilidad en frío. Las curvas de crecimiento mostraron que, si bien el mutante presenta un fenotipo silvestre a 30 °C, exhibe un marcado retraso en la fase exponencial ya a 15 °C. Por otra parte, el análisis filogenético e iterativo de la historia evolutiva de TypA/BipA en microorganismos adaptados a diversos rangos térmicos sugiere que este gen se ha heredado mediante transferencia vertical, sin evidencias de una diversificación adaptativa impulsada por la temperatura óptima de crecimiento. Finalmente, se discute el rol funcional de diversas proteínas asociadas al ribosoma (RAPs) en la remodelación del aparato traduccional bajo estrés por frío.

Póster #34

Biotinilación e inmovilización de PNGasa F recombinante para análisis glicómico.

Fabián Mancioni[1], Agustín Castilla[1], Cecilia Giacomini[1], Cecilia Porciúncula González[1]

[1] Área de Bioquímica, Departamento de Biociencias, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Las glicoproteínas median numerosos procesos fisiológicos, por lo que patrones alterados en su glicosilación están asociados a diversas patologías. El rol de los glicanos en estos procesos ha llevado a la expresión recombinante de glicoproteínas y su uso como biofármacos, donde el control del perfil de glicosilación es esencial para asegurar su seguridad y eficacia. Por otra parte, la elucidación estructural de los glicanos es fundamental para entender su rol en procesos fisiológicos y patológicos facilitando el diseño de métodos de diagnóstico y tratamientos terapéuticos. Una estrategia frecuente para el estudio de los *N*-glicanos de las glicoproteínas es su remoción enzimática catalizada por la enzima péptido-*N*-glicosidasa F (PNGasa F) para su Pósterior análisis. El uso de la enzima inmovilizada presenta ventajas, tales como su re-uso, aumento de su estabilidad, la obtención de productos libres de enzimas y control fino del avance de reacción. La inmovilización mediante el sistema de afinidad biotina/avidina presenta la interacción más fuerte dentro de las interacciones biológicas no covalentes, la constante de disociación entre estas dos moléculas es del orden de 10^{-14}-10^{-16} M. Esto le confiere las ventajas de las estrategias no covalentes, evitar distorsiones conformacionales derivadas de la química de inmovilización y la fuerza de unión de las interacciones covalentes. Por

otro lado, la inmovilización sobre nanosoportes ofrece ventajas como una mayor capacidad debido a su elevada área superficial y una reducción de las limitaciones difusionales. Este último aspecto es clave cuando se utilizan sustratos macromoleculares como las glicoproteínas, su tamaño reducido sugiere un comportamiento similar al de la enzima soluble. En este trabajo se llevó a cabo clonado, expresión, producción y purificación de la PNGasa F de *Elizabethkingia miricola*, en E.coli BL21DE3. La actividad enzimática se evaluó utilizando como sustrato la glicoproteina RNAsa B. El ensayo se realizó a 37 °C y pH 7.5 a tiempos previamente determinados. El perfil de deglicosilación fue evaluado por electroforesis desnaturalizante. La proteína purificada se funcionalizó con biotina a través de dos agentes biotiniliantes que difieren entre sí en longitud, flexibilidad e hidrofilicidad del brazo espaciador, NHS-LC-LC-Biotina y NHS-PEG4-Biotina. Se evaluó el efecto de la biotinilación en la actividad de la enzima, observando que la misma mantiene entre un 65 y un 70 % de actividad remanente dependiendo del brazo espaciador seleccionado. Actualmente se está evaluando su inmovilización sobre nanopartículas magnéticas funcionalizadas con avidina y la influencia de la naturaleza del brazo espaciador en los rendimientos de inmovilización.

Póster #35

Producción recombinante e inmovilización en nanohíbridos de sílica biomimética y nanopartículas magnéticas (nHs) de una variante mutante de peroxidasa de rábano picante (HRP) expresada en *E. coli*

Felipe Espinosa[a], Mathias Costa[a,b], Valeria Grazú[c,d], Lorena Betancor[a], Erienne Jackson[a], Magdalena Ripoll[a]

[a]Laboratorio de Biotecnología, Universidad ORT Uruguay, Montevideo. [b]Posgrado en Química, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. [c]Instituto de Nanociencia y Materiales De Aragón (INMA), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España. [d]Centro de Investigación Biomédica en Red de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Instituto De Salud Carlos III, Madrid, España.

La peroxidasa de rábano picante (HRP) puede ser incorporada en nanohíbridos de sílica biomimética y nanopartículas magnéticas (nHs), activables mediante campos magnéticos alternos (AMF), como estrategia de terapia enzimática con profármaco dirigida (DEPT) (1). Sin embargo, el empleo de HRP comercial de origen vegetal presenta limitaciones debido a la presencia de múltiples isoenzimas con diferentes secuencias y patrones de glicosilación, pudiendo afectar su inmovilización y comprometer la reproducibilidad de los nHs (2,3). La producción recombinante en *E. coli* constituye una alternativa para obtener preparaciones enzimáticas más homogéneas. En este trabajo se diseñó un plásmido de expresión basado en una variante mutante de la isoforma HRP C1A (HRP VII), previamente reportada por

Humer et al. (3), para su producción en *E. coli* BL21(DE3). La expresión condujo a la formación de cuerpos de inclusión (4), por lo que se desarrolló un protocolo de solubilización, replegamiento y purificación permitiendo recuperar enzima catalíticamente activa. La HRP recombinante presentó un K_M para H_2O_2 de 0,05 mM y una actividad óptima en el entorno de 70°C y pH 5. La enzima conservó el 84% de su actividad tras 1 h a 60 °C, pero solo el 4% a 70 °C. Además, fue estable entre pH 4 y 5 (87%) perdiendo estabilidad en condiciones alcalinas (pH ≥ 9). La HRP recombinante se inmovilizó en nHs (0,15 UI/g) que fueron evaluados mediante ensayos de citotoxicidad en células MIA PaCa-2 de adenocarcinoma pancreático humano, en presencia (10 mM) y ausencia del profármaco ácido indol-3-acético (3-IAA), sin aplicación de AMF. Los nHs mostraron baja citotoxicidad en ausencia del profármaco (93 ± 6,5% de viabilidad), mientras que en presencia de 3-IAA la viabilidad (70 ± 3,2%) fue comparable a la del profármaco libre (73 ± 3,1%), indicando que los nHs no incrementan la citotoxicidad sin activación magnética. Futuros ensayos evaluarán la citotoxicidad del sistema bajo activación por AMF. En conjunto, estos resultados demuestran la factibilidad de producir HRP recombinante activa en *E. coli* e inmovilizarla en nHs, proporcionando una alternativa más reproducible a la HRP de origen vegetal para su potencial aplicación en estrategias DEPT activadas por AMF.

Póster #36

Lacasa adsorbida sobre SBA-15 funcionalizado: evaluación de su potencial para la degradación de etinilestradiol

Florencia Camps[1]; Josefina Díaz[1]; María Belén Islas[1]; Elisa Leoncini[1]; Fabrizio E. Viale[2]; Francisco E. da Silva[3]; Francisco G. Hayala Silveira Pinto[3]; Mariele I. S. de Mello[3]; Sibele B. C. Pergher[3], Gabriel O. Ferrero[2], Larissa Gioia[1], Karen Ovsejevi[1]

[1]Area Bioquímica, DepBio, Facultad de Química, UdelaR, Montevideo, Uruguay. [2]Centro de Investigación y Tecnología Química, Facultad Regional de Córdoba, Universidad Tecnológica Nacional, CONICET, Córdoba, Argentina. [3]LABPEMOL-Laboratorio de Peneiras Moleculares, Instituto de Química, Universidad Federal de Rio Grande del Norte, Brasil. fcamps@fcien.edu.uy

Los estrógenos son contaminantes emergentes presentes en efluentes urbanos e industriales que ingresan a través de estos al medio ambiente. Debido a su actividad como disruptores endocrinos, incluso a bajas concentraciones pueden representar un riesgo para los ecosistemas y la salud humana [1]. El 17alfa-etinilestradiol (EE2) es un estrógeno sintético ampliamente usado en anticonceptivos y terapias de reemplazo hormonal, considerado uno de los más persistentes en el ambiente [2]. Las enzimas son catalizadores eficientes y amigables con el medio ambiente, extensamente utilizadas en procesos biotecnológicos. Entre las enzimas con mayor campo de aplicación se destacan las lacasas, dado que su baja especificidad les permite actuar

sobre un amplio rango de sustratos. Sin embargo, su aplicación a nivel industrial podría verse limitada por su inestabilidad en solución y la imposibilidad de ser reutilizadas. La inmovilización es la estrategia más empleada para superar estas desventajas [3].

Por otra parte, los materiales mesoporosos en base a silicio como el SBA-15 (Santa Barbara Amorphous-15) poseen características que los convierten en muy promisorios soportes para la inmovilización de biocatalizadores. Presentan resistencia mecánica y un sistema de poros del orden de 2 a 10 nm que hace posible discriminar moléculas de acuerdo a su tamaño, permitiendo la difusión de los sustratos y los productos [4]. Además, su superficie puede funcionalizarse con distintos grupos químicos o especies metálicas para modificar sus propiedades superficiales y favorecer la interacción con biomoléculas [5]. La enzima lacasa utiliza como cofactor Cu, por lo tanto, la modificación de la superficie del SBA-15 con óxidos de Cu podría favorecer la actividad de la metaloenzima. La incorporación de grupos mercaptopropilo incrementa el carácter hidrofóbico de la superficie, lo que podría favorecer la interacción con la lacasa. En este trabajo se reporta la inmovilización mediante adsorción de la lacasa de Dichostereum sordulentum en SBA-15 funcionalizado con grupos tiol, con y sin cobre en su superficie, así como la caracterización bioquímica del derivado inmovilizado y su uso para la degradación del etinilestradiol.

Póster #37

Búsqueda de cepas productoras de enzimas con potencial interés industrial

Mairan Guigou[1], Florencia Risso[1], Laura Camesasca[1], Francisco Casciani[1], Victoria Batista[1], Paula Rodríquez[2]

[1] Departamento de Ingeniería Bioquímica y Bioprocesos, Instituto de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad de la República. [2] Laboratorio de Biocatálisis y Biotransformaciones, Departamento de Biociencias, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República.

Los microorganismos aislados de ambientes extremos como la Antártida albergan cepas con diversas adaptaciones metabólicas para su supervivencia. En consecuencia, constituyen nichos clave para el aislamiento de organismos novedosos capaces de sintetizar una amplia variedad de enzimas de interés biotecnológico. En este trabajo se evaluó el potencial de producción de enzimas proteolíticas, xilanolíticas y celulolíticas a partir de microorganismos aislados de muestras de suelo, agua y materia orgánica de la Isla Rey Jorge. Estas enzimas resultan de gran interés industrial por su amplio espectro de aplicaciones biotecnológicas. Las proteasas resultan útiles en procesos productivos en la industria de los detergentes, alimentos, cosmética e industria del cuero. Las xilanasas tienen

aplicación en la industria alimentaria, en la industria del papel y en la producción de biocombustibles. En tanto que las celulasas son utilizadas en la industria textil, en la formulación de detergentes, producción de pulpa del papel y biocombustibles.

Para la selección de las cepas con potenciales actividades enzimáticas se realizó un cribado cualitativo en medios sólidos con diferentes fuentes de carbono, dependiendo la actividad enzimática a estudiar. En el caso de la actividad proteolítica se utilizaron gelatina y leche en polvo como sustratos principales, para las xilanasas se utilizó xilano y para la producción de celulasas el medio contenía carboximetilcelulosa (CMC) como fuente de carbono. La actividad enzimática se detectó mediante la aparición de un halo de degradación formado alrededor de las colonias. Se evaluaron dos temperaturas de incubación 15 y 20°C durante una semana. Se encontraron 9 cepas que presentaron actividad proteolítica, 14 con actividad xilanolítica y 5 con actividad celulolítica.

Póster #38

Isómeros de ácido nitro-linolénico conjugado como mediadores lipídicos electrofílicos y sustratos de glutatión transferasas humanas

Martín Sosa[1], Martina Steglich[1], Francisco J. Schopfer[2], Ignacio López[3], Lucía Turell[1]

[1] Laboratorio de Enzimología, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, y Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad de la República. [2] Department of Pharmacology and Chemical Biology, School of Medicine, University of Pittsburgh, Pittsburgh, United States of America. [3] Sección Bioquímica, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Los nitroalquenos derivados de ácidos grasos (NO_2-FAs) son mediadores lipídicos electrofílicos formados durante la digestión y la inflamación, y son explorados como agentes terapéuticos. Estos compuestos ejercen efectos citoprotectores y antiinflamatorios mediante adición de Michael a residuos de cisteína en proteínas de señalización como Keap1/Nrf2. Entre ellos, el ácido nitro-oleico (NO_2-OA), una especie bien caracterizada con un único carbono electrofílico, reacciona con glutatión (GSH) en un proceso catalizado por las glutatión transferasas humanas (*h*GST) A4-4 y M1-1, generando productos no electrofílicos destinados a la excreción urinaria. En contraste, el ácido nitro-linolénico conjugado (NO_2-CLnA) es un NO_2-FA recientemente identificado que contiene un sistema trieno conjugado y tres carbonos potencialmente electrofílicos. Sus isómeros representan aproximadamente el 35 % del total de NO_2-FAs detectados en orina, pero su reactividad con tioles, sus funciones de señalización y el papel de las *h*GST en estos procesos aún no se conocen. En este trabajo investigamos la reactividad de NO_2-CLnA con GSH en ausencia y presencia de *h*GSTs mediante espectrofotometría de flujo detenido siguiendo el

consumo de NO_2-CLnA a 370 nm. Los cursos temporales en ausencia de enzima mostraron tres fases cinéticas y se ajustó un modelo triple exponencial a los datos, compatible con la presencia de tres sitios electrofílicos. En presencia de *h*GSTs el análisis cinético resultó más complejo, pero se confirmó la existencia de catálisis en presencia de *h*GST A1-1, A4-4 y M1-1, siendo la *h*GST A1-1 (isoforma mayoritaria en hígado) la que mostró mayor actividad. La formación de aductos GS–NO_2-CLnA fue confirmada por espectrometría de masas ($HESI^+$, m/z 631.2). Luego evaluamos los efectos celulares del NO_2-CLnA en células HepG2, utilizando la expresión de hemo oxigenasa-1 (HO-1), un blanco transcripcional de Nrf2, como indicador de la activación de esta vía. El tratamiento con NO_2-CLnA (10 μM) aumentó los niveles de ARNm de HO-1 de manera dependiente del tiempo, ~4 veces a las 4 h y ~7 veces a las 8 h. En concordancia con estos resultados, a las 18 h el análisis por western blot mostró un aumento de ~5 veces en los niveles de HO-1 respecto al vehículo. En conjunto, estos resultados revelan un papel enzimático novedoso de las *h*GSTs en el procesamiento de NO_2-FAs con trienos conjugados y aportan evidencia celular del NO_2-CLnA como mediador lipídico electrofílico en una línea celular hepática.

Póster #39

Producción recombinante de una lacasa bacteriana con alto potencial biotecnológico en *Aspergillus spp*.

Mateo Vega[1]*, Dr. Diego Vallés[2], Dr. Manuel Sanguinetti[1].

[1] Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, UdelaR. [2] Laboratorio de Biocatálisis y sus Aplicaciones, Facultad de Ciencias, UdelaR

Las lacasas son oxidasas multicobre capaces de catalizar la oxidación de una amplia variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos utilizando oxígeno como aceptor final de electrones y generando agua como único subproducto. Debido a su alta versatilidad y carácter ecológico, puede utilizarse en múltiples procesos químicos e industriales, entre ellos la biorremediación, la nanotecnología, el blanqueo de pulpa de papel, el teñido textil, la biorrefinería, la descontaminación de aguas residuales, la síntesis de compuestos orgánicos a partir de sustratos fenólicos y amínicos, así como la producción de biocombustibles, además de diversas aplicaciones biotecnológicas en el sector alimentario. El grupo de la Dra. Susana Castro aisló y caracterizó una lacasa de la bacteria *Sinorhizobium (Ensifer) meliloti* (SmLacasa) con una elevada estabilidad frente a altas temperaturas, detergentes, sales y almacenamiento prolongado. Sin embargo, los intentos de obtener esta enzima de forma recombinante mediante un sistema de expresión procariota en *Escherichia coli* no permitieron producir una proteína catalíticamente activa. En este contexto, proponemos desarrollar un sistema de expresión eucariota basado en *Aspergillus nidulans* y *Aspergillus niger* para la producción recombinante de la SmLacasa. Para

ello, se construyeron vectores de expresión que permitan la secreción extracelular constitutiva de la enzima. Se generaron cepas transformantes y se evaluó la producción de la proteína mediante ensayos de actividad enzimática y detección por Western blot. Además, se optimizarán las condiciones de cultivo considerando variables como temperatura, pH, fuentes de carbono y nitrógeno y tiempo de incubación, con el objetivo de maximizar el rendimiento de producción. Finalmente, la enzima recombinante será purificada mediante cromatografía de afinidad y caracterizada bioquímicamente para determinar sus propiedades catalíticas. Este proyecto busca avanzar en el establecimiento de cepas de *Aspergillus* como plataformas de expresión de proteínas recombinantes de interés biotecnológico en Uruguay y generar una estrategia eficiente para la obtención de una lacasa bacteriana funcional con potencial aplicación industrial.

Póster #40

Genes de virulencia y efectores en especies de Diaporthe causantes del cancro del tallo de la soja

Eilyn Mena[1*], Silvia Garaycochea[2], Lucas Mastroianni[2], Ignacio Gallino[1], Leonardo Delgado[1], Inés Ponce de León[1]

[1] Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevide, Uruguay. [2]Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). Estación Experimental INIA Las Brujas, Ruta 48 Km10, Canelones, Uruguay.

El cancro del tallo de la soja afecta las regiones productoras de todo el mundo, causando importantes pérdidas en el rendimiento y calidad de la semilla. Los agentes causales de la enfermedad son hongos del género Diaporthe: D. caulivora, D. longicolla, D. miriciae (D.ueckerae), D. aspalathi y D. masirevicii. En este trabajo secuenciamos el primer genoma de D. masirevicii y se obtuvieron genomas de D. miriciae y D. aspalathi con mejor ensamblado y anotación que los disponibles en el NCBI. Los genomas de D. aspalathi, D. miriciae y D. masirevicii tienen un tamaño estimado de 64,48; 58,17 y 58,43 Mb, snsamblados en 72, 9 y 8 contigs respectivamente. Además, se identificaron un total de 15.843, 17.896 y 17.271 genes en cada uno de ellos. Para la comparación genómica de los genes de virulencia se incluyeron en el estudio los genomas de D. caulivora y D. longicolla con tamaños de 57,86 Mb en 10 contigs con 18.385 genes y 63,1 Mb en 87 contigs con 17.435 genes, respectivamente. Se identificaron genes de virulencia que codifican enzimas de hidrato de carbono-activas (CAZymes), oxidorreductasas, policétido sintasas y efectores. Se identificaron genes de virulencia y efectores en común y especie-específicos para las cinco especies de Diaporthe estudiadas. Se inocularon plantas de soja del cultivar comercial (DM60i62) con cada una de las cinco especies de Diaporthe y se evaluó el avance de la infección. Además, se determinó la

expresión de 14 genes que codifican efectores, mediante RT-qPCR, a las 8, 48 y 96 horas Posteriores a la inoculación (hpi) de las plantas de soja. Los aislados de D. masirevicii y D. caulivora fueron los que presentaron mayor agresividad, observándose lesiones más grandes, y altos valores de índices de infección, severidad y área bajo la curva. Para todos los genes analizados, los valores más altos de expresión fueron a las 48 y 96 hpi. Los altos valores de expresión en efectores comunes (acetilxilano esterasa, xilanasa, proteína hipotética, glucósido hidrolasa familia 105 y glicosil hidrolasa familia 61) en las especies más agresivas (D. caulivora y D. masirevicii), podría indicar que son moléculas claves para la colonización de los tejidos de la soja. El análisis combinado del genoma y la expresión de genes brinda nueva e importante información sobre los mecanismos moleculares implicados en la virulencia de especies de Diaporthe y el proceso de colonización del huésped.

Póster #41

Producción recombinante y purificación de dos AMPs de la especie nativa *Feijoa sellowiana* (guayabo del país).

Rossi Florencia[1], Zerpa, Milagros[1]; Pristch Clara[1] , Rodriguez Decuadro Susana[1]

[1]Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Agronomía, UDELAR.

Los péptidos antimicrobianos (AMPs) son moléculas pequeñas, ricas en cisteína, que forman parte del sistema inmune innato de plantas y animales. Aunque presentan potencial para el control de infecciones en humanos, animales y cultivos, así como para la conservación de alimentos, la bioprospección de AMPs en la flora nativa de Uruguay sigue siendo limitada. Este trabajo tuvo como objetivo la producción recombinante y purificación de dos AMPs de la especie nativa *Feijoa sellowiana* en *Escherichia coli*. Las secuencias de los AMPs producidos, uno de la familia de las esnaquinas y otro de la familia de las defensinas (FsSn1 y FsDf2), se identificaron previamente mediante análisis de un pool de transcriptomas de hoja y tres estadios de flor. Se diseñaron *in silico* los constructos correspondientes en el vector de expresión Pet28a(+), con resistencia a kanamicina como marcador de selección, y con HisTag para su purificación. Con los plásmidos recombinantes obtenidos, se transformaron bacterias *E. coli* Rosetta-gami por shock térmico, induciéndolas con IPTG y crecimiento a 28°C por 24 hs. Se purificaron los péptidos utilizando IMAC y se evaluaron los eluídos utilizando la técnica de Bradford cualitativo. Se obtuvieron 4 eluídos con presencia de proteína para FsSn1 y 2 eluídos para FsDf2. Se visualizó en gel de poliacrilamida Tris-glicina la fracción celular insoluble, la fracción soluble, tres lavados y los eluídos de cada una de las proteínas. Para evaluar la concentración de proteínas en los eluídos, se realizó un análisis de Bradford cuantitativo. Para el

peptido FsDf2 se obtuvo un rendimiento de 4,2133 mg/L mientras que para FsSn1 el rendimiento fue de 20,0262 mg/L. Los eluídos se dializaron para purificar los peptidos de las sales, y se liofilizaron. Actualmente se están realizando ensayos de actividad *in vitro* mediante CIM, tanto con fitopatógenos como patógenos de alimentos. Estos resultados constituyen la primera aproximación a la producción recombinante de proteínas del frutal nativo *F. sellowiana*, y, en el caso de poseer actividad antimicrobiana, los péptidos podrán ser utilizado en futuras líneas de investigación enfocadas en el desarrollo de productos útiles para el tratamiento o el control efectivo de enfermedades.

Póster #42

Análisis de la expresión génica de las nitrogenasas Mo- y Fe-dependientes en la bacteria endófita *Kosakonia radicincitans* UYSO10

Inés Darré[1,2*], Federico Battistoni[1,2] y Cecilia Taulé[1,2]

[1]Laboratorio de Interacción Planta-Microorganismo, Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Ministerio de Educación y Cultura, Uruguay. [2]Centro de Investigaciones en Ciencias Ambientales (CICA), Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Ministerio de Educación y Cultura, Uruguay.

Kosakonia radicincitans UYSO10 es una cepa diazótrofa y endófita con capacidad demostrada para promover el crecimiento vegetal en caña de azúcar. Estudios genómicos previos revelaron la presencia de dos sistemas enzimáticos involucrados en la fijación biológica del nitrógeno (FBN): la Mo-nitrogenasa, isoforma presente en todos los diazótrofos y codificada por el operón *nif*; y la Fe-nitrogenasa, una isoforma alternativa codificada por el operón *anf*. La funcionalidad de ambos sistemas fue comprobada mediante la generación de cepas mutantes en los genes estructurales *nifH* y *anfH*, codificantes para la subunidad dinitrogenasa reductasa de la Mo- y Fe-nitrogenasa, respectivamente. A su vez, mediante ensayos de inoculación en plantas se demostró que ambas nitrogenasas participan en la promoción del crecimiento vegetal. El objetivo de este trabajo fue cuantificar los niveles de transcriptos de los genes involucrados en la síntesis y regulación de ambas nitrogenasas en la cepa UYSO10. Para ello, se diseñaron cebadores específicos para los genes estructurales (*nifH* y *anfH)* y sus respectivos reguladores transcripcionales (*nifA* y *anfA)*. Estos fueron validados según criterios MIQE. Pósteriormente, se cultivaron en condiciones de FBN las cepas UYSO10 (ambas enzimas funcionales), la mutante simple Δ*nifH* y la doble mutante complementada (con el gen *anfH*) Δ*nifH*Δ*anfH* p*anfH* (en estas dos últimas sólo la Fe-nitrogenasa es funcional). Para ello se inocularon $1x10^7$ células en viales conteniendo medio líquido NFCC modificado. Tras 4 días de incubación en quietud y a 30ºC, se cosecharon las células

por centrifugación y se extrajo el ARN total usando un kit comercial. Luego de evaluar su calidad y concentración, el ARN se trató con DNasa y se sintetizó ADNc mediante un kit comercial. La expresión relativa de los genes de estudio se determinó por RT-qPCR mediante $2^{-\Delta\Delta CT}$, normalizando con el gen *dapD* e incluyendo controles no-RT y NTC. Los análisis confirmaron la expresión basal de *nifH* en UYSO10 en condiciones de FBN. Respecto a la cepa parental, la mutante Δ*nifH* presentó una reducción significativa de transcriptos de *nifH* y una expresión diferencial de *nifA*, sin alterar los niveles de los genes *anf*. Por su parte, la cepa Δ*nifH*Δ*anfH* p*anfH* mostró una sobreexpresión significativa de *anfH* y una reducción persistente de *nifH*, manteniéndose estables los reguladores *nifA* y *anfA*. En conclusión, se optimizó una metodología por RT-qPCR que evidenció la expresión de *nifH* en la cepa parental y, por primera vez, la inducción transcripcional activa del sistema alternativo *anf* en las mutantes de UYSO10.

Póster #43

Caracterización genómica de *Turnip yellows virus* (TuYV) y primer reporte de *Brassica napus RNA virus 1* (BnRV1) en *Brassica napus* en Uruguay

J. Delfino[1]; H. Silva[2]; X. Cibils[4]; D. Simón[5]; A. Altieri[1]; C. Francia[4]; I. Ponce de León[1]; E. Hoffman[3]; A. Agorio[1]

[1] Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay. [2] Facultad de Agronomía, Estación Experimental Mario A. Cassinoni, Paysandú, Uruguay. [3] Unicampo Uruguay, Paysandú, Uruguay. [4] Protección Vegetal, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, La Estanzuela, Colonia, Uruguay. [5] Sección Genómica Evolutiva, Facultad de Ciencias, Montevideo, Uruguay.

El *Turnip yellows virus* (TuYV) es uno de los principales patógenos del cultivo de colza (*Brassica napus*) a nivel mundial; una oleaginosa de gran valor económico y clave en las rotaciones invernales de Uruguay. La infección por TuYV reduce sensiblemente el rendimiento del cultivo, pero suele pasar desapercibida debido a que sus síntomas (amarillamiento, enanismo, enrojecimiento foliar y clorosis intervenal) se confunden con los causados por estrés abiótico. Por ello, el diagnóstico molecular resulta indispensable para su detección. En 2023 nuestro grupo reportó por primera vez la presencia de TuYV en Uruguay. Desde entonces, continuamos con el monitoreo del TuYV en el territorio utilizando RT-PCR y DAS-ELISA. El análisis filogenético de fragmentos genómicos de TuYV identificados en Uruguay en comparación con secuencias de TuYV de otras partes del mundo, evidencia una alta variabilidad genética del TuYV en Uruguay. Asimismo, mediante RNA-seq, obtuvimos los primeros genomas completos de aislamientos uruguayos de TuYV que también evidencian alta variabilidad en el virus, ya sea intra planta como entre plantas. A raíz

de estos estudios de RNAseq detectamos la presencia del *Brassica napus RNA Virus 1* (BnRV1) en Uruguay y logramos ensamblar el genoma de este virus. Estos hallazgos constituyen la primera caracterización genómica de TuYV y BnRV1 en cultivos de colza de Uruguay y proporcionan una base para futuros estudios sobre la diversidad, evolución y epidemiología molecular de ambos virus, así como para evaluar la ocurrencia de coinfecciones y su posible impacto en la producción del cultivo.

Póster #44

Fenotipado vegetal de bajo costo asistido por inteligencia artificial: dos plataformas multimodales para evaluar estrés hídrico y vigor en soja y vid

Juan Manuel Fajardo[1]; Bruno Masoller[1]; Gustavo Pereyra[2]; Esteban Casaretto[2]; Marcel Bentancor[3]

1. Facultad de Ingeniería, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.2. Departamento de Producción Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Montevideo Uruguay. 3. Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

El fenotipado vegetal de alto rendimiento es hoy un cuello de botella para la mejora genética y el manejo agronómico de precisión. Nuestro grupo desarrolla una línea de trabajo que aplica visión por computadora, aprendizaje automático y fabricación digital de bajo costo al fenotipado no invasivo de plantas, en ambiente controlado y a campo. Presentamos aquí dos desarrollos complementarios de esa línea. El primero es una plataforma de fenotipado térmico para la detección de estrés hídrico en soja. El déficit hídrico induce cierre estomático, reduce la transpiración y eleva la temperatura foliar respecto del entorno, diferencial detectable mediante termografía infrarroja. La plataforma integra una cámara RGB (Raspberry Pi) y una cámara térmica radiométrica (FLIR Lepton). Se evaluaron 24 plantas dispuestas en grilla 6x4 con dos tratamientos balanceados (n=12): riego normal y suspensión de riego, empleando el tratamiento asignado como criterio de etiquetado objetivo. El procesamiento comprende la alineación geométrica de ambas modalidades, la segmentación del dosel mediante un método adaptativo que opera tanto sobre tejido verde como sobre tejido estresado sin coloración, y la extracción de seis descriptores de la distribución térmica del dosel: media, desvío estándar, percentiles 10 y 90, rango térmico y asimetría. La clasificación binaria con Random Forest (100 árboles), evaluada por Leave-One-Out Cross-Validation, alcanzó F1=0,846, AUC=0,814 y precisión=0,917. El descriptor más discriminante fue el percentil 10, consistente con la pérdida de zonas de transpiración activa bajo estrés.El segundo desarrollo, en curso, aplica esa misma lógica metodológica a un escenario a campo y a una modalidad sensora distinta: la

estimación no destructiva del peso de madera de poda en vid, indicador central del vigor y, junto con el rendimiento, del balance de la planta a través del índice de Ravaz. Los métodos vigentes son destructivos, costosos y se aplican a pocas plantas por parcela, con baja representatividad. Se propone una metodología basada en imágenes RGB y RGB-D adquiridas en viñedo real, sin fondos ni iluminación controlados, con segmentación semántica mediante aprendizaje profundo y estrategias de autoetiquetado, integrada a los flujos de estimación de rendimiento del grupo.Aunque difieren en la modalidad sensora (térmica frente a geométrica), la escala y el grado de control ambiental, ambos trabajos comparten una arquitectura conceptual común: captura multimodal co-registrada, segmentación del tejido de interés, extracción de descriptores cuantitativos y modelado, sobre hardware abierto y flujos reproducibles. Esa continuidad sostiene la transferibilidad del enfoque entre especies, rasgos y ambientes de medida.

Póster #45

Explorando la diversidad metabólica de genotipos uruguayos de boniato mediante enfoques dirigidos y no dirigidos

Mikaela Rajchman[1,2], Rafael Velazco[1,2], Aníbal Reyes[1,2], Mauricio Mastrogiovanni[1,2,3], Esteban Vicente[5], Joanna Lado[5], Rafael Radi[1,2,3], Cecilia Chavarría[1,2] y Adrián Aicardo[1,2,4]

[1] Programa en alimentos y Salud Humana (PAyS), Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay. [2] Centro de investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay. [3] Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay. [4] Departamento de Nutrición Clínica, Escuela de Nutrición, Universidad de la República, Uruguay. [5]INIA Salto Grande, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Uruguay.

El boniato (*Ipomoea batatas*) se encuentra entre las cinco principales hortalizas de Uruguay, tanto en términos de superficie cultivada como de volumen comercializado. Investigaciones recientes y los esfuerzos de mejoramiento genético vegetal han permitido desarrollar nuevas variedades que presentan mejores características agronómicas y atributos de calidad vinculados con las preferencias de los consumidores, como el sabor, la textura y la apariencia, así como, más recientemente, atributos relacionados con la salud. Esto ha incrementado el interés por genotipos con características particulares, especialmente los boniatos de pulpa anaranjada, reconocidos por su contenido de β-caroteno, y las variedades de pulpa morada, ricas en antocianinas, que presentan potenciales aplicaciones en diversas industrias. Comprender estas variedades es fundamental para reconocer sus propiedades particulares y mejorar su valor comercial. El objetivo de este estudio fue caracterizar y comparar los perfiles metabólicos de diferentes genotipos de boniato mediante enfoques de metabolómica dirigida y no dirigida. Se seleccionaron cinco

genotipos diferentes: F23A2.2 (pulpa morada), C2003.6 (pulpa anaranjada), INIA Rubí 63 (pulpa blanca) y dos clones de pulpa morada con patrones de marmolado en la pulpa (A1807.19 y C1831.6). Las muestras fueron sometidas a liofilización, molienda y homogeneización antes de los procedimientos de extracción, los cuales fueron adaptados de acuerdo con los metabolitos de interés. Los análisis incluyeron evaluaciones espectrofotométricas del contenido de fenoles totales, antocianinas y carotenoides. Bajo condiciones optimizadas, el boniato F23A2.2 presentó el mayor contenido de compuestos fenólicos y antocianinas, seguido por C1831.6 (pulpa morada y anaranjada) y, en tercer lugar, A1807.19 (pulpa morada y blanca). Además, se realizaron análisis mediante LC-UV/Vis, monitoreando diferentes longitudes de onda para la detección de compuestos específicos (fenólicos, flavonoles, carotenoides y antocianinas). La identificación de metabolitos incluyó análisis de LC-MS/MS de baja y alta resolución. Para la caracterización integral de los metabolitos se emplearon estrategias de anotación que incluyeron los flujos de trabajo de MZMine y MS-DIAL, redes moleculares basadas en características mediante GNPS y análisis con MS-DIAL utilizando diferentes bibliotecas espectrales. La integración de métodos espectrofotométricos, cromatográficos y de espectrometría de masas proporciona una visión integral de los perfiles metabólicos de estos genotipos de boniato, contribuyendo a una mejor comprensión de su potencial nutricional y funcional.

Póster #46

Aproximación teórica a la hidratación, solvatación y estabilidad conformacional de osmolitos relevantes en plantas

Rafael Sauto[1], Santiago Signorelli[1,2], Pablo D. Dans[3,4]

[1] Food and Plant Biology group, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. [2] Centre of Excellence in Plant Energy Biology, School of Molecular Science, The University of Western Australia, 6009, Crawley, WA, Australia. [3] Grupo de Modelado Molecular, Bioinformática & IA, Departamento de Ciencias Biológicas, CENUR Litoral Norte, Universidad de la República, Salto, Uruguay. [4] Unidad de Bioinformática, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay.

La acumulación de prolina es una respuesta conservada de las plantas al estrés abiótico (sequía, salinidad) pero su contribución osmótica medida es pequeña (~3-15 %), lo que sugiere un mecanismo no osmótico basado en hidratación: la prolina actuaría como soluto compatible/cosmótropo, preservando una capa de hidratación ordenada por exclusión preferencial (Arakawa-Timasheff). Este trabajo evalúa si la prolina es genuinamente un osmoprotector privilegiado o solo un soluto compatible más, comparándola con alanina, betaína, glutamato y sacarosa mediante dinámica molecular (MM) clásica y cálculos cuánticos (QM).Se simularon con dinámica

molecular 14 sistemas para los cinco osmolitos en dilución infinita, ~0.1 M y ~0.5 M, con producción refinada de 250 ns (10.6 μs en total), analizando RMSD, funciones de distribución radial (RDF), ocupación y residencia de agua, puentes de hidrógeno soluto-agua y auto asociación, factores B tipo cristalográfico, entropía configuracional (Schlitter y Andricioaei Karplus) y entropía del agua de hidratación (GIST). Sobre cientos de instantáneas tomadas de las dinámicas moleculares con aguas de la primera esfera se calcularon energías libres de solvatación usando funcionales de la densidad. En conjunto, los resultados indican que la distintividad de la prolina reside en el soluto (rigidez conformacional, baja entropía configuracional, colapso a un único confórmero hidratado) y no en una reestructuración especial del agua. El glutamato es el verdadero caso atípico en todas las métricas evaluadas. Estos hallazgos redefinen el dogma vigente sobre el rol osmolito de la prolina, aportando evidencia cuantitativa sobre su mecanismo de osmoprotección.

Póster #47

Caracterización mediante herramientas *in silico* de una nueva pequeña proteína (SPQ) con rol en la tolerancia a la sequía en plantas

Rafael Sauto[1], Sabina Vidal[2], Omar Borsani[1]

[1]Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía, [2]Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias Universidad de la República (UdelaR), Montevideo, Uruguay rsauto@fagro.edu.uy

SPQ es una pequeña proteína (66-76 aa) identificada en Lepidium crassifolium (Lc), que mejora la respuesta al déficit hídrico en plantas de Arabidopsis thaliana (At) sobreexpresantes. No tiene similitud con otros péptidos de estrés conocidos, lo que sugiere que pertenece a una nueva clase de reguladores. Este estudio tiene como objetivo profundizar en la estructura y evolución de SPQ mediante análisis in silico e inteligencia artificial, para comprender los posibles roles de esta proteína en la protección frente al déficit hídrico en plantas. El análisis bioinformático en el genoma de A. thaliana realizado hasta el momento permitió caracterizar la secuencia codificante de SPQ (AT3G52105), lo que sugiere que el locus codificaría dos isoformas (70 y 118 aa) por splicing alternativo. Por otro lado, se identificó un par NAT (natural antisense transcripts) entre AtSPQ y DIS3 (AT3G52110) dado que ambos genes apuntan hacia la zona de solapamiento y comparten 77 pb en sus regiones 3' UTR, lo que podría sugerir un mecanismo de regulación por ARN antisentido natural. Se encontró que el gen SPQ es exclusivo de angiospermas (origen estimado 125-140 Ma) ocupando posiciones terminales en las proteínas. Mediante BLASTP se realizaron búsquedas independientes en NCBI (14 queries, 234 proteínas únicas) y en Phytozome (1 query, 465 proteínas), identificando en conjunto cerca de 730 homólogos de la familia SPQ. Estas secuencias mostraron un claro predominio en Brassicaceae, Fabaceae y Malvaceae. El conjunto total

permitió agrupar los homólogos en seis clases estructurales para su Pósterior análisis filogenético. El análisis comparativo de promotores muestra que en un cultivo de relevancia como soja el gen GmSPQ6 (Glyma.03G138700) podría corresponder a un ortólogo funcional de SPQ, pese a ser el parálogo más divergente en secuencia. Esto se basa en que conserva los elementos cis de respuesta a ABA, sequía y estrés oxidativo, compartidos con el promotor de SPQ. La comparación estructural mediante ESMFold mostró conservación de fold entre AtSPQ y LcSPQ, pero divergencia estructural marcada con GmSPQ6. El uso de líneas mutantes en A. thaliana alteradas en la expresión de SPQ y los análisis Pósteriores en soja podrán contribuir a la comprensión del rol de esta proteína en la tolerancia a estrés. Estos resultados sientan las bases para avanzar en la caracterización funcional in vivo y evaluar el potencial de SPQ como candidato biotecnológico para mejorar la tolerancia a la sequía en cultivos de relevancia.

Póster #48

Tolerancia a sequía en soja mediante la sobreexpresión de dehidrinas.

Bertolini S., Fleitas AL., Ruibal C., Gallino JP., Vidal S.

Facultad de ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

La soja (Glycine max L. Merr.) es un cultivo de gran importancia global, pero altamente sensible al déficit hídrico, una limitante crítica en Uruguay debido a la baja capacidad de almacenamiento hídrico de sus suelos. Una de las estrategias celulares de protección frente a la deshidratación es la acumulación de dehidrinas (proteínas LEA grupo II). Este trabajo parte de la hipótesis de que la sobreexpresión de genes codificantes para dehidrinas se podrá incrementar la tolerancia a sequía del cultivo de soja. Para evaluarlo, se transformaron de forma estable plantas de los genotipos Williams 82 y SCJ14511 mediante *Agrobacterium tumefaciens* en nodos cotiledonares. La construcción incorporada permite la expresión policistrónica de dos dehidrinas candidatos previamente seleccionados: una citosólica del musgo *Physcomitrium patens* y una pequeña dehidrina nuclear de soja. La selección de plantas transformadas se confirmó mediante tiras reactivas para la proteína PAT. Se obtuvieron 14 eventos transgénicos para Williams 82 (eficiencia del 1,5 %) y 44 para SCJ14511 (eficiencia del 4,5 %). Mediante PCR cuantitativo se seleccionaron líneas con 1 o 2 copias del transgén. El sitio de inserción intergénica se determinó por flanking PCR, la integración completa del T-DNA por PCR y la expresión proteica mediante western blot. Actualmente se cuenta con 4 líneas candidatas T3 de Williams 82 y 2 líneas T2 de SCJ14511. Próximamente se evaluará la tolerancia al déficit hídrico mediante ensayos de restricción hídrica en invernadero.

Póster #49

¿Cómo decide una planta restringir su crecimiento frente al calor? Análisis funcional de *PpBAG1 en la aclimatación térmica de Physcomitrium patens.*

Rondán Mouco Santiago[1], Saavedra Laura[2,3] y Castro Alexandra[1]

1 Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. 2 Unidad de Estudios Agropecuarios (UDEA), Unidad Ejecutora de Doble Dependencia INTA-CONICET, Córdoba, Argentina. 3 Cátedra de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

El cambio climático representa un desafío medioambiental con un profundo impacto en los ecosistemas, afectando directamente al crecimiento de los cultivos y, en consecuencia, la seguridad alimentaria. Frente a estas condiciones, las plantas activan mecanismos de aclimatación que les permiten mantener la homeostasis celular y asegurar su supervivencia.. Comprender estos procesos es vital para desarrollar estrategias que mitiguen los efectos del estrés ambiental. La familia BAG está compuesta por proteínas co-chaperonas altamente conservadas que interactúan con HSP70 y participan en procesos vinculados con la proteostasis, la muerte celular programada y las respuestas al estrés. En el musgo modelo Physcomitrium patens se identificaron 10 genes BAG. Estudios transcriptómicos previos mostraron que cuatro miembros de esta familia (PpBAG1, PpBAG2, PpBAG3 y PpBAG8) se inducen en respuesta al estrés térmico severo (37 °C). Entre ellos, PpBAG1 presenta además una respuesta temprana al calor moderado: su expresión aumenta rápida y transitoriamente durante la primera hora de exposición a 30 °C, una temperatura que induce aclimatación sin provocar daño severo. Para profundizar en la función de PpBAG1, se utilizó la tecnología de CRISPR/Cas para generar líneas knockout y poner a prueba su desempeño en condiciones de estrés térmico moderado. Mientras que las plantas wild type restringen significativamente su crecimiento durante la exposición prolongada a 30 °C, los mutantes ppbag1 mantienen un crecimiento comparable al observado en condiciones control. Estos resultados preliminares sugieren que PpBAG1 participa en la regulación de las respuestas tempranas que conducen a la restricción del crecimiento durante la aclimatación al calor moderado. Actualmente se están caracterizando los mecanismos moleculares asociados a este fenotipo mediante el análisis de procesos relacionados con la proteostasis, el ciclo celular y la autofagia. Para ello, además de las líneas Ppbag1, se generaron mutantes en un fondo ATG8:GFP, que permitirán evaluar el posible vínculo entre PpBAG1 y la dinámica autofágica durante la aclimatación al calor moderado.

Póster #50

Caracterización molecular de líneas editadas mediante CRISPR/Cas9 del promotor de *GmCV1* en *Arabidopsis thaliana*, para el análisis funcional de elementos reguladores.

Briano, Selene [1]; Vidal, Sabina [1]; Fleitas, Andrea Luciana [1].

1 Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República

El déficit hídrico constituye uno de los principales factores limitantes del rendimiento de la soja (Glycine max). La proteína Chloroplast Vesiculation 1 (CV1) participa en la degradación de cloroplastos durante la senescencia inducida por estrés y hasta cierto punto, durante la senescencia natural. La inducción de GmCV1 en respuesta al estrés se correlaciona negativamente con la tolerancia a la sequía en genotipos contrastantes de soja. En este contexto, la edición de elementos cis reguladores del promotor de GmCV1 representa una estrategia promisoria para modular finamente su expresión e interferir con la regulación por estrés y no con aquella mediada por factores del desarrollo. El objetivo de este trabajo es caracterizar la contribución de distintas regiones del promotor de CV1, a la inducción por estrés hídrico, así como a la regulación hormonal, empleando una estrategia de edición génica. Para ello, se generaron y genotiparon líneas editadas en proGmCV1 en un sistema de expresión heterólogo (Arabidopsis), para evaluar el efecto de las mutaciones sobre la actividad del promotor. Se utilizaron líneas transgénicas de Arabidopsis thaliana portadoras de la construcción proGmCV1:GUS, para generar eventos editados mediante CRISPR/Cas9 usando RNAs guías (gRNAs) dirigidos a diferentes regiones regulatorias del promotor. En la generación T0 se verificó la presencia de Cas9 mediante PCR y se realizó un análisis preliminar de edición mediante amplificación del locus blanco y High Resolution Fragment Analysis (HRFA), en muestras compuestas de conjuntos de plantas. A partir de los eventos editados detectados, se seleccionaron linajes T1 para evaluar la actividad relativa del promotor mediante ensayos fluorimétricos de GUS en respuesta a ABA, priorizando aquellos que presentaron menor actividad promotora. Pósteriormente, las plantas T1 y T3 fueron analizadas individualmente por HRFA, identificándose distintos tipos de inserciones y deleciones, cuya detección resultó consistente con los eventos observados en la generación T0 y permitió evidenciar su segregación. Para incrementar la frecuencia de edición, las plantas fueron sometidas a tratamientos de shock térmico a 37 °C, condición que favorece la actividad de Cas9. Las líneas con eventos homocigotas, se encuentran en proceso de secuenciación. La caracterización molecular de las mutaciones y el análisis funcional del promotor permitirán relacionar modificaciones específicas con cambios en su regulación. Estos resultados contribuirán a identificar elementos cis cuya edición reduzca la inducción de GmCV1 por estrés sin afectar su regulación durante el desarrollo, con potencial aplicación en el mejoramiento genético de la tolerancia a la sequía en soja.

Póster #51

GmCV1 como regulador de la remodelación plastídica y la respuesta al estrés abiótico en soja

Timothy Riley, Sabina Vidal

Laboratorio de biología molecular vegetal, insϴtuto de química biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay

El déficit hídrico constituye uno de los principales factores ambientales que limitan la productividad de los cultivos, particularmente en sistemas agrícolas dependientes de precipitaciones. La soja (Glycine max) presenta una marcada sensibilidad al déficit hídrico, que puede promover la activación prematura de procesos de senescencia y el consecuente desmantelamiento del aparato fotosintético. Entre los mecanismos involucrados en la degradación selectiva de componentes plasσdicos se encuentra la vía de Vesiculación Cloroplástica (CV), cuya activación ha sido asociada a la respuesta a distintos estreses abióϴcos. En soja se han idenϴficado dos parálogos, GmCV1 y GmCV2, que presentan patrones de regulación diferenciales, sugiriendo una especialización funcional. Resultados previos de nuestro grupo indican que, mientras GmCV2 presenta un patrón asociado principalmente a la senescencia foliar, GmCV1 responde a señales ambientales y hormonales relacionadas con el estrés y, adicionalmente, se expresa en tejidos no fotosintéticos como las raíces. Esta expresión sugiere que GmCV1 podría desempeñar funciones adicionales a la degradación de cloroplastos durante la senescencia, potencialmente vinculadas con la remodelación de otros tipos de plástidos y con procesos fisiológicos asociados al desarrollo y respuesta al estrés radicular. En este contexto, nuestro trabajo busca dilucidar los mecanismos celulares y fisiológicos mediante los cuales GmCV1 integra señales ambientales y hormonales y participa en la remodelación plasσdica. Para ello, se emplean líneas transgénicas de Arabidopsis thaliana que expresan GmCV1 fusionado a Citrina bajo su promotor nativo, conjuntamente con marcadores fluorescentes de respuesta a auxinas, muerte celular programada y plástidos. Mediante microscopía confocal y caracterización fenoσpica se estudiará la localización y regulación de GmCV1, su asociación con procesos de muerte celular programada y su posible participación en la arquitectura radical. Finalmente, se generarán y caracterizarán líneas con alteraciones en la actividad de GmCV1 para determinar su contribución a la respuesta al déficit hídrico y evaluar su potencial como blanco biotecnológico. Este abordaje permitirá avanzar en la comprensión de la función de GmCV1 más allá de la senescencia foliar y contribuirá a identificar mecanismos de remodelación plasσdica potencialmente relevantes para la adaptación de la soja al estrés hídrico.

Póster #52

Valorización de subproductos agroindustriales: extracción de polifenoles e isoflavonas de harina de soja y orujo de uva Tannat

Victoria Viroga [1], Tomás Tejera [1,2], Cecilia Ortiz [1]

[1] Laboratorio de Biotecnología, Universidad ORT Uruguay, Montevideo, Uruguay. [2] Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay.

La agroindustria uruguaya genera grandes volúmenes de subproductos de bajo valor comercial ricos en compuestos bioactivos. La harina de soja desgrasada concentra isoflavonas mayoritariamente glucosiladas, de menor biodisponibilidad que sus agliconas; el orujo de uva Tannat, principal residuo de la vinificación, aporta polifenoles y antocianinas. En el marco de la economía circular, su valorización requiere procesos de extracción sostenibles. El objetivo de este trabajo fue desarrollar estrategias sostenibles de extracción de polifenoles e isoflavonas a partir de ambas matrices, caracterizar la bioactividad de los extractos y estudiar la conversión enzimática de isoflavonas glucosiladas a agliconas. Se evaluaron protocolos de extracción con y sin asistencia ultrasónica, empleando agua para la harina de soja y una mezcla hidroalcohólica acidificada para el orujo. Los extractos se caracterizaron por Folin-Ciocalteu, HPLC-DAD (isoflavonas y malvidina-3-O-glucósido) y captura de los radicales $ABTS^{\bullet+}$ y DPPH•. La condición seleccionada se escaló 14,8 veces y el extracto se trató con β-glucosidasa de *Aspergillus niger*, monitoreando por HPLC-DAD la conversión de glucósidos a agliconas. Las diferencias entre condiciones se analizaron mediante ANOVA. Los ensayos con harina de soja rindieron 0,75 ± 0,02 a 1,38 ± 0,04 mg EAG/g de polifenoles totales, con capacidades antioxidantes de 1,02 ± 0,10 a 1,92 ± 0,17 y de 0,10 ± 0,01 a 0,13 ± 0,02 mg EAA/g por ABTS y DPPH, respectivamente. La extracción acuosa sin ultrasonido fue seleccionada para el escalado, al no diferir significativamente de las condiciones asistidas, con 898 µg/g de isoflavonas totales. Tras el escalado se conservaron el 70,5 % de las isoflavonas, el 68,5 % de los polifenoles y el 88,4 % y 63,2 % de la capacidad antioxidante por ABTS y DPPH, respectivamente. La hidrólisis enzimática logró la conversión completa de los glucósidos simples y aumentó 1,45 veces la capacidad antioxidante por ABTS, sin modificar el contenido de polifenoles totales. En el orujo, las mejor condición seleccionada recuperó entre 12,74 ± 1,06 y 19,23 ± 0,75 mg EAG/g de polifenoles totales, 0,77 a 1,47 mg/g de malvidina-3-O glucósido y capacidades antioxidantes de 22,99 ± 0,81 a 26,49 ± 3,20 y de 9,08 ± 0,28 a 9,73 ± 1,09 mg EAA/g por ABTS y DPPH. Los resultados muestran que es posible recuperar compuestos bioactivos de estos subproductos mediante procesos de baja demanda energética y solventes de bajo impacto. La hidrólisis enzimática permitió además enriquecer los extractos en agliconas y mejorar su capacidad antioxidante. Como perspectivas se plantean la optimización del escalado y la incorporación de los extractos en matrices alimentarias y nutricosméticas.

Póster #53

Efectos diferenciales de nanomicelas lipídicas sobre la respuesta funcional a bloqueantes de corrientes hERG y de sodio en corazón aislado (*Cavia porcellus*).

Chavarría, L[1]. Cardozo, R[1]. Dominguez, L[1]. Budelli[1], G. Bolatto, C[2,3]. Ferreira, G[1].

(1) Laboratorio de Canales Iónicos, Membranas Biológicas y Señalización Celular, Departamento de Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay. (2) Laboratorio de Biología del Desarrollo, Unidad Académica de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay. (3) Departamento de Neurobiología y Neuropatología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Ministerio de Educación y Cultura, Montevideo, Uruguay.

La Terapia de Reemplazo Lipídico (TRL) se basa en la administración de glicerofosfolípidos exógenos capaces de incorporarse a las biomembranas y contribuir a la sustitución de lípidos dañados u oxidados. Mediante este mecanismo, la TRL podría restaurar propiedades físicas de la bicapa, como la fluidez, el espesor, la curvatura y la organización lateral, modulando el entorno de proteínas integrales de membrana, incluidos canales iónicos dependientes de lípidos. El objetivo de este trabajo fue evaluar si las nanomicelas lipídicas (NTFL, 0,01%) modifican diferencialmente la respuesta funcional cardíaca frente al bloqueo farmacológico de corrientes implicadas en la excitabilidad y la repolarización ventricular. Se utilizaron corazones aislados de cobayo perfundidos por retroperfusión coronaria en un sistema de Langendorff, registrándose la amplitud contráctil y la frecuencia cardíaca. La perfusión previa con NTFL atenuó la disminución de la amplitud contráctil inducida por dofetilida (5,6–12 µM), bloqueante farmacológico de IKr/hERG, manteniendo valores próximos a los basales durante la exposición al fármaco. Este resultado es consistente con un efecto estabilizador de las nanomicelas sobre componentes de membrana involucrados en la respuesta funcional al bloqueo de la repolarización. En contraste, la preincubación con NTFL no evitó la reducción de la amplitud contráctil y de la frecuencia inducida por lidocaína (12 µM), bloqueante de los canales rápidos de sodio. Sin embargo, durante el lavado de lidocaína en presencia de NTFL se observó una recuperación marcada de la actividad mecánica, con amplitudes superiores a los valores basales.

En conjunto, los resultados indican que las nanomicelas lipídicas modulan, de forma dependiente del contexto farmacológico, la respuesta funcional del miocardio frente a bloqueantes de canales iónicos. Mientras que ante dofetilida predomina un efecto protector durante la exposición al fármaco, frente a lidocaína el efecto se manifiesta principalmente durante la recuperación Pósterior al bloqueo. Estudios Pósteriores de electrofisiología, potencial de acción y calcio intracelular permitirán definir si estas diferencias reflejan interacciones específicas entre cada canal y su entorno lipídico.

Póster # 54

Efectos cardíacos de la intoxicación por monóxido de carbono y terapia con nanomicelas de lipídicas

Cardozo, Romina[1*#]; Chavarría, Luisina[1*]; Monferrato, Rocco[1]; Ferreira, Gonzalo[1#]

[1] Laboratorio de Canales Iónicos, Membranas Biológicas y Señalización Celular. Unidad Académica de Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay. * Igual contribución al trabajo. # Autor correspondiente.

La intoxicación por monóxido de carbono (CO) constituye una importante causa morbimortalidad y están reportadas alteraciones cardíacas graves, aunque sus mecanismos celulares no se encuentran completamente esclarecidos. El objetivo de este trabajo es caracterizar los efectos del CO sobre la función cardíaca, la homeostasis del calcio intracelular y las corrientes de calcio tipo L, así como evaluar el efecto de la terapia de reemplazo lipídico de membranas mediante nanomicelas. Se utilizaron corazones aislados de rata perfundidos mediante la técnica de Langendorff y cardiomiocitos ventriculares aislados. El CO fue administrado mediante concentraciones crecientes del dador CORM-2. En corazón aislado, se registró la amplitud de contracción y la frecuencia cardíaca, y se aplicó un protocolo de isquemia-reperfusión registrando las mismas variables. Se realizó microscopía confocal para evaluar las alteraciones de la concentración de calcio intracelular, y se registraron corrientes de calcio tipo L mediante la técnica de *patch clamp*. Los protocolos se repitieron en presencia de nanomicelas fosfolipídicas al 0,01 %. CORM-2 produjo una respuesta bifásica, con aumento inicial de la contractilidad a bajas concentraciones y disminución progresiva a dosis mayores, este efecto mostró un IC50 de 7 µM. Las velocidades de contracción y relajación disminuyeron, y este efecto revierte parcialmente con el lavado, aun cuando el efecto sobre la amplitud de la contracción si revierte por el lavado. Se observó un aumento de la incidencia de arritmias, predominantemente durante la isquemia-reperfusión, y una menor recuperación de la contractilidad luego de la reperfusión. En cardiomiocitos aislados se observó desregulación de la homeostasis del calcio intracelular. Los registros de *patch clamp* mostraron una disminución significativa de la corriente pico de calcio tipo L, parcialmente reversible tras el lavado. Frente a la administración de nanomicelas, se observa una disminución del efecto inotrópico negativo a todas las dosis. Las velocidades de contracción y relajación no se vieron afectadas significativamente en los casos que se agregaron nanomicelas. En la isquemia-reperfusión, se observó una menor disminución de la amplitud luego de la reperfusión. También se vio reducción en la incidencia de arritmias. En cuanto a célula aislada, se preservó parcialmente las corrientes de calcio tipo L y la homeostasis intracelular del calcio. En conjunto, los resultados indican que el CO altera la función cardíaca mediante mecanismos que involucran la desregulación del calcio y la disfunción de canales iónicos. La terapia de reemplazo lipídico con nanomicelas fosfolipídicas mostró una reducción en estos efectos deletéreos.

Póster # 55

Caracterización de la relación entre las propiedades biofísicas de la membrana ciliar y la señalización de PDGFRα

Florencia Irigoin**,** Agustina Tabachnik**,** Daniela Ali y Matilde Cortabarría

Instituto Pasteur de Montevideo

La cilia primaria es un organelo sensorial presente en la mayoría de las células de mamíferos, clave en la recepción y transducción de señales extracelulares. Su membrana posee una composición lipídica distintiva, enriquecida en colesterol y esfingolípidos como la esfingomielina, lo que le confiere una fluidez menor a la de la membrana plasmática. Aún se desconoce en qué medida esta fluidez condiciona la funcionalidad de receptores que señalizan desde la cilia, como PDGFRα, un receptor tirosina quinasa cuya señalización depende de este organelo. Existe evidencia de que la fluidez de membrana y el colesterol modulan la actividad quinasa de otros receptores tirosina quinasa, pero esto no ha sido estudiado en receptores ciliares. En este trabajo evaluamos si cambios en los niveles de colesterol y esfingomielina, y en consecuencia en la fluidez de la membrana ciliar, afectan la activación de PDGFRα. Utilizamos células MEF y NIH/3T3. Primero confirmamos por inmunofluorescencia que PDGFRα se localiza en la cilia de ambos tipos celulares. Luego, para modular la composición lipídica de la membrana, tratamos las células con myriocin, un inhibidor de la síntesis de esfingolípidos, y con metil-β-ciclodextrina (sola o en complejo con colesterol) para disminuir o aumentar los niveles de colesterol, respectivamente. El efecto sobre la fluidez de la membrana se evaluó con LAURDAN, una sonda fluorescente sensible al empaquetamiento lipídico, junto con microscopía hiperespectral y análisis de fasores. En paralelo, evaluamos la actividad del receptor estimulando con PDGF-AA y midiendo la fosforilación de Akt. Los resultados muestran que la estimulación con PDGF-AA aumenta la fosforilación de Akt en células MEF, validando el sistema para estudiar la señalización de PDGFRα. Los tratamientos con myriocin y con los complejos de colesterol produjeron un aumento en la fluidez de la membrana, lo que indica que estas intervenciones modifican efectivamente las propiedades biofísicas de la membrana ciliar. Estos resultados sientan las bases para estudiar la relación entre composición lipídica, fluidez de membrana y señalización mediada por PDGFRα en la cilia primaria. Como perspectivas, nos proponemos confirmar mediante sondas fluorescentes específicas que los tratamientos modifican efectivamente los niveles de estos lípidos en nuestro sistema, y evaluar cómo esta composición lipídica modificada afecta la activación de PDGFRα, integrando así los cambios en fluidez con la funcionalidad del receptor.

Póster #56

Los fitocannabinoides modulan los niveles de $NO^{\bullet}$, la activación de NOX y la expresión de HO-1 en macrófagos polarizados a M1

Marcel Donzé[1], Bruno Musetti[2] and Leonor Thomson[1]

[1] Laboratorio de Enzimología, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay [2] Department of Cell Biology & Physiology, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC, United States

Los macrófagos activados desempeñan un papel central en la respuesta inmunitaria innata y cumplen una función crucial en el proceso inflamatorio. La regulación coordinada de los sistemas productores de especies oxidantes y de las defensas antioxidantes juega un papel clave en la función de estas células y de la respuesta inflamatoria.

La planta Cannabis sativa ha sido utilizada con fines medicinales durante siglos y se ha demostrado ampliamente que sus principales compuestos bioactivos, los fitocannabinoides, ejercen acciones antiinflamatorias e inmunomoduladoras. Sin embargo, a pesar del creciente interés en su potencial terapéutico, el impacto de los cannabinoides sobre los sistemas generadores de especies oxidantes en macrófagos permanece escasamente caracterizado. En este trabajo evaluamos los efectos de los fitocannabinoides, incluyendo extractos de Cannabis sativa y cannabidiol (CBD) puro, sobre parámetros proinflamatorios y redox en macrófagos murinos polarizados a M1. La activación de la NADPH oxidasa (NOX) se evaluó indirectamente mediante la cuantificación de la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), utilizando Amplex UltraRed como sonda fluorescente. La producción de óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) se cuantificó mediante el ensayo de Griess como indicador de la actividad de la óxido nítrico sintasa inducible (NOS2). En paralelo, la expresión de la enzima antioxidante hemo oxigenasa-1 (HO-1) se determinó mediante Western blot. Los tratamientos con cannabinoides redujeron significativamente la producción de H_2O_2 y la producción de $NO^{\bullet}$, al tiempo que incrementaron la expresión de HO-1, lo que respalda una atenuación global del fenotipo inflamatorio. En conjunto, estos hallazgos sugieren que los cannabinoides inhiben las vías de señalización dependientes de TLR4/NF-κB y MAPK, al tiempo que promueven la respuesta antioxidante dependiente de Nrf2 en macrófagos activados. Este efecto coordinado sobre parámetros redox apunta a que la modulación del estado redox de los macrófagos podría contribuir a los efectos antiinflamatorios atribuidos a los cannabinoides.

Póster #57

Nanomicelas lipídicas como estrategia preventiva frente a la cardiotoxicidad aguda inducida por doxorrubicina

Cambón, Clara[1*]; Fuentes, Lucía[1*]; Arambillete, Constanza[1*]; Cardoso, Priscila[1*]; Giménez, Florencia[1*]; Lafranchi, Delfina[1*]; Monferrato, Rocco; Chavarría, Luisina; Demarco, Agustín[1*]; Cardozo, Romina [1#]; Ferreira, Gonzalo[1#].

1. Laboratorio de Canales Iónicos, Membranas Biológicas y Señalización Celular. Unidad Académica de Biofísica, Facultad de Medicina, UdelaR.# Autor de correspondiente. * Igual contribución al trabajo.

La doxorrubicina (DOX) es una antraciclina ampliamente utilizada contra neoplasias de alta proliferación, aunque su aplicación clínica está limitada por su cardiotoxicidad. Entre los mecanismos involucrados se encuentran la generación de especies reactivas de oxígeno, la disfunción mitocondrial y la peroxidación de los lípidos de membrana, alteraciones que comprometen la integridad celular, perturban la homeostasis del Ca^{2+} y favorecen la disfunción contráctil. Sobre esta base, evaluamos si la reposición de lípidos de membrana mediante nanomicelas podía prevenir o revertir el daño cardíaco agudo provocado por DOX.En corazones aislados de rata perfundidos mediante la técnica de Langendorff se obtuvieron curvas dosis–respuesta a concentraciones crecientes de DOX, tanto en ausencia como en presencia de nanomicelas lipídicas al 0,01 %. Este modelo permitió demostrar un efecto cardíaco agudo directo de la DOX, independiente de influencias neurohumorales sistémicas. La administración preventiva de nanomicelas atenuó el deterioro funcional producido por el fármaco y prolongó la viabilidad del preparado respecto de los corazones expuestos únicamente a DOX. En contraste, la incorporación de nanomicelas después de establecido el daño produjo una recuperación funcional parcial.

Complementariamente, en cardiomiocitos aislados de rata estudiados mediante microscopía confocal, la exposición a DOX produjo sobrecarga de Ca^{2+} intracelular y acumulación celular del fármaco, evaluada a partir de su fluorescencia intrínseca. El pretratamiento con nanomicelas redujo la señal fluorescente asociada a DOX, hallazgo compatible con una menor incorporación del fármaco o con la preservación de la función de barrera de la membrana. En conjunto, estos resultados respaldan preliminarmente que las nanomicelas lipídicas al 0,01 % ejercen un efecto predominantemente profiláctico frente a la cardiotoxicidad aguda inducida por DOX. Su eficacia preventiva, pero parcialmente reparadora una vez instalado el daño, destaca la importancia de preservar tempranamente la integridad de las membranas celulares y mitocondriales.

Póster #58

El postbiótico urolitina A modula la homeostasis microglial mediante la reprogramación de la expresión génica y metabólica

Mauro Pérez[1,2,3]; Adrián Aicardo[1,2,3,4]; Carlos E. Sanz-Rodríguez [1,2,3]; María Laura Chiribao [1,2,3,5]; Soledad Marton[6], Eugenia Isasi[6], Rafael Radi[1,2,3]; Cecilia Chavarría[1,2,3]

1 Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, 11800, Uruguay.
2 Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, 11800, Uruguay.
3 Programa en Alimentos y Salud Humana (PAyS), Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, 11800, Uruguay.
4 Departamento de Nutrición Clínica, Escuela de Nutrición, Universidad de la República, Montevideo, 11600, Uruguay.
5 Laboratorio de interacciones hospedero-patógeno, Institut Pasteur de Montevideo
6 Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, 11800, Uruguay.

La dieta desempeña un papel fundamental en el envejecimiento saludable y en la prevención de enfermedades asociadas a la edad. En este contexto, los compuestos bioactivos provenientes de los alimentos pueden ejercer efectos beneficiosos adicionales a su función nutricional. Las urolitinas son postbióticos generados por la microbiota intestinal a partir de elagitaninos presentes en diversos alimentos, como granada, frutos rojos, uvas, semillas y frutos secos. Entre ellas, la urolitina A (UA) presenta especial interés debido a su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica, lo que la posiciona como un potencial agente con posibles efectos a nivel del sistema nervioso. En este contexto, el presente trabajo busca estudiar el rol de UA sobre la modulación de células microgliales y los mecanismos celulares involucrados. Para ello, se utilizó la línea celular murina BV-2 como modelo de microglía, sometida a condiciones de estrés metabólico mediante deprivación de suero. El análisis transcriptómico reveló una reprogramación en la expresión génica, caracterizada por cambios en vías asociadas al ciclo celular, la proliferación y, principalmente, al metabolismo lipídico, incluyendo genes involucrados en la biosíntesis de colesterol. Estos resultados se acompañaron de un aumento de la viabilidad celular luego del tratamiento con UA a bajas concentraciones. Además, el tratamiento con UA aumentó el número total de células y la incorporación de BrdU, indicando un aumento de la proliferación celular bajo las condiciones de estrés metabólico. En concordancia con la activación de la vía de síntesis de colesterol, las células tratadas con UA mostraron una mayor acumulación de gotas lipídicas determinada mediante Oil Red O y además, el análisis por TLC confirmó un incremento en el contenido de colesterol y ésteres de colesterol en las células tratadas con UA. Finalmente, el análisis bioenergético mediante Seahorse mostró que la deprivación de suero redujo el consumo

basal de oxígeno y la capacidad respiratoria máxima, mientras que el tratamiento con UA restauró parcialmente la respiración mitocondrial, alcanzando valores cercanos a los observados en células no deprivadas de suero. En conjunto, los resultados sugieren que la UA favorece el mantenimiento de la viabilidad de las células microgliales bajo condiciones de deprivación de suero/estrés metabólico, acompañándose de cambios en el metabolismo lipídico y una mejora en la función mitocondrial. La modulación del metabolismo microglial, así como de cambios en la expresión génica, podrían constituir algunos de los mecanismos mediante los cuales UA contribuye al mantenimiento de la homeostasis de las células microgliales.

Póster #59

Análisis proteómico identifica a ACSL4 como una proteína diferencialmente abundante en un modelo murino de MASLD suplementado con aceite de oliva

Santos Mellany[1], Sánchez Calvo Beatriz [2], Mastrogiovanni Mauricio[1,3], Leyva Alejando[4], Durán Rosario [4]

1.Facultad de Medicina, Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), 2. U.A departamento de nutrición básica, Escuela de nutrición 3.Facultad de Medicina, Programa de Alimentos y Salud (PAyS), 4. Instituto, Pasteur Unidad mixta de Bioquímica y Proteómica Analíticas.

La enfermedad hepática esteatósica asociada a disfunción metabólica (MASLD), anteriormente denominada enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA), constituye una de las enfermedades hepáticas crónicas más prevalentes a nivel mundial y representa un importante problema de salud pública. Diversos estudios han demostrado que la suplementación con aceite de oliva ejerce efectos beneficiosos sobre la enfermedad; sin embargo, los mecanismos moleculares responsables de esta protección aún no se encuentran completamente dilucidados. En este contexto, el objetivo del presente trabajo fue identificar proteínas y vías de señalización potencialmente involucradas en los efectos protectores del aceite de oliva mediante un enfoque proteómico en un modelo murino de MASLD. Se emplearon ratones C57BL/6J alimentados durante 18 semanas con dieta normal (ND) o dieta rica en grasas (HF), suplementadas con aceite de oliva virgen extra (AOVE) o aceite de girasol alto oleico (HOSO), en combinación con agua suplementada o no con nitritos. Durante el tratamiento se registraron semanalmente el peso corporal y la ingesta de alimento. Finalizado el protocolo experimental, se obtuvieron muestras de hígado para su procesamiento mediante proteómica basada en cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS). Los animales alimentados con dieta rica en grasas presentaron un incremento progresivo del peso corporal respecto al grupo control. Sin embargo, las diferencias observadas entre las intervenciones dietarias no permitieron explicar por sí solas los mecanismos asociados al posible efecto protector del aceite de oliva. En contraste, el análisis proteómico reveló cambios relevantes en la expresión de proteínas

involucradas en el metabolismo hepático. Entre los principales hallazgos, se identificó a la acyl-CoA synthetase long-chain family member 4 (ACSL4) como una proteína diferencialmente abundante. ACSL4 fue detectada en todas las muestras del grupo HF, mientras que no se detectó en los grupos ND y HF+AOVE; en el grupo HF+HOSO presentó una menor abundancia y fue identificada únicamente en parte de las muestras analizadas. En conjunto, estos resultados indican que, aun en ausencia de diferencias fenotípicas marcadas entre las intervenciones dietarias, el análisis proteómico permitió identificar modificaciones moleculares relevantes asociadas al metabolismo lipídico hepático. La regulación diferencial de ACSL4 la posiciona como una proteína candidata de interés para profundizar en los mecanismos mediante los cuales el aceite de oliva podría ejercer efectos protectores sobre la progresión de MASLD.

Póster #60

Extractos de plantas alimenticias como moduladores de la lipotoxicidad y lipoperoxidación en hepatocitos

Aliana Etcheverry[1,2], Marcelo Comini[1], Natalia Oddone[1]

[1] Laboratorio de Biología Redox de Tripanosomas, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay.
[2] Programa en Alimentos y Salud Humana (PAyS), Centro de Investigaciones Biológicas (CEINBIO), Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

La enfermedad de hígado graso es una patología de incidencia creciente que puede progresar desde esteatosis a fibrosis, cirrosis y carcinoma hepatocelular. Su desarrollo está estrechamente asociado a la acumulación de lípidos, el estrés oxidativo y la lipoperoxidación en hepatocitos. Aunque los cambios en el estilo de vida constituyen una intervención fundamental, las opciones terapéuticas siguen siendo limitadas, especialmente en estadios avanzados, lo que impulsa la búsqueda de nuevas estrategias hepatoprotectoras. En este contexto, las plantas alimenticias representan una fuente de compuestos bioactivos con potencial antioxidante e hipolipemiante. El objetivo de este trabajo es identificar extractos provenientes de plantas alimenticias capaces de proteger a los hepatocitos frente al daño inducido por una sobrecarga de ácidos grasos y caracterizar los mecanismos celulares asociados a este efecto. Para ello, se estableció un modelo in vitro en células HepG2 expuestas a ácidos grasos y se realizaron cribados de extractos hidroalcohólicos y diclorometánicos provenientes de distintas plantas alimenticias. Entre los candidatos evaluados, los extractos hidroalcohólicos de *Tessaria integrifolia* y *Stevia rebaudiana* mostraron los efectos más destacados, alcanzando hasta un 30 % de protección frente a la citotoxicidad inducida por ácidos grasos. Asimismo, estos extractos disminuyeron la lipoperoxidación en los hepatocitos. Para evaluar este proceso se emplean células HepG2 que expresan un biosensor fluorescente de lipoperóxidos dirigido a mitocondrias. Esta localización resulta especialmente relevante en el contexto de la

sobrecarga lipídica, ya que el aumento del aporte de ácidos grasos incrementa la demanda de β-oxidación mitocondrial, favoreciendo la generación de especies reactivas del oxígeno capaces de promover la peroxidación de lípidos. Como ensayos complementarios, se está evaluando el efecto de los extractos seleccionados sobre la acumulación de gotas lipídicas, así como sobre la actividad y la morfología mitocondrial. En conjunto, estos resultados identifican extractos hidroalcohólicos de *T. integrifolia* y *S. rebaudiana* con capacidad de atenuar tanto la citotoxicidad como la lipoperoxidación inducida por ácidos grasos, y permiten avanzar en la caracterización de sus posibles mecanismos hepatoprotectores. Estos estudios contribuirán a priorizar candidatos derivados de plantas alimenticias para una caracterización Pósterior y a explorar su potencial como fuente de compuestos bioactivos frente a alteraciones asociadas a la enfermedad de hígado graso.

Póster #61

Biosíntesis de salidrosi de en *Physcomitrium patens* mediante métodos de ingeniería metabólica

Álvarez-De León J.[1*], Diaz-Garrido ME.[1*], Gaggero-Villegas B.[1*], González-Gutierrez AC.[1*], Silva-Galluzzo E[1*], Fleitas AL.[1], Ruibal C.[1]

Universidad de la República, Facultad de Ciencias, Instituto de Química Biológica, Laboratorio de Biología Molecular Vegetal. * Los autores aparecen en orden alfabético y participaron de este trabajo por igual.

El salidroside es un compuesto polifenólico natural perteneciente a la clase de los glucósidos de tirosol, identificado principalmente en la planta *Rhodiola rosea* L. (conocida comúnmente como “raíz dorada”). Diversos estudios farmacológicos han demostrado que posee una amplia gama de propiedades biológicas, destacando sus efectos antioxidantes, antiinflamatorios, neuroprotectores, cardioprotectores, antienvejecimiento. A pesar de su potencial terapéutico, su disponibilidad comercial actual depende de un exhaustivo y costoso proceso de purificación a partir de su fuente natural, lo que representa un cuello de botella para su desarrollo clínico. Como antecedente a este trabajo, estudios del metaboloma del musgo *Physcomitrium patens* revelaron que esta planta modelo es capaz de acumular salidroside tanto en condiciones normales de crecimiento como bajo estrés lumínico. Basados en este hallazgo, nuestra hipótesis postula que la sobreexpresión heteróloga de los genes biosintéticos de *R. rosea* en *P. patens* permitirá incrementar el contenido de este metabolito. Para evaluar esta hipótesis, se diseñó una estrategia de sobreexpresión en tándem de dos genes clave de la vía biosintética: *RrHPAAS* y *RrT8GT*. La construcción génica correspondiente se introdujo mediante transformación en protoplastos de *P. patens*, dirigida al locus 108 para su integración genómica por recombinación homóloga. Actualmente, se están evaluando las colonias regeneradas para identificar aquellas que hayan integrado la construcción y expresen correctamente ambas

enzimas. Las líneas transgénicas seleccionadas serán utilizadas en el corto plazo para cuantificar el contenido de salidroside y validar el éxito del sistema.

Póster #62

Diálogo estroma-epitelio en la infección por *Trypanosoma cruzi*: modelado en organoides intestinales murinos

Hellen Daghero[1], Romina Pagotto[1], Andrea Medeiros[2], Marcelo Comini[2], Mariela Bollati-Fogolin[1]

[1]Unidad de Biología Celular (UBC), Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay. [2]Laboratorio de Bioquímica Redox de Tripanosomátidos (LBRT), Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay.

La enfermedad de Chagas presenta diferentes manifestaciones clínicas en su etapa crónica. Una de ellas es el síndrome de megacolon, que afecta la función del colon, donde *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) puede persistir y volverse resistente al tratamiento. Comprender su fisiopatología a nivel colónico es clave para desarrollar terapias efectivas. Las tecnologías de células madre permiten recrear *in vitro* la arquitectura y función de órganos específicos, reduciendo la experimentación animal. Los organoides intestinales son estructuras tridimensionales originadas de células madre intestinales que imitan la estructura de dominio-cripta y funcionalidad del tejido, conservando los distintos tipos celulares del intestino. Con el objetivo de modelar la interacción hospedador-patógeno, desarrollamos las condiciones para generar e infectar organoides murinos con *T. cruzi.* En el modelo 3D, la susceptibilidad de los colonoides resultó cepa-dependiente: Dm28c indujo mayor carga parasitaria por organoide y por célula que las cepas Colombiana y CL Brener, en concordancia con la capacidad proliferativa reportada para cada cepa. Al comparar segmentos intestinales, los organoides de colon mostraron una tasa de infección significativamente mayor que los de intestino delgado, confirmando al colon como sitio preferencial de infección. Independientemente del formato de cultivo (3D o 2D) o la MOI empleada, el parásito prefirió invadir y multiplicarse en un subconjunto limitado de células intestinales, sugiriendo que la arquitectura y polaridad del epitelio de organoides limita la infección respecto a monocapas convencionales. Para incorporar el componente estromal, establecimos co-cultivos de células epiteliales derivadas de colonoides con fibroblastos murinos (NIH-3T3) empleando *transwells*, y evaluamos el efecto de la diferenciación epitelial sobre la infección y la integridad de barrera. Tanto la presencia de fibroblastos como el medio de diferenciación incrementaron la resistencia eléctrica transepitelial, la expresión de ZO-1 y la proporción de células caliciformes (WGA+). Respecto a la infección con *T. cruzi*, el epitelio no diferenciado presentó un porcentaje de células infectadas significativamente mayor que el diferenciado, sin diferencias en la carga parasitaria por célula. Esto indica que el grado de diferenciación epitelial modula la susceptibilidad inicial a la infección más que la replicación parasitaria. Actualmente estamos evaluando la infección del componente estromal, su efecto sobre el epitelio y la integración de células de músculo liso al sistema. En conjunto, estos resultados posicionan al modelo de co-cultivo de monocapas derivadas de organoides y

células estromales como una plataforma valiosa para estudiar el diálogo estroma-epitelio durante la infección por *T. cruzi*.

Póster #63

Influencia del estado oligomérico de la citosina desaminasa en las propiedades de nanoinmovilizados en sílica biomimética

Lucía Patrón[1], Marcos Orduña[2], Valeria Grazu[2],Margot Paulino[3], Cecilia Ortiz[1], Lorena Betancor[1]

1 Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ingeniería, Universidad ORT Uruguay. 2 Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón (INMA, CSIC-UNIZAR) Zaragoza-España. 3 Área Bioinformática, DETEMA, Facultad de Química, UDELAR, Uruguay.

La citosina desaminasa bacteriana (bCD) cataliza la conversión de citosina en uracilo y puede transformar el profármaco 5-fluorocitosina en el agente antitumoral 5-fluorouracilo, lo que le confiere interés biotecnológico y terapéutico. [1] Al igual que otros biocatalizadores, su uso integrado en nanomateriales podría conferir mejoras en su estabilidad y facilitar su aplicación. Por otra parte, nuestros resultados demostraron que bCD presenta un equilibrio dinámico entre diferentes estados oligoméricos que podrían influir en la formación y el desempeño de nanobiocatalizadores. En este trabajo evaluamos el atrapamiento de diferentes formas cuaternarias de bCD recombinante en nanopartículas de sílica biomimética, un tipo de material que ha resultado estabilizante en la inmovilización de otras enzimas. El análisis por cromatografía de exclusión molecular y dispersión dinámica de luz (DLS) demostró que muestras de bCD (30mg/mL) contenían formas hexaméricas, triméricas y diméricas. Las poblaciones oligoméricas se incorporaron a una matriz de sílica mediante síntesis acuosa de una sola etapa con polietilenimina, fosfato de sodio y ácido silíceo. Los nanohíbridos se funcionalizaron con maltosa para mejorar su estabilidad coloidal y se caracterizaron mediante DLS, potencial zeta y microscopía electrónica. Además, se determinó el rendimiento de inmovilización, actividad expresada, actividad específica y estabilidad térmica. Las tres formas presentaron rendimientos de inmovilización superiores al 90%, aunque su desempeño catalítico fue marcadamente diferente. La actividad expresada fue 16,6 ± 1,2%, 19,0 ± 0,3% y 133 ± 13% para los nanohíbridos obtenidos con hexámero, trímero y dímero, respectivamente, evidenciando hiperactivación en la preparación dimérica. Por otro lado, al normalizar por la masa estimada de proteína activa inmovilizada, el trímero alcanzó la mayor actividad específica (117,8 ± 5,4 U/mg), frente a 6,45 ± 0,01 U/mg para el dímero y 1,26 ± 0,50 U/mg para el hexámero. El tamaño hidrodinámico y la morfología también dependieron de la especie oligomérica, con poblaciones de 50 nm para el trímero, 125 nm para el dímero y 530 nm para el hexámero y potenciales zeta positivos para todas las formas oligoméricas (25 a + 5 mV). Estos resultados demuestran que la estructura oligomérica de bCD condiciona tanto la formación como el rendimiento funcional de inmovilizados en nanopartículas de sílica biomimética.

Póster #64

Descifrando Interacciones Fármacos-ADN: El uso de pinzas ópticas para caracterizar procesos de intercalación y compactación

María Gabriela Villamizar-Sarmiento[1], Rodrigo Rivera[2], Ignacio Moreno-Villoslada[3], Felipe Oyarzún-Ampuero[4], Mauricio Báez[2]

[1]Escuela de Química y Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad San Sebastián, Concepción, Chile. [2]Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Santiago, Chile. [3]Instituto de Ciencias Químicas, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia, Chile. [4]Departamento de Ciencias y Tecnología Farmacéuticas, Universidad de Chile, Santiago, Chile

El estudio de las interacciones entre fármacos y ADN ha cobrado gran relevancia en diferentes áreas de las ciencias naturales y médicas, ya que estas determinan tanto los efectos terapéuticos como los posibles efectos adversos de numerosos compuestos bioactivos. En particular, la caracterización de los mecanismos de unión de fármacos aromáticos al ADN permite comprender cómo estas moléculas modifican sus propiedades estructurales y mecánicas, aportando información fundamental para el diseño racional de nuevas estrategias terapéuticas. En este contexto, el conocimiento de estas interacciones también resulta de interés para el desarrollo de sistemas de administración de fármacos, donde el ADN puede emplearse como una alternativa biodegradable y biocompatible a los polímeros aromáticos sintéticos utilizados en la formulación de nanovehículos poliméricos (NVPs). En esta investigación utilizamos ácido desoxirribonucleico (ADN) como una alternativa biodegradable y propranolol como fármaco hidrofílico aromático de bajo peso molecular. Se realizaron experimentos de estiramiento de moléculas individuales mediante pinzas ópticas para explorar las interacciones entre ambos componentes, siguiendo los cambios en las propiedades mecánicas del ADN en función de la concentración del fármaco. Los resultados mostraron un comportamiento dual del ADN dependiente de la concentración de propranolol. A bajas concentraciones (< 4 mM) se evidenció una unión por intercalación, respaldada por el aumento de la distancia extremo a extremo (o longitud de contorno aparente) y el incremento de la fuerza de fusión, característicos de los agentes intercalantes. De manera interesante, a concentraciones más altas (> 4 mM) se observó una compactación del ADN. Este comportamiento sugiere que la compactación comienza a desempeñar un papel significativo solo después de la saturación del ADN, que para el propranolol ocurre a una concentración crítica (Ct ≥ 4 mM). Estos resultados demuestran que las pinzas ópticas constituyen una herramienta sensible para caracterizar las interacciones fármaco-ADN a nivel de molécula individual y evidencian un mecanismo de unión dependiente de la concentración. Planteamos la hipótesis de que este comportamiento dual (intercalación y compactación) podría favorecer la formación de nanovehículos poliméricos basados en ADN en futuros experimentos a granel, aportando una plataforma biodegradable para el desarrollo de sistemas de liberación controlada de fármacos.

Póster #65

Desarrollo de modelos celulares aplicados al análisis genómico, transcriptómico y proteómico de enfermedades genéticas humanas

Zoe Campagna[1], Natalia Ibáñez[2], Camila Simoes[3], Víctor Raggio[4], Alejandro Ferreiro[2], José L. Badano[1], Lucía Spangenberg[3], Magdalena Cárdenas-Rodriguez[1]

[1] Laboratorio de Genética Molecular Humana, Institut Pasteur de Montevideo. [2] Unidad Académica de Nefrología, Hospital de Clínicas-UdelaR.[3] Unidad de Bioinformática, Institut Pasteur de Montevideo. [4] Departamento de Genética, Facultad de Medicina-UdelaR.

El advenimiento de las tecnologías de secuenciación masiva ha transformado el abordaje diagnóstico de las enfermedades genéticas humanas. No obstante, la adopción de estas tecnologías ha incrementado sustancialmente el número de variantes identificadas. Como resultado, el desafío se ha desplazado hacia la interpretación clínica de los hallazgos genéticos, especialmente cuando se identifican variantes raras, novedosas o de significado incierto, para las cuales la evidencia disponible es limitada o contradictoria. En este contexto, los modelos celulares humanos derivados de pacientes constituyen una herramienta relevante para vincular los hallazgos genómicos con consecuencias celulares y moleculares observables. Este trabajo propone desarrollar cultivos primarios humanos para complementar estudios ómicos, con énfasis en nefropatías hereditarias y enfermedades raras de causa genética desconocida. Uno de sus ejes es la generación de nefro-esferoides a partir de células epiteliales renales derivadas de orina humana (URECs), una fuente no invasiva y representativa del epitelio renal. El objetivo es establecer un modelo tridimensional que permita evaluar la organización epitelial, la polaridad y la ciliación, parámetros relevantes en enfermedades renales hereditarias, en las que alteraciones de estas características pueden asociarse a variantes genéticas de interés clínico. Inicialmente, se trabajó con URECs de donantes sanos y con líneas renales de referencia, IMCD3 y HK-2, para optimizar condiciones de cultivo tridimensional, interpretar la morfología de los esferoides y seleccionar marcadores estructurales, apicales, basales y ciliares mediante inmunofluorescencia. Esta caracterización generará una referencia para comparar posteriormente con lo observado en nefro-esferoides derivados de pacientes con nefropatías hereditarias y variantes de patogenicidad incierta identificadas mediante secuenciación de exoma completo. Los resultados orientarán el análisis funcional de cada caso, definiendo ensayos o marcadores adicionales según las variantes o procesos celulares implicados. Actualmente se está trabajando en el aislamiento de URECs de pacientes. En paralelo, se establecieron cultivos primarios de fibroblastos humanos derivados de biopsias de piel de pacientes con enfermedades genéticas raras. Estos constituyen una fuente robusta y reproducible de ARN de buena calidad, útil para análisis transcriptómicos de enfermedades de base molecular

desconocida. A partir de estos cultivos se obtuvo ARN para secuenciación y comparación con una base de referencia, buscando identificar alteraciones de expresión o splicing que orienten la priorización de variantes. Además, se proyecta obtener material proteico para análisis proteómicos. En conjunto, este proyecto busca consolidar modelos celulares humanos que permitan integrar evidencia ómica, fenotípica y funcional, facilitando la interpretación de variantes genéticas y el estudio de mecanismos celulares asociados a enfermedades humanas.

Póster #66

Participación de proteínas disulfuro isomerasas de superficie celular en la entrada del virus de la leucemia bovina

Benitez Agustina[1], Olivero-Deibe Natalia[2], Rodriguez Azalia[3], Abreu Cecilia[1]

[1]Programa de Tecnología Molecular, Celular y Animal, Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay. [2] Laboratorio de Inmunovirología, Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay. [3] Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica, Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay.

Las proteínas disulfuro isomerasas (PDI) pertenecen a la superfamilia de las tiorredoxinas y catalizan la oxidación, reducción e isomerización de enlaces disulfuro, además de actuar como chaperonas moleculares. Si bien se localizan principalmente en el retículo endoplásmico, algunas PDI, entre ellas PDIA1 y PDIA3, también se encuentran asociadas a la superficie celular, donde participan en diversos procesos fisiológicos y patológicos. En particular, estas proteínas han sido involucradas en la entrada de distintos virus, catalizando la reorganización de enlaces disulfuro en proteínas virales o celulares y promoviendo cambios conformacionales necesarios para la interacción virus-célula y la fusión de membranas. El virus de la leucemia bovina (VLB) es un deltaretrovirus oncogénico que infecta linfocitos B del ganado bovino. A pesar de su relevancia sanitaria y productiva, los mecanismos moleculares involucrados en las etapas tempranas de su infección aún no se comprenden completamente. En este contexto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la participación de PDIA1 y PDIA3 asociadas a la superficie celular en la entrada del VLB. Para ello, se evaluó el efecto de inhibidores químicos y anticuerpos específicos de estas PDIs sobre la infección viral. El tratamiento con DTNB, un inhibidor general del intercambio tiol/disulfuro, produjo una marcada disminución de la entrada viral. Asimismo, el bloqueo de PDIA3 mediante anticuerpos específicos redujo significativamente la infección, mientras que anticuerpos dirigidos contra PDIA1 no mostraron un efecto inhibitorio detectable. El tratamiento con nitazoxanida, un inhibidor reportado de PDIA3, produjo una inhibición parcial de la infección viral. Estos resultados sugieren una participación de procesos redox mediados por PDIA3 durante la entrada del VLB. Con el objetivo de profundizar en la participación de PDIA3, se generó una línea celular estable que sobreexpresa esta proteína. Actualmente, su caracterización se

encuentra en curso, así como la evaluación del impacto de la sobreexpresión de PDIA3 sobre la infección por VLB. En conjunto, estos resultados sugieren que PDIA3 asociada a la superficie celular podría participar en etapas tempranas de la infección por VLB y aportan evidencia sobre la relevancia de los mecanismos de intercambio tiol/disulfuro en este proceso.

Póster #67

Detección molecular de helmintos como una estrategia para el monitoreo de agentes zoonóticos

Daiana Dutra, Gabriela Maggioli, Estela Castillo

Laboratorio de Biología Parasitaria, Departamento de Biología Celular del Instituto de Biología, Instituto de Higiene-Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

En Uruguay existen áreas de alta diversidad ambiental donde la convivencia entre fauna silvestre, animales domésticos y personas es frecuente, generando escenarios de interés tanto ecológico como sanitario. Si bien la biodiversidad de vertebrados ha sido parcialmente estudiada, los parásitos (en particular platelmintos y nematodos) siguen siendo poco conocidos, a pesar de su relevancia ecológica y su potencial zoonótico.
La parasitología ambiental permite evaluar la salud de los ecosistemas y anticipar riesgos sanitarios, especialmente en zonas con presencia humana constante. Sin embargo, los métodos clásicos de identificación de helmintos requieren la captura y el sacrificio de los hospedadores, lo que limita su aplicación en áreas protegidas. En este contexto, el uso de ADN ambiental (ADNa) junto con secuenciación masiva constituye una alternativa no invasiva y altamente sensible para el monitoreo de parásitos, ya que permite detectar huevos y larvas liberados al ambiente a partir de muestras de suelo o heces. Asimismo, es posible emplear sueros disponibles de potenciales hospedadores. El laboratorio cuenta con una serie de cebadores capaces de reconocer distintos phyla o clases, los cuales pueden utilizarse para la detección de platelmintos y nematodos tanto en muestras ambientales como en sueros.
En esta primera etapa se optimizaron las condiciones de PCR a tiempo final para dichos cebadores. Actualmente se están procesando muestras de suelo provenientes de un proyecto previo, con el objetivo de purificar los amplicones obtenidos para su posterior secuenciación y análisis primario de las secuencias. En una etapa posterior se realizará la extracción de ADN a partir de heces y suero de diferentes hospedadores (rumiantes, perros, gatos), aplicando los cebadores optimizados para la detección de helmintos. Los resultados preliminares muestran el reconocimiento específico de la mayoría de los cebadores diseñados bajo el protocolo optimizado, validando su potencial para el monitoreo no invasivo de parásitos en estos ambientes. Los trabajos posteriores se encuentran actualmente en curso. Esta aproximación metodológica sienta las bases para el desarrollo de una herramienta de monitoreo parasitológico ambiental, con aplicaciones en salud pública, sanidad animal y conservación de la biodiversidad en zonas de alta interfase entre fauna silvestre, animales domésticos y humanos.

Póster #68

Atenuación del virus Mayaro mediante recodificación sinónima: la evolución como aliada frente a una arbovirosis emergente

Irene Ferreiro[1,2], Álvaro Fajardo[1,2], Diego Simón[1,2], Mercedes Paz[1,2], Joaquín Hurtado[1,2], Paula Perbolianachis[1,2], Juan Gandioli[1,2], Pilar Moreno[1,2,3] y Gonzalo Moratorio[1,2,3]

[1] Laboratorio de Evolución Experimental de Virus, Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay [2] Laboratorio de Virología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay [3] Centro de Innovación en Vigilancia Epidemiológica, Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay

El virus Mayaro (MAYV) es un alfavirus emergente causante de un síndrome tipo dengue y artralgias prolongadas, que circula en Sudamérica y presenta potencial de transmisión urbana por el mosquito *Aedes aegypti*. En 2019, la OPS emitió una alerta sobre este virus; sin embargo, la atención sanitaria se desvió Pósteriormente hacia la pandemia de COVID-19, relegando su vigilancia. Esta situación muestra la necesidad de diseñar estrategias preventivas que permitan anticipar y controlar futuros brotes. A diferencia de los arbovirus, los virus específicos de mosquitos presentan genomas con altas frecuencias relativas del dinucleótido CpG. Diversos estudios sugieren que incrementar esta frecuencia puede potenciar la respuesta inmune en hospedadores vertebrados. En este trabajo utilizamos biología sintética e ingeniería genética para incrementar la frecuencia de CpGs en el genoma de MAYV mediante recodificación sinónima, con el fin de generar variantes atenuadas con potencial vacunal frente a esta arbovirosis emergente. Se generaron tres mutantes con diferentes frecuencias de CpGs en: (1) toda la secuencia codificante, (2) exclusivamente la región no estructural y (3) solamente la región estructural. Estudios de cinética de replicación revelaron que estas mutaciones sinónimas generaron un fenotipo atenuado en células de mamífero inmunocompetentes, pero no en células de mosquito. Los mutantes presentaron una infectividad específica similar a la del virus *wild-type*, descartando artefactos de replicación. Además, se confirmó por secuenciación que las modificaciones introducidas se mantuvieron tras 10 infecciones seriadas, demostrando su estabilidad genética. Como control de recodificación, se generaron mutantes equivalentes enriquecidos en UpA, otro dinucleótido subrepresentado cuya baja frecuencia no se asocia al reconocimiento por la inmunidad innata. Estos mutantes no mostraron diferencias de replicación respecto al virus *wild-type*, respaldando la especificidad del efecto de los CpGs. Estudios *in vivo* mostraron una atenuación significativa en órganos de ratones BALB/cJ, pero no en mosquitos *Aedes aegypti*. Se realizarán más ensayos en ratones, incluyendo desafíos con ratones preinmunizados. Nuestros mutantes de MAYV enriquecidos con CpGs constituyen una estrategia prometedora de preparación frente a esta amenaza viral emergente. Este enfoque de atenuación podría aplicarse a otros arbovirus, contribuyendo al desarrollo anticipado de herramientas vacunales para controlar futuras enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes.

Póster #69

Sobreexpresión de BFD1 y MYB como posibles moduladores de la diferenciación sexual en *Toxoplasma gondii*

Joaquin Rodriguez [1], María E. Francia [1, 2] y María Florencia Sena [1, 3]

[1] Laboratorio de Biología de Apicomplejos, Instituto Pasteur Montevideo, Uruguay,[2] Unidad Academica de Parasitología y Micología, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay,[3] Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Uruguay.

Toxoplasma gondii es un protozoo parásito intracelular obligado perteneciente al filo Apicomplexa. Se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y es capaz de infectar a prácticamente todos los animales de sangre caliente, incluidos los seres humanos. La diferenciación sexual de *Toxoplasma gondii* ocurre únicamente en el epitelio intestinal de felinos y constituye una etapa esencial para la transmisión y recombinación genética del parásito. A pesar de avances recientes en el estudio de los mecanismos de diferenciación en apicomplejos, los reguladores moleculares que controlan el compromiso hacia estadios sexuales en *T. gondii* permanecen poco caracterizados. Análisis por homología de secuencias han identificado que las proteínas TgME49_200385 (BFD1) y TgME49_275480 (MYB) presentan gran homología con cgd6_2250 de *Cryptosporidium parvum*, un regulador clave de la diferenciación sexual masculina, sugiriendo que podrían participar en redes regulatorias asociadas a la gametogénesis. El objetivo general de este trabajo fue evaluar qué rol tienen estas dos proteínas con dominios MYB en la diferenciación sexual de *T.gondii* mediante un enfoque de sobreexpresión. Se planteó específicamente: 1.generar vectores de sobreexpresión para BFD1 y MYB, 2.identificar la localización subcelular de ambas proteínas, y 3. Analizar la expresión relativa de genes marcadores de los diferentes estadios en *T. gondii*. Las secuencias codificantes de BFD1 y MYB fueron amplificadas por PCR, clonadas en el vector de sobreexpresión pTubYFP mediante ensamblado por Gibson, corroboradas por PCR y confirmadas por secuenciación. Pósteriormente, los vectores pTubBFD1YFP y pTubMYBYFP fueron transfectados por nucleofección en la cepa Pru ΔMORC. A las 48 h postransfección, se observó por microscopía de fluorescencia, señal de YFP en los parásitos transfectados con ambas construcciones, indicando la expresión exitosa de ambas proteínas. El análisis por inmunofluorescencia indirecta mostró que tanto BFD1 como MYB presentan una distribución predominantemente citoplasmática en taquizoítos. La localización observada fue claramente diferente al control positivo, donde se usó a la proteína ACP, localizada en el apicoplasto. En cuanto a los resultados de análisis de expresión génica por qPCR se observó que los marcadores de genes de estadios pre-sexuales y sexuales en parásitos sobreexpresantes aumentaron en comparación con parásitos transfectados con el control ACP. Estos resultados apoyan la hipótesis de que BFD1 y MYB podrían desempeñar un rol regulador en la diferenciación sexual de *Toxoplasma gondii*, sugiriendo que la

presencia de dominios MYB de unión al ADN podrían mediar un rol de estas proteínas como factores implicados en modulación de la expresión génica de este parásito.

Póster #70

Diagnóstico y caracterización genómica de los principales virus inmunosupresores aviares en Uruguay

Lara Fagúndez[1], Claudia Techera[1], Gonzalo Tomás[1], Ana Marandino[1], Joaquín Williman[1], Diego Hernández[1], Rubén Pérez[1].

[1]Sección Genética Evolutiva, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Los virus de la enfermedad infecciosa de la bursa (IBDV) y de la anemia infecciosa aviar (CAV) son importantes agentes inmunosupresores que afectan la productividad y la eficacia de los programas sanitarios en la avicultura. En Uruguay se ha reportado la circulación de dos genotipos de IBDV (A1B1 y A4B1), mientras que para CAV se han identificado cepas pertenecientes a los clados II y III. En Argentina y Brasil circulan además variantes de IBDV similares y diferentes a las detectadas en Uruguay, cuyo eventual ingreso podría modificar la situación epidemiológica nacional. La circulación simultánea de variantes con distintos orígenes genéticos incrementa el riesgo de eventos de recombinación o reordenamientos en IBDV y de recombinación en CAV, lo que resalta la necesidad de una vigilancia molecular continua. El objetivo de este trabajo fue diagnosticar y caracterizar genómicamente ambos virus en muestras recolectadas en 2026 provenientes de establecimientos avícolas uruguayos. Se analizaron 20 muestras de bursa de aves parrilleras y ponedoras y se realizó el diagnóstico de IBDV y CAV mediante qPCR utilizando protocolos previamente desarrollados y publicados por nuestro laboratorio. Las muestras positivas para IBDV (n = 11) y CAV (n = 8) fueron caracterizadas genómicamente mediante una estrategia de enriquecimiento basada en multiplex PCR acoplada a secuenciación masiva (multiplex PCR–NGS), también desarrollada y publicada previamente por nuestro grupo, que permite obtener los genomas completos de ambos virus mediante dos rondas de PCR y secuenciación Illumina, sin el empleo de kits comerciales.

En IBDV se detectó exclusivamente el genotipo A1B1, sin evidencia de introducción de otros genotipos circulantes en la región. Además, se identificó una cepa recombinante entre una cepa clásica y la cepa vacunal atenuada D78. En CAV se detectó la co-circulación de los clados II y III, sin evidencia de recombinación, aunque se identificaron muestras con coinfección por ambos clados. Estos resultados aportan información actualizada sobre la epidemiología molecular de los principales virus inmunosupresores aviares en Uruguay y demuestran la utilidad de las metodologías desarrolladas por nuestro laboratorio para el diagnóstico y la vigilancia genómica. Su aplicación permitirá detectar variantes emergentes, monitorear la evolución viral y

generar evidencia que contribuya al fortalecimiento de los programas de control y vacunación en la industria avícola nacional.

Póster #71

Identificación de los factores parasitarios que permiten a *Toxoplasma gondii* la colonización de modelos *in vitro* derivados de placenta humana

Anza L.[1], B. De Faria Da Fonseca[2], M. Cosenza[3], F. Sena[1], V. Tekiel[3]; A.K. Bei[4], S. Gobaa[2], Maria E. Francia[1,5], P. Faral-Tello[1]

[1]Laboratory of Apicomplexan Biology, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay; [2]Biomaterials & Microfluidics core facility, Institut Pasteur Paris, France; [3]Laboratorio de Interacción Parásito – Hospedador, Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Escuela de Bio y Nanotecnologías, Universidad de San Martín - CONICET, Argentina; [4]Malaria Experimental Genetic Approaches & Vaccines Research Group, Pole Immunophysiopathologie et Maladies Infectieuses, Institut Pasteur Dakar / Yale School of Public Health; [5]Unidad Académica de Parasitología y Micología, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay.

La infección por *Toxoplasma gondii* puede transmitirse verticalmente en humanos, cuando el parásito atraviesa la placenta e infecta al feto durante la gestación. Aunque varios mecanismos han sido propuestos, el proceso molecular exacto que usa el parásito para atravesar la barrera de la placenta y alcanzar el feto permanece desconocido.
En este contexto, el objetivo del presente trabajo es estudiar los determinantes genéticos del parásito que son necesarios para la interacción con células placentarias. A través de un abordaje de pérdida de función, utilizando la tecnología CRISPR/Cas9, proponemos identificar los genes esenciales para la invasión, replicación y/o egreso del parásito usando diferentes modelos de células trofoblásticas placentarias incluyendo *trophoblast-spheroids* (TS) and *stem-cell-derived trophoblast placental organoids* (scTPOs).
En este trabajo, demostramos que los TS son altamente susceptibles a la infección y permisivos a la replicación del parásito; además, los parásitos cultivados en modelos tridimensionales (3D) se replican más rápidamente que aquellos cultivados en modelos bidimensionales (2D). A su vez, generamos scTPOs, un modelo placentario *in vitro* que reproduce de forma más realista la fisiología de la placenta e integra la complejidad de su arquitectura 3D y la diversidad de los tipos celulares que la componen. La presencia de los diferentes subtipos celulares en nuestro modelo, citotrofoblasto, sinciciotrofoblasto y trofoblasto extravelloso, que reproducen *in vitro* la microarquitectura de la placenta, fue corroborada mediante ensayos de inmunofluorescencia. Los perfiles de expresión génica específicos de la placenta fueron evaluados mediante qRT-PCR. Adicionalmente, la producción hormonal *in vitro* fue corroborada mediante el resultado positivo de tests de embarazo. Una vez optimizados los modelos *in vitro* de placenta, procedimos a transfectar

una librería de RNA guías dirigida contra todos los genes nucleares codificantes de proteínas del genoma de *T. gondii*. Para ello, empleamos dos cepas distintas: una cepa RH que expresa de forma inducible la nucleasa Cas9 y una cepa ME49 que expresa Cas9 de forma constitutiva. En trabajos futuros, la combinación de estas herramientas permitirá identificar los genes del parásito que son esenciales para la interacción entre *T. gondii* y la placenta.

Póster #72

Evaluación de la Eficacia Traduccional e Inmunogenicidad de Candidatos Vacunales de circARN Frente a ARNm Lineal Contra el Virus Mayaro

Manuela Cardoso[1,2,3], Alicia Costábile[1,2,3,4], Mariano Dellarole[5], Pilar Moreno[1,2,3], Gonzalo Moratorio[1,2,3]

1: Laboratorio de Virología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. 2: Centro de Innovación en Vigilancia Epidemiológica, Institut Pasteur de Montevideo. 3: Laboratorio de Evolución Experimental de Virus, Institut Pasteur de Montevideo. 4: Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. 5: Centro de Investigaciones en Bionanociencias, CONICET.

El virus de Mayaro (MAYV) es un arbovirus transmitido por mosquitos del género *Aedes*, con casos en humanos reportados sobre todo en regiones tropicales del norte de Sudamérica. Se trata de un virus emergente cuya infección produce un cuadro clínico similar al de otras arbovirosis, como la producida por el virus chikungunya, caracterizado por fiebre, dolor articular persistente, fatiga y malestar general. Aunque presenta un riesgo sanitario significativo, sigue siendo subdiagnosticado y desatendido, convirtiéndolo en un virus con un potencial epidémico latente. Actualmente no existen tratamientos específicos ni vacunas aprobadas para prevenir la infección por MAYV, lo que, sumado a la reciente aparición en Uruguay de casos autóctonos de arbovirus relacionados como el chikungunya, resalta la importancia de desarrollar métodos de detección eficientes y un prototipo de vacuna eficaz. Las tecnologías basadas en ARN han revolucionado el campo de las vacunas gracias a su seguridad, capacidad de generar respuestas inmunitarias robustas y rapidez de diseño. En este escenario, las vacunas de ARN circular (circARN) surgen como una alternativa de nueva generación muy prometedora ante el ARNm. Debido a su estructura covalentemente cerrada, el circRNA presenta resistencia a la degradación por exonucleasas, lo que se traduce en una mayor estabilidad *in vivo* y una expresión del antígeno más prolongada. En dicho contexto, este proyecto se enfoca en el desarrollo y evaluación de una plataforma vacunal basada en circARN optimizada contra el virus Mayaro. En este trabajo abordamos el diseño de los constructos para la generación *in vitro* de circRNA mediante el sistema de auto-empalme en los intrones del grupo I. El diseño incluye elementos estructurales clave, como una región de entrada interna al ribosoma (IRES) para dirigir la traducción en ausencia del CAP en el extremo 5', UTRs seleccionadas para maximizar la eficiencia de traducción, y la secuencia codificante

del antígeno de MAYV optimizada para su expresión en ratones y en humanos. Actualmente, el trabajo se encuentra centrado en la fase de clonado y ensamblaje molecular de estos constructos. Una vez finalizada la etapa de ensamblaje y verificación de los constructos de circARN, las siguientes fases del proyecto contemplan la formulación y encapsulación en LNPs, y la comparación de la eficiencia traduccional e inmunogenicidad de cada diseño respecto a su análogo de ARNm lineal.

Póster #73

Delivery sistémico de virus oncolíticos utilizando nanopartículas tumor-específicas

Manuela Machado da Silva[1,3,4], Alicia Costábile[1,2,3,5], Pilar Moreno[1,2,3,4], Gonzalo Moratorio[1,2,3,4]

1: Laboratorio de Virología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. 2: Centro de Innovación en Vigilancia Epidemiológica, Institut Pasteur de Montevideo. 3: Laboratorio de Evolución Experimental de Virus, Institut Pasteur de Montevideo. 4: Guska. 5: Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

El cáncer constituye la segunda causa de muerte a nivel mundial, lo que impulsa la búsqueda de terapias innovadoras. La viroterapia oncolítica surgió como una estrategia prometedora al emplear virus capaces de infectar y destruir selectivamente células tumorales. Sin embargo, su aplicación clínica ha estado limitada principalmente a la administración intratumoral, lo que limita el tratamiento de lesiones no accesibles. La administración sistémica, por vía intravenosa, representa una alternativa atractiva sin embargo, conlleva limitaciones importantes, como la generación de anticuerpos neutralizantes que reducen la eficacia viral. En este contexto, la nanotecnología ofrece oportunidades para mejorar la entrega de virus y ácidos nucleicos. Particularmente, las nanopartículas lipídicas (LNPs) han demostrado ser una plataforma versátil para la administración de ácidos nucleicos. A pesar de sus ventajas, aún persisten desafíos como la acumulación preferencial en el hígado, que limita su biodisponibilidad sistémica. Avances recientes permitieron redirigir las LNPs hacia tejidos extrahepáticos, incluyendo estrategias de focalización activa, como la conjugación con ligandos específicos. Entre ellos, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) constituye un blanco atractivo dada su sobreexpresión en múltiples tipos tumorales, contribuyendo directamente a la progresión tumoral. En este trabajo nos proponemos evaluar el potencial oncolítico de un enterovirus atenuado, cuyo material genético será encapsulado en LNPs conjugadas a EGFR. Para ello, se encapsulará el ARN viral en LNPs funcionalizadas con un anticuerpo anti-EGFR mediante conjugación química, y se evaluará su potencial oncolítico en líneas celulares de cáncer de pulmón con diferente expresión de EGFR, determinando la capacidad de producir partículas virales y viabilidad celular.

Pósteriormente, se desarrollarán modelos de xenoinjertos en ratones inmunocomprometidos con células de cáncer susceptibles para evaluar el delivery y la eficacia antitumoral in vivo. Se espera obtener una formulación que tenga tropismo preferencial por células cancerosas, capaz de reducir el crecimiento tumoral en lesiones no inyectables, aportando así una alternativa innovadora en viroterapia sistémica.

Póster #74

Hemoperoxidasa híbrida APx-CcP de *Trypanosoma cruzi* y detoxificación de peroxinitrito: influencia del ascorbato durante la infección a macrófagos.

Matilde Abboud[1,2], Rafael Radi[1,2], Lucía Piacenza[1,2]

[1]Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay [2]Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Trypanosoma cruzi, agente causal de la enfermedad de Chagas, es un parásito intracelular obligado perteneciente a la familia de los kinetoplastos, que puede invadir y proliferar dentro de las células de mamíferos. *T. cruzi* posee una amplio y complejo sistema antioxidante que le permite defenderse del ataque nitroxidativo en el fagosoma del macrófago, y así proliferar y establecer la infección en el huésped vertebrado. Entre las enzimas antioxidantes de *T. cruzi* hay una peroxidasa de ascorbato-citocromo c híbrida de tipo A que contiene hemo (APx-CcP) que puede utilizar tanto ascorbato como citocromo c como sustrato reductor. Estudios previos demostraron que la sobreexpresión de APx-CcP incrementa la infectividad del parásito tanto in vitro como in vivo. Con estos antecedentes, evaluamos y profundizamos en el papel de APx-CcP durante la infección de macrófagos inmunoestimulados (que expresan iNOS y por lo tanto generan peroxinitrito), así como evaluar el papel del contenido de ascorbato durante el proceso de infección. Este punto es importante sabiendo que la enzima se encuentra en la mitocondria y también en la membrana plasmática de los estadios infectivos (tripomastigotas y amastigotas), por lo que podría utilizar el ascorbato del hospedador como sustrato reductor. En este trabajo se evaluó el efecto de la presencia de ascorbato durante el proceso de infección a macrófagos por tripomastigotas salvajes y sobreexpresantes de APx-CcP. Estos resultados mostraron que el agregado de ascorbato, como sustrato reductor de la APx-CcP, parece conferirle al parásito mayor capacidad de detoxificación de oxidantes, y por lo tanto un mayor nivel de infección en comparación con la condición sin suplementación. Esto se cumple tanto para la cepa WT como para la sobreexpresante de APx-CcP, siendo esta última más resistente al peroxinitrito en infecciones a macrófagos en cualquiera de las condiciones, lo que indica que además el parásito podría estar utilizando su propio ascorbato ya que tiene capacidad de síntesis a diferencia de los macrófagos.

Póster #75

Evaluación del estrés oxidativo inducido por compuestos metálicos en tripanosomátidos

Pilar Terra[1,2], Rodrigo Moreira[2], Diego Benítez[1], Oliver Orban[3], Irina Ihnatenko[3], Conrad Kunick[3], Matthias Schiedel[3], Dinorah Gambino[2], Marcelo Comini[1], Gonzalo Scalese[1,2]

[1]Laboratorio de Biología Redox de Tripanosomas, Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay;[2]Área Química Inorgánica, Departamento Estrella Campos, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay;[3]Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie, and Zentrum für Pharmaverfahrenstechnik (PVZ), Technische Universität Braunschweig, Alemania

Los parásitos unicelulares de los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania* causan enfermedades severas y letales en humanos y ganado. Años de investigación en este campo nos han llevado a identificar a las paullonas como un andamio estructural privilegiado contra los tripanosomátidos, particularmente debido a su capacidad para inhibir la biosíntesis de tripanotión (una vía y un metabolito únicos y esenciales para estos parásitos). Los estudios de relación estructura-actividad sugieren que la sustitución en la posición N^5 es un determinante clave de esta actividad inhibidora selectiva. En este trabajo, se sintetizaron y caracterizaron hidrazonas derivadas de la 3-clorokenpaullona. Estos precursores contienen un bolsillo tridentado capaz de coordinar un centro metálico, en este caso, oxovanadio(V). Las condiciones de síntesis se optimizaron para lograr la pureza y el rendimiento adecuados, y la caracterización estructural se realizó mediante distintos métodos fisicoquímicos. Los derivados obtenidos se evaluaron frente a la forma infectiva de *Trypanosoma brucei* (tripomastigotas del torrente sanguíneo) y *Leishmania infantum* (amastigotas intracelulares) utilizando un ensayo basado en bioluminiscencia. Adicionalmente, se evaluó la toxicidad inespecífica utilizando modelos de macrófagos murinos y hepatocitos humanos HepG2. Con el fin de explorar el mecanismo de acción de estos compuestos, se estudió su efecto sobre el metabolismo redox utilizando líneas transgénicas de *Trypanosoma brucei* que expresan un biosensor redox-sensible.
La integración de los resultados biológicos, fisicoquímicos y de mecanismo de acción nos dió información acerca de los posibles determinantes estructurales de la bioactividad. Esta información guiará el diseño racional de nuevos compuestos metálicos dirigidos a esta vía metabólica específica de los tripanosomátidos.

Póster #76

Desarrollo de una metodología basada en ddPCR para la vigilancia ambiental de *Neospora caninum*

Echeverría, Soledad [1,2];Tatiana Hundewadt[1]; Laureana de Brun[3]; Robello, Carlos [1,4]; Cabrera, Andrés [1,5].

1 Laboratorio de Interacciones Hospedero-Patógeno, UBM, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay. 2 Instituto de Investigación Una Salud, UdelaR, Montevideo, Uruguay. 3 Departamento de Patobiología, Unidad de Microbiología y Enfermedades Infecciosas, Facultad de Veterinaria, UdelaR, Montevideo, Uruguay 4 Unidad Académica de Bioquímica, Facultad de Medicina, UdelaR, Montevideo, Uruguay. 5 Unidad Académica de Parasitología y Micología, Facultad de Medicina, UdelaR, Montevideo, Uruguay.

La neosporosis bovina, causada por *Neospora caninum*, constituye una de las principales causas de aborto infeccioso en bovinos a nivel mundial y genera importantes pérdidas económicas en los sistemas de producción de carne y leche. En Uruguay, la enfermedad se encuentra ampliamente distribuida, con una seroprevalencia aproximada del 22% en rodeos lecheros a nivel nacional. La investigación sobre *N. caninum* se ha centrado principalmente en la transmisión vertical, considerada el principal mecanismo de mantenimiento de la infección dentro de los rodeos. Sin embargo, numerosos estudios epidemiológicos indican que este mecanismo, por sí solo, no explica la persistencia de la enfermedad a nivel poblacional. En concordancia con esta evidencia, nuestro grupo obtuvo resultados preliminares en un estudio longitudinal realizado en un establecimiento comercial de recría en Uruguay, donde se observó un incremento de la seroprevalencia durante el período de recría, pasando de valores prácticamente nulos al ingreso hasta aproximadamente 16–22%, luego de 8 post ingreso. Estos resultados sugieren la ocurrencia de transmisión horizontal activa y ponen de manifiesto la existencia de fuentes ambientales de infección. Paradójicamente, aunque existe sólida evidencia epidemiológica de que la transmisión horizontal ocurre en condiciones naturales, la ecología ambiental de *N. caninum* permanece prácticamente inexplorada. Se han desarrollado numerosas técnicas moleculares para detectar el parásito en tejidos fetales, placenta, sangre y otras muestras biológicas. Sin embargo, aún no existen protocolos validados para su detección en matrices ambientales, como agua, suelo o alimentos destinados al ganado. Esta limitación impide responder preguntas epidemiológicas fundamentales y representa uno de los principales vacíos de conocimiento sobre la neosporosis bovina. En este contexto, el presente trabajo tiene como objetivo desarrollar una metodología basada en droplet digital PCR (ddPCR) para la detección de *N. caninum* en muestras ambientales, con el propósito de generar una herramienta que permita identificar potenciales fuentes de contaminación en los sistemas de producción bovina. Actualmente nos encontramos en las primeras etapas de desarrollo y optimización del método, evaluando su sensibilidad y especificidad para la detección del parásito en diferentes matrices ambientales.

Póster #77

Estudio comparativo de la expresión de proteínas de superficie en el pasaje taquizoíto a bradizoíto de *Neospora caninum* en cultivo celular in vitro en células Vero y MDBK

Tatiana Hundewadt[1],[1,2],Carlos Robello [1,3], Andrés Cabrera[1,4] Soledad Echeverria .

[1] Laboratorio de Interacciones Hospedero-Patógeno, UBM, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay.(thundewadt@pasteur.edu.uy) [2]Instituto de Investigaciones de Una Salud, UdelaR, Montevideo, Uruguay [4] Unidad Académica de Parasitología y Micología, Facultad de Medicina, UdelaR, Montevideo, Uruguay. [3] Unidad Académica de Bioquímica, Facultad de Medicina, UdelaR, Montevideo, Uruguay.

La neosporosis bovina, causada por el protozoario intracelular obligado *Neospora caninum*, es una causa primaria de fallas reproductivas, traduciéndose en una carga económica persistente debido a los abortos y la disminución de la eficiencia productiva, siendo de gran importancia en nuestro país, cuya matriz económica depende estrechamente de la exportación de productos cárnicos y lácteos. En el contexto uruguayo, se han documentado seroprevalencias por establecimiento que oscilan entre el 86,5% y el 96%, en ganado de carne y leche. Este parásito tiene un ciclo de vida heteroxeno, alternando entre sus hospederos definitivo (cánidos) e intermediario (herbívoros) a través de estadíos diferentes. Debido a que el proceso de diferenciación entre taquizoíto (fase de replicación rápida y daño tisular) y bradizoíto (fase de latencia y persistencia crónica) aún no se conoce por completo, este estudio busca optimizar las condiciones de cultivo in vitro para inducir la conversión de taquizoíto a bradizoíto en la cepa autóctona NcURU1 y de referencia internacional NcLiv. El empleo de la cepa autóctona NcURU1 es fundamental para estudiar lo que sucede en nuestro país y cómo la cepa autóctona se diferencia de la cepa de referencia. Para ello, se evaluaron métodos de estrés celular, incluyendo el uso de agentes como nitroprusiato de sodio en cultivos celulares de diferentes líneas celulares (Vero y MDBK), que favorecieran el cambio de estadío y poder así estudiar la diferencia de expresión de las proteínas de superficie marcadoras de estadío: NcSAG1 y NcSRS2 para taquizoítos; NcBAG1, NcBSR4 y NcSAG4 para bradizoítos. También se utilizó un marcador de lectinas de membrana de quistes. A través de Inmunofluorescencia indirecta (IFI), se observaron diferencias en el patrón de expresión de las proteínas estudiadas en ambas cepas de *N. caninum* y entre las condiciones estudiadas. En condiciones de estrés, hay una mayor expresión de BAG1. Se analizó mediante qPCR, la expresión de los genes *sag1*, *srs2*, *bag1*, *bsr4* y *sag4,* obteniéndose resultados que muestran un aumento en la expresión de los genes de las proteínas de superficie de bradizoítos.

Póster #78

Relación entre la intensidad de infestación por Haematobia irritans y el perfil hematológico del hospedador bovino.

Sarís, Verónica[1], Lapissonde Matías[1], Elerd, Erika[1]; Negrín, Florencia[1]; Rocha, Sergio[1,3]; Pastro, Lucía[2]; Breijo, Martín[1,3].

[1]Unidad de Reactivos y Biomodelos de Experimentación, Facultad de Medicina, UdelaR.[2] Unidad Académica de Genética, Facultad de Medicina UdelaR. [3] Centro de Producción de Animales de Experimentación, Udelar

Haematobia irritans constituye uno de los principales ectoparásitos del ganado bovino y ocasiona importantes pérdidas productivas a nivel mundial. Aunque numerosos estudios han analizado factores asociados a la susceptibilidad del hospedador, la relación entre la intensidad de infestación y los parámetros hematológicos permanece escasamente caracterizada. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la asociación entre la carga parasitaria de H. irritans y diferentes parámetros hematológicos en bovinos naturalmente infestados. El estudio se realizó utilizando la base de datos generada durante un ensayo de vacunación desarrollado entre octubre de 2025 y abril de 2026, en el que participaron 28 bovinos. La carga parasitaria se estimó mediante conteos seriados de moscas realizados durante todo el período experimental y se calculó la carga promedio individual. Al finalizar el ensayo se obtuvieron muestras sanguíneas para determinar hematocrito, concentración de hemoglobina, número de eritrocitos y plaquetas. Las asociaciones entre variables se evaluaron mediante correlaciones de Spearman ($p < 0,05$). Dado que el tamaño corporal había mostrado una fuerte asociación con la carga parasitaria, también se analizó la relación entre el peso promedio de los animales y los parámetros hematológicos. Se observó una correlación positiva significativa entre la carga promedio de H. irritans y la concentración de hemoglobina ($\rho = 0,587$; $p = 0,0010$), así como entre la carga parasitaria y el hematocrito ($\rho = 0,481$; $p = 0,0095$). El número de eritrocitos mostró una tendencia positiva ($\rho = 0,361$; $p = 0,059$), mientras que el recuento de plaquetas no presentó asociación con la carga parasitaria ($\rho = -0,060$; $p = 0,763$). Paralelamente, el peso promedio de los bovinos también se correlacionó positivamente con la concentración de hemoglobina ($\rho = 0,49$; $p = 0,009$) y con el hematocrito ($\rho = 0,60$; $p = 0,0008$), además de mostrar previamente una fuerte asociación con la carga de H. irritans. Estos resultados sugieren que las moscas seleccionan hospedadores con mayores contenidos de hemoglobina, sustrato principal de su alimentación. Estos resultados aportan nuevos elementos para comprender la interacción hospedador-parásito y para identificar biomarcadores asociados al riesgo de infestación.

Póster #79

Exploración de la sinapsis virológica y los nanotubos intercelulares como vías de transmisión célula-célula del virus de la leucemia bovina

Yrupé Arhancet [1], María Rosa García [2], Camila Sagasti [1], Mariana Salinas [1], Melissa De

León [1], Lucía Carrasco [1], Agustín Demarco [1,3], Sergio Bianchi [4], Florencia Rammauro [1,3], Martín Fló [1,3], Federico Carrión [1], Natalia Olivero-Deibe [1]

[1] Laboratorio de Inmunovirología – Unidad de biofísica de proteínas “Prof. Dr. Otto Pritsch”, Institut Pasteur de Montevideo.[2] Laboratorio de Interacciones Hospedero-Patógeno, Institut Pasteur de Montevideo.[3] Unidad Académica Inmunobiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República.[4] Unidad Académica de Fisiopatología, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República

El virus de la leucemia bovina (VLB) es un deltaretrovirus oncogénico, agente causal de la leucosis bovina enzoótica, presenta en Uruguay una prevalencia superior al 80% y constituye un problema sanitario y económico relevante para la ganadería; además, su eventual asociación con el cáncer de mama humano continúa siendo objeto de debate científico. Al igual que el virus linfotrópico de células T humanas (HTLV) generan escasas partículas virales libres y dependen del contacto directo entre células para propagarse. En HTLV los mecanismos de transmisión célula-célula son: la sinapsis virológica (SV), la formación de nanotubos intercelulares (TNTs) y los biofilms. En el caso de VLB estos mecanismos aún permanecen escasamente descritos. Este trabajo tiene como objetivo profundizar en la interacción entre el VLB y la célula hospedera, centrándose en la SV y los TNTs, y en la participación de la proteína reguladora Tax en su formación, particularmente en su capacidad de remodelar el citoesqueleto y polarizar el centro organizador de microtúbulos (MTOC). Como estrategia experimental se emplearon co-cultivos de líneas celulares persistentemente infectadas junto a células permisivas y susceptibles a la infección, combinando microscopía confocal e inmunofluorescencia. En paralelo, se buscaron interactores celulares de Tax mediante ensayos de pull-down con purificación por afinidad y espectrometría de masa de alta resolución. Los resultados preliminares evidenciaron la formación de TNTs de más de 150 µm de longitud que conectan células infectadas y no infectadas, con transferencia de señal GFP y localización de las proteínas virales cápside (CA) y envoltura (ENV) a lo largo de estas estructuras. La caracterización de estos nanotubos mostró evidencia preliminar de que están compuestos por actina y no por tubulina, en línea con la definición clásica de TNTs. Asimismo, se identificaron eventos compatibles con la formación de SV, con polarización del MTOC y reorganización de actina y tubulina en la interfaz célula-célula. El análisis proteómico de células que expresan Tax reveló un enriquecimiento significativo de factores vinculados a la dinámica del citoesqueleto y al transporte intracelular, destacándose la proteína pericentriolar PCM1 como posible interactor funcional. Como próxima etapa, se prevé validar estos hallazgos en células mononucleares de sangre periférica de bovinos infectados y no infectados. En conjunto, estos resultados aportan evidencia novedosa sobre la biología celular del VLB y sientan bases para el diseño de estrategias dirigidas a limitar su diseminación en la ganadería.

Póster #80

Predicción de funciones génicas en Mycobacteriales mediante aprendizaje

automático, interactómica de proximidad y matrices de paisaje funcional

Alfonso Taboada[1,2], Emilia Torriglia[2], Rosario Durán[2], Flavio Pazos Obregón[2]

1- Departamento de Métodos Cuantitativos, Facultad de Medicina, UDELAR. 2- Unidad de Bioquímica y Proteómica Analiticas, IIBCE-Institut Pasteur de Montevideo

Nuestro objetivo es desarrollar estrategias de aprendizaje automático para predecir funciones génicas en bacterias no modelo utilizando variables independientes de la homología de secuencia. En una primera etapa nos enfocamos en genes involucrados en la división y elongación celular de Mycobacteriales, un orden que incluye organismos de relevancia biomédica, como *Mycobacterium tuberculosis*, y biotecnológica, como *Corynebacterium glutamicum*. A diferencia de bacterias modelo, los Mycobacteriales carecen de homólogos reconocibles de numerosos componentes del divisoma y el elongasoma, por lo que aún se desconoce qué proteínas desempeñan varios de estos roles esenciales. Para identificar genes candidatos integramos dos fuentes de información complementarias. Por un lado, utilizamos interactomas de proximidad centrados en proteínas conocidas del divisoma y/o elongasoma de *C. glutamicum*. Por otro lado, empleamos matrices de paisaje funcional de *M. tuberculosis*, que representan el enriquecimiento de términos GO en el entorno genómico de cada gen y capturan su organización funcional relativa dentro del genoma. Sobre estas variables aplicamos métodos de aprendizaje supervisado y no supervisado, y pósteriormente integramos las predicciones mediante relaciones de ortología entre ambas especies. La combinación de ambas aproximaciones permitió priorizar un conjunto de genes candidatos asociados a la maquinaria de división y elongación celular y mostró una alta concordancia entre los enfoques supervisados y no supervisados. Los resultados preliminares respaldan la utilidad de combinar información de interactómica y organización funcional del genoma para la predicción de funciones génicas en bacterias pobremente anotadas. Este trabajo constituye una primera etapa hacia el desarrollo de un anotador funcional generalizable, que en fases posteriores será extendido a otros grupos bacterianos de interés biomédico, industrial y ambiental.

Póster #81

Tau oligomers impair global protein synthesis and remodel the neuronal transcriptome and translatome

Guillermo Eastman[a,b], Julia Stiltner[a], George S. Bloom[a,c,d]

[a] Department of Biology, University of Virginia, Charlottesville, VA 22904, USA. [b] Departamento de Genómica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Ministerio de Educación y Cultura, Montevideo 11600, Uruguay. [c] Department of Neuroscience, University of Virginia, Charlottesville, VA 22903, USA. [d] Department of Cell Biology, University of Virginia, Charlottesville, VA 22903, USA.

INTRODUCTION: The pathological accumulation of tau in neurons is a hallmark of Alzheimer's Disease (AD), yet how toxic tau species drive neuronal dysfunction remains unclear.

METHODS: We applied transcriptome and translatome analysis in mouse and human neurons exposed to tau oligomers (TauOs). Global protein synthesis was evaluated using SUnSET.

RESULTS: TauOs induced broad transcriptomic and translational alterations, including the downregulation of pathways associated with genome integrity, synaptic function, dendritic organization, ion channel activity, and neurotransmission. Global protein synthesis was reduced after TauOs exposure through a mechanism dependent on intracellular tau. In parallel, TauOs increased the translational efficiency of TOP mRNAs, suggesting aberrant mTOR pathway activation, which was further supported by increased S6 phosphorylation.

DISCUSSION: These findings provide a comprehensive characterization of early TauOs-induced neuronal dysfunction and highlight translational dysregulation as a potential contributor to neurodegeneration in AD.

Póster #82

Hierarchical Functional Landscape Arrays for machine learning–based functional annotation in Trypanosoma brucei

Jorge Josue Burneo [1]; Juan Manuel Trinidad [2]; Marcelo A. Comini [1]; Flavio Pazos Obregón[3]

1 - Laboratory Redox Biology of Trypanosomes, Institut Pasteur de Montevideo. 2 - Evolutionary Genomics Laboratory, Faculty of Sciences, University of the Republic (UdelaR). 3 - Analytical Biochemistry and Proteomics Unit, Clemente Estable Biological Research Institute – Institut Pasteur de Montevideo

Functional annotation remains a major challenge in genomics, particularly in non-model organisms such as *Trypanosoma brucei*, where many proteins essential for parasite survival lack functional characterization. Gene neighborhood organization can provide informative functional signals, but in trypanosomatids genes are arranged into polycistronic transcription units, and genes within the same unit do not necessarily share biological functions. Consequently, functional inference requires representations capable of integrating spatial genomic information beyond simple transcription-unit membership.

To address this problem, we developed **Hierarchical Functional Landscape Arrays (hFLA)**, a representation of genomic organization that combines hierarchical propagation of Gene Ontology (GO) annotations with distance-weighted functional enrichment across local genomic neighborhoods. hFLA integrates both the hierarchical relationships among GO terms and the spatial contribution of neighboring genes, generating functional feature vectors suitable for machine-learning–based prediction.

The method was implemented using the *T. brucei* TREU927 genome, with protein-coding genes ordered according to their genomic coordinates. For each gene, hFLA representations were constructed from sliding genomic windows that incorporated GO terms propagated according to the true-path rule together with information derived from sibling terms. These representations were used as predictors in supervised machine learning models, including Logistic Regression, Random Forest, XGBoost, and Support Vector Machine (SVM). Model performance was evaluated using nested cross-validation, an independent evaluation set, bootstrap confidence intervals, and label permutation testing. hFLA captured informative functional signals across the three GO ontologies, with particularly strong performance for Biological Process, indicating that genomic neighborhood organization contains substantial information for functional inference. For the prediction of genes involved in thiol-dependent redox metabolism, Logistic Regression achieved the highest performance (ROC-AUC = 0.947), followed by Random Forest (0.919), XGBoost (0.891), and SVM (0.885). Permutation analyses confirmed that all performances were significantly above chance expectations. Importantly, hFLA performed comparably to sequence-derived protein descriptors, demonstrating that genomic neighborhood organization provides an independent and complementary source of predictive information. These results establish hFLA as a robust framework for functional annotation and candidate gene prioritization in *T. brucei* and potentially other poorly

annotated eukaryotic genomes.

Póster #83

Estudio de la dinámica de expresión génica detrás de la transición de amastigota a tripomastigota en *Trypanosoma cruzi* mediante scRNA-seq

Lucas Inchausti[1,2], José Sotelo-Silveira[3,4], María Ana Duhagon[2], Javier G. De Gaudenzi[5,6], Pablo Smircich[1,2]

1 - Laboratorio de Bioinformática, Departamento de Genómica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.2 - Sección Genómica Funcional, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay 3- Departamento de Genómica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay 4 - Sección Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay 5 - Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Universidad Nacional de San Martín-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, General San Martín, Prov. de Buenos Aires, Argentina 6 - Escuela de Bio y Nanotecnologías (EByN), Universidad Nacional de San Martín, General San Martín, Prov. de Buenos Aires, Argentina

Trypanosoma cruzi, agente etiológico de la enfermedad de Chagas, atraviesa múltiples transiciones de diferenciación a lo largo de su ciclo de vida, cada una caracterizada por programas de expresión génica específicos. En los tripanosomátidos, estos cambios están regulados fuertemente a nivel postranscripcional; sin embargo, los mecanismos moleculares que coordinan este proceso aún no se comprenden completamente. En particular, permanece sin resolver si estas transiciones ocurren a través de estados intermedios discretos o como un proceso continuo. Los enfoques transcriptómicos convencionales basados en poblaciones celulares no permiten abordar esta cuestión, ya que promedian poblaciones asincrónicas y heterogéneas, ocultando estados transitorios. En este trabajo, reanalizamos datos de secuenciación de ARN de célula única (scRNA-seq) de amastigotas y tripomastigotas derivados de células con el objetivo de caracterizar la transición amastigota-tripomastigota a resolución de célula única. Mediante análisis de pseudotiempo reconstruimos la trayectoria de diferenciación, ordenamos temporalmente los programas transcripcionales asociados a este proceso e identificamos proteínas de unión a ARN (RBPs) candidatas como posibles reguladoras. Además, evaluamos si la diferenciación se organiza en estados intermedios discretos o si constituye un continuo transcripcional. Este estudio aporta una visión de alta resolución de la diferenciación de *T. cruzi* y proporciona nuevos conocimientos sobre los actores que median la regulación postranscripcional durante el desarrollo del parásito.

Póster #84

Alteración del perfil transcripcional en el riñón anterior del esturión ruso y su respuesta al desafío bacteriano por la exposición al estrés térmico prolongado

Pedro Grolla-Basaldúa[1,2], Alejandro Perretta[3], Ana María Ferreira[1,2], Valeria Silva-Álvarez[1,2], Alicia Costábile[4]

[1] Área de Inmunología, DEPBIO, Facultad de Química, Instituto de Higiene, UdelaR [2] Unidad de Inmunología, IQB, Facultad de Ciencias, Instituto de Higiene, UdelaR [3] Unidad de Acuicultura, Facultad de Veterinaria, UdelaR. [4] Sección Bioquímica, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, UdelaR

El esturión ruso (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt & Ratzeburg, 1833) es un pez de gran relevancia económica en Uruguay por su cultivo para la producción de caviar en granjas acuícolas ubicadas en el Río Negro. En estas granjas se observa un aumento de la mortalidad durante los meses cálidos, asociado a infecciones recurrentes por patógenos oportunistas como *Aeromonas hydrophila*, favorecidas por el debilitamiento de sus defensas. En este contexto, resulta de interés estudiar el efecto del estrés térmico prolongado sobre el riñón anterior, ya que es un órgano hematopoyético e inmunitario clave en los peces. Para este trabajo se extrajeron muestras de riñón anterior de esturiones rusos juveniles sometidos durante 5 semanas a una temperatura no tolerable (30 °C), a un desafío bacteriano por *A. hydrophyla*, o a ambos tratamientos. Se extrajo el ARN total utilizando un kit comercial y se envió a Macrogen (Corea), donde se comprobó su integridad, se realizó la construcción de librerías y, Pósteriormente, la secuenciación con la tecnología Illumina NovaSeq. A partir de las lecturas obtenidas se realizó el ensamblado y la anotación del transcriptoma *de novo* empleando el paquete Trinity. Este transcriptoma se utilizó para realizar los análisis de expresión diferencial de transcritos y enriquecimiento funcional entre las distintas condiciones. El ensamblado resultó en un transcriptoma con 356.274 unigenes, de los cuales 36.945 tienen una anotación funcional confiable. La exposición crónica a temperaturas no tolerables derivó en una gran cantidad de transcritos diferencialmente expresados (678), lo que es congruente con una importante reprogramación fisiológica. En contraste, el desafío bacteriano indujo una respuesta transcripcional más limitada, con solo 57 transcritos diferencialmente expresados. Asimismo, se observó que transcritos asociados a la respuesta inmune se encuentran subexpresados en los esturiones sometidos simultáneamente al desafío bacteriano y a estrés térmico crónico, en comparación con aquellos expuestos únicamente al desafío bacteriano. Estos resultados contribuyen a explicar las dificultades que presenta el esturión ruso para combatir infecciones en las granjas durante los meses cálidos. La evidencia disponible indica que este es el primer trabajo transcriptómico en el que se analizan los efectos de la exposición prolongada a temperaturas no tolerables y al desafío bacteriano en el riñón anterior para esta especie. Esto aporta una valiosa información sobre el rol que cumple este órgano y la reprogramación que sufre cuando el organismo debe hacer frente a infecciones bacterianas en condiciones de estrés térmico crónico.

Póster #85

Adaptación de protocolos de scRNA-seq para el estudio de transcriptomas axonales

Natalia Ortiz*, Joaquín Garat, José Sotelo-Silveira

Departamento de Genómica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), Montevideo, Uruguay

El estudio del ARN axonal es clave para comprender la función neuronal. Adaptando protocolos de transcriptómica de célula única y microdisección de axoplasma, buscamos obtener transcriptomas axonales de alta calidad a resolución de axón único. El protocolo Smart-seq2, diseñado originalmente para scRNA-seq, resultó ideal por su alta eficiencia de captura de ARN incluso con cantidades mínimas de material inicial (~1 pg). Los perfiles de electroforesis mostraron picos de tamaño consistentes entre condiciones, y los controles negativos y positivos confirmaron la sensibilidad y especificidad del protocolo. A partir de esta optimización, generamos y secuenciamos con baja profundidad las primeras bibliotecas de axones individuales (2026): se detectaron entre ~600 y ~10.000 genes según el compartimento muestreado, con un enriquecimiento significativo de categorías funcionales asociadas a la identidad axonal: organización del citoesqueleto de actina, envainamiento axonal, mielinización y organización sináptica, respecto del control negativo. Estos resultados preliminares indican que el protocolo permite capturar transcriptomas de axones individuales con especificidad biológica, abriendo la puerta al estudio de la heterogeneidad en la expresión génica axonal.

Póster #86

IA como articuladora de ética universitaria, trabajo colaborativo y alfabetización molecular en Fisicoquímica Moderna (Lic. en Bioquímica): intervención y evaluación en el módulo inicial de cuatro semanas.

Mauro Gianoni, Julieta Schmidt Smerdiner, Fabiana Salazar y E. Laura Coitiño*

Laboratorio de Química Teórica y Computacional (LQTC), Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias y Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Universidad de la República, Montevideo 11400, Uruguay

La integración de herramientas de Inteligencia Artificial (IA) en la educación superior plantea desafíos éticos, cognitivos y pedagógicos que requieren abordajes contextualizados y fundamentados en las disciplinas STEM. *Fisicoquímica Moderna Estructura y Propiedades Moleculares*, asignatura que cubre contenidos obligatorios del 4.° semestre de la Lic. en Bioquímica (UdelaR), cuenta con casi tres décadas de innovación didáctica en alfabetización molecular y modelado computacional. En 2026 implementamos una intervención educativa, focalizada en las 4 semanas iniciales del curso, orientada a explorar el rol de la IA como articuladora entre ética universitaria, convivencia académica, alfabetización científica y trabajo colaborativo en proyectos aplicados de modelado de la estructura y propiedades moleculares. La intervención se articula en el proyecto semestral sin alterar la arquitectura del curso ni la autonomía conceptual del estudiantado. En la **Semana 1**, se presentan los "*11 principios de la UdelaR para el uso de IA"* integrados al contrato educativo y cada equipo formula tres compromisos verificables de uso responsable de IA. Ante la frecuencia de alucinaciones en modelos generativos, se establece un protocolo obligatorio de verificación humana y validación cruzada. En clase, cada estudiante selecciona un artículo en Scopus-Timbó, registra la cita rigurosa en el Foro-EVA junto al documento original y contrasta la síntesis inicial de IA con la síntesis crítica que elaborará hacia la Semana 4. En la **Semana 2**, la IA apoya la exploración estructural inicial (PDB IDs, dominios y ligandos) cuyos datos se cotejan con repositorios oficiales (RCSB PDB, UniProt) y la construcción de glosarios de interacciones moleculares visualizadas por cada equipo. En la **Semana 3**, la IA actúa como tutor conceptual para contextualizar los ligandos en PubChem y reforzar el uso del software científico. En la **Semana 4**, se emplea la IA para apoyar la confección del mapa de ruta del proyecto y la autoevaluación propia y asistida del preinforme (que incorpora la sección de "Uso de IA" junto a la reflexión sobre la eficacia/eficiencia en el trabajo colaborativo al declarar la dinámica grupal). Se concluye con un ejercicio metacognitivo comparando las síntesis individuales de artículos (humano crítico vs inicial de IA) y las evaluaciones basadas en rúbricas (docentes y estudiantes vs la generada por IA). El impacto se evalúa mediante cuatro fuentes de evidencia: análisis comparativo de producciones (cohortes 2025 vs. 2026), analíticas en EVA, microencuestas y observación estructurada en el aula. Los indicadores miden: precisión en búsquedas estructurales y

bibliográficas, profundidad conceptual, aplicación ética y dinámica colaborativa. Preliminarmente esta integración éticamente guiada y pedagógicamente controlada, reduce sustancialmente el uso acrítico de fuentes, estimula la reflexión metacognitiva y fortalece la organización colaborativa en equipos sin sustituir la experticia ni el razonamiento científico.

Póster #87

Función mitocondrial de vacas lecheras sometidas a un estímulo inflamatorio en distintas etapas de lactancia

A.S. Márquez Acevedo[1], A. Casal[2], A.C Malaquina[2], M. Garcia-Roche[2]

[1]Animal and Veterinary Science Department, University of Idaho, Moscow, ID 83844 [2] Departamento de Producción Animal y Pasturas, Facultad de Agronomía, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay

Durante la transición de gestante a lactante, la vaca lechera atraviesa cambios dramáticos para sostener los altos requerimientos energéticos, proteicos y minerales de la lactogénesis. Además, es el periodo más susceptible para el sistema inmune de la vaca lechera, predisponiéndola a trastornos metabólicos. El objetivo de este estudio fue comparar la función mitocondrial hepática entre vacas lecheras en lactancia temprana y media sometidas a una infusión de lipopolisacárido (LPS). Dieciséis vacas Holstein multíparas (630 kg de peso vivo y 3.0 unidades de condición corporal) fueron infundidas por vía intravenosa con LPS (62,5 ng/kg de peso vivo) a los 15 y 175 días posparto (lactancia temprana y media, respectivamente, N = 8). Las vacas fueron alojadas en un compost barn y recibieron una dieta totalmente mezclada. La activación inmune se evidenció por una reducción del consumo de 46% en ambos periodos, una disminución en la producción de leche entre 21 y 26%, máximos de temperatura rectal entre 40 y 40.3°C, frecuencia cardiaca entre 70 y 80 respiraciones por minutos y tasa cardiaca de 104 latidos por minuto. Se tomaron biopsias hepáticas 24 h Posteriores a la infusión y se evaluó la función mitocondrial mediante de alta resolución utilizando sustratos del complejo I y complejo II, desacoplantes e inhibidores de la cadena respiratoria. Los datos fueron analizados mediante modelos mixtos en SAS. La etapa de lactancia fue incluida como efecto fijo y la vaca como unidad experimental. A nivel de complejo I, las vacas en lactancia temprana presentaron mayor respiración en estado 3 (14,93 vs. 10,70 ± 1,32 pmolO_2/min/mg; P = 0,039), estado 4 (9,99 vs. 5,83 ± 1,13 pmolO_2/min/mg; P = 0,021) y respiración resistente a oligomicina (13,20 vs. 6,70 ± 1,63 pmolO_2/min/mg; P = 0,014), mientras que la respiración sensible a oligomicina tendió a ser menor en lactancia temprana (1.74 vs. 4.00 ± 0.75 pmolO_2/min/mg, P = 0,052). Esto se tradujo en una tendencia una menor eficiencia de acople (16 vs. 40%, P = 0.09). A nivel de complejo II, la respiración en estado 4 también fue mayor en lactancia temprana (23,49 vs. 13,48 ± 2,78 pmol O_2/min/mg; P = 0,021). Estos resultados sugieren que, ante un desafío con

LPS, las vacas en lactancia temprana presentan mayor respiración mitocondrial hepática, pero con una menor eficiencia de acople, evidenciando que durante esta etapa existen procesos que consumen gradiente de protones sin traducirse a síntesis de ATP.

Póster #88

Función mitocondrial en células mononucleares de sangre periférica de vacas lecheras sometidas a un desafío inflamatorio inducido por LPS bajo condiciones ambientales de estrés térmico.

A. C. Malaquina +, A. Casal+, M. García-Roche**+**

+Departamento de Producción Animal y Pasturas, Facultad de Agronomía, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.

Las mitocondrias desempeñan un papel central en el metabolismo energético y en las respuestas al estrés celular. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) circulantes pueden actuar como biomarcadores de la función mitocondrial. El objetivo de este estudio fue evaluar la función mitocondrial en PBMC de vacas lecheras sometidas a un desafío inflamatorio agudo inducido por lipopolisacárido (LPS) expuestas a condiciones ambientales de estrés térmico. Dieciséis vacas Holstein multíparas (642 kg de peso vivo, 2.9 unidades de condición corporal) fueron infundidas por vía intravenosa con LPS (LPS, n = 8) o solución salina estéril (CTRL, n = 8) a los 184 días posparto. El índice de temperatura humedad fue mayor al 68 durante el ensayo experimental. Las vacas fueron alojadas en parcelas individuales con sombra, agua y una dieta totalmente mezclada *ad libitum.* La respuesta inflamatoria se confirmó en vacas LPS por una disminución del 50% en el consumo de materia seca y máximos de temperatura rectal de 39.5 vs. 38.6°C, tasa respiratoria de 83 vs. 72 respiraciones/min y frecuencia cardíaca de 111 vs. 89 latidos/min en vacas LPS vs. vacas CTRL, respectivamente. Seis horas Pósteriores a la infusión se recolectó sangre entera y se aislaron las PBMC utilizando el método de gradiente Ficoll–Paque. Se midieron las tasas de consumo de oxígeno mitocondrial en 1 millón de PBMC por mL utilizando oligomicina, cianuro de carbonilo 4-(trifluorometoxi)fenilhidrazona y antimicina A/rotenona con un sistema Oxytherm Hansatech. Los datos se analizaron mediante el procedimiento MIXED de SAS, incluyendo el tratamiento como efecto fijo. La respiración basal y la respiración sensible a oligomicina no fueron modificadas por el tratamiento. Sin embargo, la respiración resistente a oligomicina (0.80 vs. 0.47 ± 0.14 nmol $O_2 \cdot min^{-1} \cdot 10^6$ células^{-1}, $P < 0.05$) y la máxima capacidad respiratoria (0.71 vs. 0.48 ± 0.09 nmol $O_2 \cdot min^{-1} \cdot 10^6$ células^{-1}, $P < 0.05$) aumentaron en vacas LPS vs. vacas CTRL. Estos resultados se tradujeron en una eficiencia de acople menor en vacas LPS en comparación con vacas CTRL (0.32 vs. 0.86 ± 0.20, $P < 0.05$). En conclusión, un desafío inflamatorio inducido por LPS en vacas lecheras sometidas a estrés térmico durante la lactancia media altera la eficiencia de acople mitocondrial en celulas PBMC. Estos resultados sugieren una reorganización del metabolismo energético de estas células,

posiblemente asociada con un cambio en las vías predominantes de generación de ATP, además de posibles diferencias en la composición de las poblaciones de PBMC circulantes.

Póster #89

Identificación de nuevas proteínas de división celular en *Mycobacteriales* mediante marcado de proximidad en las células vivas.

Rodríguez A[1*], Martínez M[2], Rossello J[1], Megrian D[2], Nuñez V.V., Gaday Q[2], D.M. Santos M[3], C. Camillo-Andrade A[3], Dos Santos-Donado PR[1], Portela M[1], Ben Assaya M[2], Alzari P[2], Wehenkel AM [2], Durán R[1]

1. Analytical Biochemistry and Proteomics Unit, Institut Pasteur Montevideo/Instituto Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay. 2. Unit of Structural Microbiology, Institut Pasteur Paris, Paris, France. 3. Carlos Chagas Institute, Fiocruz, Brasil

La división celular bacteriana es un proceso esencial y altamente regulado y depende de la acción coordinada de dos complejos multiproteicos, el elongasoma y el divisoma, responsables de la elongación y la división celular, respectivamente. Aunque estos sistemas han sido ampliamente estudiados en bacterias modelo como Escherichia coli y Bacillus subtilis, su organización molecular en bacterias del orden Mycobacteriales permanece aún poco comprendida. Este grupo presenta características distintivas, como el crecimiento polar asimétrico y una envoltura celular compleja, que se acompañan de la ausencia de numerosos componentes esenciales para la división celular en otros microorganismos. Si bien la proteína FtsZ constituye el núcleo conservado del divisoma, muchas de las proteínas encargadas de su anclaje a la membrana aún no han sido identificadas. Asimismo, diversas evidencias indican que la fosforilación mediada por quinasas Ser/Thr desempeña un papel fundamental en la regulación de la elongación y la división celular en estas bacterias. El objetivo de este trabajo es la identificación de nuevos componentes divisoma y el estudio del papel de la fosforilación en la organización de esta maquinaria. Para ello, se desarrolló y optimizó una estrategia de marcado por proximidad en células vivas basada en la enzima APEX2, utilizando Corynebacterium glutamicum como organismo modelo. Esta metodología permitió explorar el entorno proteómico de FtsZ en condiciones fisiológicas y comparar su composición en diferentes contextos de fosforilación. La aplicación de esta estrategia permitió identificar 211 proteínas vecinas de FtsZ, incluyendo múltiples componentes previamente descritos del divisoma, lo que validó el enfoque experimental. Entre las proteínas identificadas se encontraron 7 proteínas de membrana previamente anotadas como hipotéticas, cuya localización septal fue confirmada experimentalmente, resultando candidatas a formar parte de la maquinaria de división celular en Mycobacteriales. Asimismo, el análisis del entorno proteómico de FtsZ en una cepa deficiente en la quinasa Ser/Thr PknA reveló modificaciones en la composición de este complejo, acompañadas por alteraciones morfológicas compatibles con defectos en la división celular. Estos resultados evidencian

que la fosforilación constituye un mecanismo regulador de la composición del divisoma. También estamos desarrollando una estrategia de trabajo que combina el marcado por proximidad con el entrecruzamiento tanto in vitro como in vivo, con el objetivo de confirmar interacciones directas entre FtsZ y los candidatos seleccionados. En conjunto, este trabajo establece una plataforma robusta para el estudio de interacciones proteína-proteína in vivo en bacterias del orden Mycobacteriales y proporciona nuevos conocimientos sobre la arquitectura molecular del divisoma y los mecanismos que controlan su composición.

Póster #90

La actividad transglutaminasa en la función invasiva y endovascular del trofoblasto.

Camila Tosar [1, 2, 3] , Victoria Núñez [1, 2, 3] ,Avril Toledo [1, 2, 3], Paula Arbildi [1, 2, 3]

(1) Universidad de la República, Departamento de Biociencias, Área Inmunología, Facultad de Química, Avenida General Flores 2124, Montevideo, Uruguay (2) Universidad de la República, Instituto de Química Biológica, Unidad Asociada de Inmunología, Facultad de Ciencias, Iguá 4225, Montevideo, Uruguay (3) Universidad de la República, Unidad Académica de Inmunología, Instituto de Higiene "Prof. Arnoldo Berta", Avenida Alfredo Navarro 3051, Montevideo, Uruguay

Objetivo: La transglutaminasa tisular (TG2) es una proteína ubicua y multifuncional involucrada en diversos procesos fisiopatológicos. Sin embargo, su función fisiológica en la placenta, así como la relación entre su desregulación y un microambiente placentario adverso, permanece poco estudiada. El objetivo de este estudio fue investigar el impacto de la actividad transglutaminasa sobre procesos celulares determinantes de la función invasiva y endovascular del trofoblasto, incluyendo adhesión, organización y extensión celular, migración, tubulogénesis y secreción de mediadores asociados al remodelado de la matriz extracelular.

Métodos: Las líneas de trofoblasto humano de primer trimestre Swan-71 y HTR-8/SVneo fueron tratadas con cistamina (CTA) para inhibir la actividad transglutaminasa. Se evaluaron viabilidad y actividad transglutaminasa, junto con adhesión y extensión celular sobre fibronectina, migración, formación de estructuras tubulares, así como secreción de MMP-2 y MMP-9. Resultados: La inhibición de la actividad transglutaminasa no modificó significativamente la adhesión celular, pero alteró marcadamente la organización de las células adheridas a fibronectina. En ambas líneas, el tratamiento con CTA disminuyó el área celular y aumentó la circularidad, indicando una reducción de la extensión celular. Asimismo, la inhibición de la actividad transglutaminasa redujo la capacidad migratoria y afectó negativamente la formación de estructuras tubulares en Swan-71 y HTR-8/SVneo. El análisis de metaloproteasas reveló perfiles de secreción marcadamente diferentes entre ambas líneas celulares. MMP-2 fue detectada principalmente en sobrenadantes de Swan-71 y su secreción no se modificó significativamente por los tratamientos evaluados. En contraste, HTR-8/SVneo presentó mayor secreción de MMP-9, que aumentó frente a la inhibición de la actividad transglutaminasa. Conclusiones: Estos resultados indican que la

actividad transglutaminasa participa en procesos fundamentales para la función invasiva y endovascular del trofoblasto, incluyendo su organización y extensión celular, migración y capacidad de formar estructuras tubulares. Asimismo, la inhibición de esta actividad se asocia con cambios en la secreción de mediadores vinculados al remodelado de la matriz extracelular de manera dependiente del tipo celular. En conjunto, estos hallazgos apoyan un papel de la actividad transglutaminasa en mecanismos celulares relevantes para el establecimiento y remodelado de la interfaz materno-fetal.

Póster #91

Rol del zinc y de la aconitasa mitocondrial en los cambios metabólicos asociados al envejecimiento prostático.

Elián Lorenzo[1,4], Santiago Mansilla[2,4], Lucía Pastro[3], Mercedes Rodríguez-Teja[3] y Laura Castro[1,4].

UA Departamento de Bioquímica[1]; UA de Métodos Cuantitativos[2]; UA Departamento de Genética[3], CEINBIO[4]. Facultad de Medicina, UDELAR.

Durante el envejecimiento, la próstata experimenta cambios progresivos en sus propiedades viscoelásticas, caracterizados por un aumento de la rigidez del tejido glandular. En modelos de cultivo 3D de acinos prostáticos, se ha observado que una membrana basal (MB) envejecida, rica en productos finales de glicación avanzada (AGEs), induce alteraciones morfológicas compatibles con etapas tempranas de transformación maligna, tales como la pérdida de polaridad celular, un fenotipo invasivo y un aumento de la fosforilación oxidativa. Análisis transcriptómicos de RNA-seq revelaron que el cultivo sobre MB rígida provoca la desregulación de transportadores de Zn, disminuyendo los de importación e incrementando los de exportación. Este fenómeno altera la homeostasis del Zn y desencadena una reprogramación metabólica. El nexo entre ambos fenómenos apunta hacia la inhibición mediada por Zn de la aconitasa mitocondrial (ACO2) en la próstata joven, secretora de citrato. La ACO2 es fundamental para la metabolización del citrato en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la consiguiente activación de la fosforilación oxidativa observada. Para poder comprender los mecanismos que provocan los cambios metabólicos inducidos por la disminución de Zn, nos enfocamos en caracterizar el efecto del Zn en la actividad y estructura de la ACO2 *in vitro* e *in silico*. Se utilizó ACO2 recombinante humana purificada en nuestro laboratorio, a la que expusimos a concentraciones relevantes de cloruro o citrato de Zn con la finalidad de estudiar los mecanismos de inhibición. Además, realizamos experimentos *in silico* para identificar potenciales sitios de unión a Zn. La ACO2 posee en su sitio activo un centro [4Fe-4S] esencial para la catálisis. La predicción estructural utilizando Alphafold3 revela varios sitios posibles de unión incluyendo varias His y Cys, incluidas las que coordinan el centro FeS sugiriendo múltiples mecanismos de inhibición posibles. Durante la purificación de la ACO2, se pierde un Fe lábil del centro [4Fe-4S]. La activación de la ACO2 se realizó

con $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2$ y DTT. En presencia de $ZnCl_2$ se observó una inhibición de la activación (IC_{50} = 50-100 uM, Zn:Fe > 2), así como una disminución en la absorbancia en la región del centro FeS (400-600 nm). Se realizaron experimentos de cinética enzimática para identificar el mecanismo de inhibición del Zn utilizando como sustratos citrato e isocitrato. Nuestros resultados apuntan a un mecanismo complejo de inhibición, donde el Zn puede actuar a múltiples niveles: la transferencia del centro Fe-S, la inhibición de la reactivación de ACO2[3Fe-4S] y posibles mecanismos alostéricos.

Póster #92

Análisis de los efectos de la hipoxia y de los oncogenes virales del VPH-18 en el daño al ADN en queratinocitos humanos utilizando los marcadores 53BP1 y γ-H2AX

Felipe Parietti[1,2], Jimena Hochmann[1,3], Miguel Arocena[1,2]

[1]Grupo de Biología Celular del Cáncer. [2]Departamento de Biología Odontológica, Facultad de Odontología, UdelaR. [3]Departamento de Diagnóstico en Patología y Medicina Oral, Facultad de Odontología, UdelaR.

Introducción. Las roturas de doble cadena del ADN (DSB) inducen γ-H2AX, que marca el daño y recluta a la proteína 53BP1; el grado de colocalización γ-H2AX–53BP1 refleja la integridad de la respuesta de reparación. En los tumores convergen sobre esta vía dos estímulos cuya interacción se desconoce: los oncogenes elevan la carga de DSB por estrés replicativo, mientras que la hipoxia suprime la capacidad de reparación. Evaluamos cómo la expresión de oncogenes de VPH-18 y la hipoxia interactúan sobre la respuesta celular a las DSB. Metodología. Utilizamos queratinocitos HaCaT que expresan de forma estable los oncogenes E5/E6/E7 del VPH-18 y HaCaT control, cultivados en normoxia e hipoxia inducida por cubreobjeto (24 h). Mediante inmunofluorescencia cuantificamos el número de foci de 53BP1 y de γ-H2AX por núcleo, la proporción de células con señal pan-nuclear de 53BP1, la colocalización γ-H2AX–53BP1 y la compactación global de la cromatina (coeficiente de variación de la intensidad de DAPI). Resultados. La proporción de células con señal pan-nuclear de 53BP1 fue mayor en las células que expresaban los oncogenes virales ($p = 0,0009$) y aumentó bajo hipoxia ($p = 0,032$), sin interacción significativa ($p = 0,109$). El número de foci de 53BP1 por núcleo se redujo bajo hipoxia en ambas líneas celulares (oxígeno $p = 0,018$), sin interacción significativa ($p = 0,248$). Los foci de γ-H2AX por núcleo difirieron entre condiciones (línea celular $p = 0,002$; oxígeno $p = 0,005$) sin interacción significativa ($p = 0,620$). La colocalización γ-H2AX–53BP1 tendió a disminuir bajo hipoxia en ambos grupos, sin alcanzar significancia ($p = 0,085$). La compactación global de la cromatina fue comparable entre condiciones, sin efecto significativo de línea celular ($p = 0,68$), oxígeno ($p = 0,42$) ni interacción ($p = 0,54$), no concluyente por el bajo n.

Discusión y Conclusiones. La reducción de focos discretos de 53BP1 junto con el aumento de la señal nuclear difusa bajo hipoxia describen una redistribución de 53BP1

compatible con una alteración de su reclutamiento a los sitios de rotura, aunque no distinguible de una saturación de focos no resueltos a la resolución empleada (0,312 µm/píxel). La disminución de la colocalización γ-H2AX–53BP1, que respaldaría más directamente esta interpretación, fue solo una tendencia. La expresión de oncogenes elevó independientemente la señal pan-nuclear de 53BP1, pero se asoció a un menor recuento de foci de γ-H2AX, un resultado opuesto al esperado para un contexto de estrés replicativo oncogénico y que requiere confirmación.

Póster #93

Oxígeno como modulador de la respuesta oxidativa de macrófagos

Pereyra Domenech, J[1,2]; Rios, N[1,2,4]; Piacenza, L[1,2]; Alvarez, M. N[2,3]; Radi, R[1,2,4]; Prolo, C[1,2]

[1]Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UdelaR;[2]Centro de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Medicina, UdelaR;[3]Departamento de Educación Médica, Facultad de Medicina, UdelaR;[4]Programa en Alimentos y Salud Humana (PAyS), Facultad de Medicina, Universidad de la República.

Los macrófagos son células pertenecientes a la inmunidad innata. Cuentan con las enzimas óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y NADPH oxidasa 2 (Nox2), dos enzimas oxígeno-dependientes capaces de sintetizar óxido nítrico ($^{\bullet}NO$) y superóxido (O_2), respectivamente. Ambas especies son altamente reactivas y capaces de modificar distintas biomoléculas, contribuyendo así a la eliminación de microorganismos, ya sea directamente o a través de la formación de especies derivadas como el peroxinitrito ($ONOO^-$) con mayor poder oxidante y nitrante. Al ser mecanismos dependientes de O_2 como sustrato, es de sumo interés estudiar estos procesos *in celulla* considerando que las concentraciones de oxígeno ($[O_2]$) fisiológicas (2-15%) difieren de las condiciones estándar del laboratorio ($[O_2]$= 21%). Por lo tanto, en este trabajo se evaluó el efecto de exposiciones a largo plazo (48h) bajo distintas concentraciones de O_2(1-21%) en la respuesta oxidativa de macrófagos murinos J774A-1 previamente inmunoestimulados con lipoplisacarido (LPS) e interferón gamma (IFN-γ). Observamos que a bajas concentraciones de O_2(<5%) existe un aumento de la expresión de la iNOS que permite sostener la producción de óxido nítrico, compensando así la disminución de oxígeno como sustrato. La producción de superóxido tiende a disminuir a medida que el oxígeno decrece mientras que la expresión de Nox2 permanece incambiada. Sin embargo, cuando la $[O_2]$ está por debajo de 2% la producción de peroxinitrito incrementa de forma significativa sugiriendo así la existencia de otra fuente diferente de superóxido para su generación o cambios en la expresión de mecanismos antioxidantes. Para la cuantificación de peroxinitrito en estas condiciones, se ha desarrollado recientemente una nueva sonda fluorescente (Red-B) la cual ha demostrado mayor estabilidad a cambios en el microambiente celular. Red-B es un boronato derivado de xanteno que complementa y

expande el uso de los boronatos convencionales permitiendo la detección de peroxinitrito en condiciones donde las concentraciones de oxígeno y pH pueden ser variables. En conjunto, estos hallazgos destacan la importancia de estudiar la respuesta oxidativa del macrófago bajo condiciones de oxígeno fisiológicas y validan a Red-B como una herramienta clave para el estudio de procesos oxidativos en un microambiente celular relevante.

Póster #94

Efectos del desafío con *Aeromonas hydrophila* sobre la expresión de genes asociados a la inflamación en células peritoneales del esturión ruso

Juliana González Schmidt[1,2], Valeria Silva-Álvarez[1,2], Alejandro Perretta[3], Ana María Ferreira[1,2], Marcio Aversa[1,2]

1. Unidad Asociada de Inmunología, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Instituto de Higiene, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. 2. Área Inmunología, Departamento de Biociencias, Facultad de Química, Instituto de Higiene, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. 3. Unidad de Acuicultura, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Buscando comprender los mecanismos subyacentes al aumento de brotes infecciosos en las granjas de cría de esturiones durante el verano, hemos estudiado la respuesta de fase aguda y estrés crónico del esturión ruso (*Acipenser gueldenstaedtii*), principal especie cultivada en Uruguay. Esto permitió demostrar que las altas temperaturas estivales debilitan la inmunidad innata de los esturiones, favoreciendo infecciones recurrentes. Además, el estrés térmico crónico (ETC) induce inflamación y una reprogramación metabólica hepática que altera la respuesta frente a *Aeromonas hydrophila,* bacteria oportunista causante de brotes en granjas de cría de esturiones. Posteriormente, se analizó la composición celular de la cavidad peritoneal de los esturiones, principal sitio de administración de vacunas y tratamientos. Mediante citometría de flujo se observó que el ETC incrementó las poblaciones linfoides y redujo las mieloides, especialmente las de mayor potencial fagocítico. El desafío con *A. hydrophila* produjo tendencias similares, mientras que la combinación de ETC y desafío bacteriano invirtió este patrón, disminuyendo linfocitos y aumentando células mieloides. Sin embargo, no hay antecedentes sobre qué citoquinas y mediadores tóxicos son inducidos en las células peritoneales del esturión por un desafío bacteriano. Con el objetivo de contestar estas interrogantes y completar el análisis realizado por citometría, este trabajo consistió en optimizar la metodología de PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR). Dicha metodología permitió analizar cambios en la expresión génica de componentes inflamatorios en células peritoneales de esturiones desafiados intraperitonealmente con *A. hydrophila* y de sus respectivos controles inoculados con PBS, en condiciones de temperatura tolerable. En primer lugar, se verificó la eficiencia de los cebadores previamente seleccionados a partir de análisis transcriptómicos de esturión ruso generados por el grupo. Posteriormente, se evaluaron tres genes de referencia,

seleccionando el gen ribosomal 18s debido a su expresión homogénea en todas las condiciones evaluadas. Finalmente, se analizaron los productos de amplificación de qPCR obtenidos para todos los genes evaluados en geles de agarosa. Respecto a la expresión génica relativa, se observaron aumentos significativos en la expresión de los genes que codifican las citoquinas *il1-β* (4,6 veces), *il-6* (4,7 veces) e *il-8* (3 veces) en la cavidad peritoneal de esturiones desafiados. Además, los genes de óxido nítrico sintasa inducible y lisozima C mostraron una tendencia en el mismo sentido. En conjunto, estos resultados evidenciaron la activación transcripcional de la respuesta inmune innata a nivel local, caracterizada por la inducción de mediadores pro-inflamatorios en células peritoneales de esturiones desafiados con *A. hydrophila*.

Póster #95

Respuesta de la microbiota intestinal a una nueva droga anti-obesidad en un modelo murino de obesidad inducida por dieta

Lucía Bonanni[1,2], Karina Cal[2] y Andrés Parada[1,3].

(1) Laboratorio de Genómica Microbiana, Institut Pasteur de Montevideo, (2) Laboratorio de Patologías del Metabolismo y el Envejecimiento, Institut Pasteur de Montevideo, (3) Departamento Ecología y Evolucion, Facultad de Ciencias, Universidad de la República

La obesidad es un trastorno metabólico que favorece el desarrollo de resistencia a la insulina, enfermedades cardiovasculares y otras condiciones de salud. Se ha demostrado que una nueva droga anti-obesidad (NDAO) promueve la reducción del peso corporal sin alterar la ingesta calórica mediante la inducción de termogénesis en el tejido adiposo, mejorando las comorbilidades asociadas. No obstante, la fisiopatología multifactorial de la obesidad ha posicionado a la microbiota intestinal (MI) como un componente clave en la regulación del metabolismo energético y la inflamación sistémica. Dado que la NDAO se administra por vía oral y presenta circulación enterohepática, resulta relevante evaluar su impacto sobre la MI y entender si estos cambios están asociados a los beneficios de la droga. Para ello, se utilizaron ratones machos C57BL/6 expuestos durante 8 semanas a tres condiciones experimentales: dieta normal, dieta rica en grasas (HFD) y HFD suplementada con NDAO. Se extrajo ADN genómico de las fecas y se realizó la caracterización taxonómica mediante la secuenciación del gen de ARN ribosomal 16S (regiones V1-V9) utilizando tecnología Oxford Nanopore. El análisis bioinformático se realizó mediante el pipeline Porefile y con paquetes del lenguaje R, evaluando diferencias en diversidad alfa y beta, modelando redes de correlación bacteriana y detectando biomarcadores mediante los métodos de LEfSe y MaAslin3. En todo el dataset se lograron identificar 42 especies y en total unos 75 taxones. Si bien no se evidenciaron diferencias significativas en la diversidad alfa entre los grupos experimentales, la modulación farmacológica con la NDAO generó un cambio significativo en la composición de la MI (Beta diversidad, PERMANOVA p=0.003) respecto al grupo HFD, estableciendo

un nuevo estado comunitario. El análisis de componentes principales mostró que los primeros tres componentes explican el 52.5% de la varianza entre grupos Los cambios en la comunidad microbiana, se reflejaron en las redes de correlación bacteriana construidas para ambos tratamientos aumentando el número de especies claves y transformando la red de forma cualitativa bajo NDAO versus el grupo HFD. Finalmente, se identificaron especies biomarcadoras para el tratamiento con HFD en presencia y ausencia de la droga. La estructura de la comunidad bacteriana cambió tanto bajo HFD como con NDAO. No solo estaría variando la abundancia de algunas especies clave en ambos grupos sino el rol de algunas de estas bacterias. Estos cambios podrían ser un reflejo de cambios en el metabolismo o explicar en parte la efectividad de esta droga.

Póster #96

Poli-ADP-ribosilación de vinculina durante la transición epitelio-mesénquima: implementación de una estrategia de edición génica usando CRISPR/Cas9.

Menoni, M.[1]; Fernández, A.[2]; Montoliu, L.[2]; Lafon-Hughes, L.[1]; Peluffo, R.D.[1].

[1]Grupo de Biofisicoquímica, Departamento de Ciencias Biológicas, CENUR Litoral Norte, Universidad de la República (Udelar), Rivera 1350, Salto, Uruguay; [2] Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), Madrid, España

La transición epitelio-mesénquima (TEM) es un proceso biológico fundamental durante el desarrollo embrionario, la reparación tisular y la progresión tumoral, que implica profundos cambios en la adhesión celular y la organización del citoesqueleto. La vinculina (VCL), una proteína mecanosensible que conecta el citoesqueleto de actina con los contactos focales y las uniones adherentes, desempeña un papel central en estos procesos. Nuestro proyecto plantea la hipótesis de que dos modificaciones postraduccionales de la VCL regulan diferencialmente la TEM: la poli ADP-ribosilación (PARilación), mediada por tankirasa, contribuiría al mantenimiento del fenotipo epitelial, mientras que la nitración favorecería la adquisición de un fenotipo mesenquimal. Como primer paso para evaluar esta hipótesis, el objetivo de este trabajo fue implementar y validar una estrategia de edición génica dirigida para generar un modelo celular con pérdida selectiva de la PARilación de la VCL. Se diseñó una estrategia CRISPR/Cas9 knock-in basada en reparación dirigida por homología (HDR) para introducir la mutación puntual G454V en el motivo de unión a tankirasa (TBM II) de la VCL. Se sintetizaron las guías de ARN y el oligonucleótido donador (ssODN), y se realizaron ensayos de edición en células MCF-7 y Vero con y sin el molde de reparación. Las poblaciones obtenidas fueron analizadas mediante secuenciación de nueva generación (NGS). El análisis por NGS permitió detectar la mutación G454V exclusivamente en una condición experimental con ssODN, donde representó el 0,41 % de las lecturas analizadas (12/2924), confirmando la ocurrencia de eventos de HDR. Sin embargo, esta mutación coexistió con una deleción cercana al sitio de edición, compatible con reparación por unión de

extremos no homólogos (NHEJ). Además, se identificó una variante no prevista, G454E, que altera el mismo residuo crítico del TBM II y constituye un hallazgo de interés para futuros estudios sobre su posible impacto en la interacción con tankirasa y la regulación de la PARilación. En conjunto, los resultados demuestran la factibilidad de introducir modificaciones dirigidas en VCL, aunque la baja eficiencia de HDR impidió obtener una población celular adecuada para estudios funcionales. Estos hallazgos proporcionan una base para optimizar la estrategia de edición mediante enfoques orientados a incrementar la eficiencia de HDR y avanzar en la generación de un modelo isogénico que permita evaluar el papel de la PARilación y la nitración de la VCL en la regulación de la TEM.

Póster #97

La diferencia del potencial de membrana plasmática modula el nivel de de-tirosinación y acetilación de la tubulina alfa en células epiteliales

Maira Souto[1], Cristian Justet[1]

[1] CEINBIO, Dpto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, UdelaR

Los microtúbulos son los filamentos intracelulares de mayor tamaño. Están conformados por dímeros de tubulina alfa y beta, que se polimerizan formando un túbulo hueco que crece desde un extremo denominado negativo a uno positivo. Cada subunidad tiene diferentes isoformas que además cuentan con una gran variedad de modificaciones postraduccionales (PTMs), conformando de esta manera el código de tubulina. Las distintas isoformas y modificaciones confieren a los microtúbulos la capacidad de participar en distintos procesos celulares como migración, mitosis o interacción intercelular entre otras. En los epitelios, se caracterizan por distribuirse de forma periférica fortaleciendo la estabilidad de la membrana basolateral. Se destacan dos modificaciones de la tubulina alfa en filamentos de mayor estabilidad, la de-tirosinación del residuo terminal y la acetilación de la lisina 40. Por otra parte, se ha demostrado que los cambios en la diferencia de potencial de la membrana plasmática (PMP) de células epiteliales inducen alteraciones en el citoesqueleto de actina y las uniones adherentes. Los trabajos de Chifflet y colaboradores de 2003, 2004 y 2005, y Evans 2019, demuestran que la despolarización del PMP (DPMP) provocan la pérdida del fenotipo epitelial del citoesqueleto de actina, pasando a formar estructuras características de migración. En 2009, Nin y colaboradores demostraron que la hiperpolarización del PMP (HPMP) induce la estabilización del fenotipo epitelial. Existe escasa información del efecto de cambios en el PMP sobre los microtúbulos y sus PTMs. En este trabajo se estudió el efecto de la DPMP y HPMP en células de endotelio vascular, sobre los microtúbulos, la de-tirosinación y la acetilación de la tubulina-alfa. Para modificar el PMP se utilizó la ecuación de Goldman. Esta determina que el voltaje de membrana depende de la concentración de iones extra e intracelulares y sus permeabilidades. De este modo, se indujo la DPMP y la

HPMP a través de la sustitución del NaCl extracelular por sales adecuadas o mediante ionóforos que indujeron el aumento de permeabilidad de iones específicos. Nuestros resultados sugieren que la DPMP induce la disminución de los microtúbulos en la zona subcortical de la membrana basolateral, así como la disminución de la acetilación y la detirosinación. Asimismo, los hallazgos sugieren que la HPMP provoca un incremento significativo de los microtúbulos en la zona de las uniones adherentes en la membrana basolateral, así como un incremento de la acetilación y detirosinación en dicho espacio subcelular. En conjunto, nuestros resultados muestran que el PMP modula no sólo el citoesqueleto de actina si no también los microtúbulos y algunos de las PTMs que median sus funciones. Los estudios realizados son consistentes con una asociación del fenotipo epitelial en células más hiperpolarizadas y fenotipo migratorio en células despolarizadas.

Póster #98

Modificaciones de la membrana basal del epitelio acinar mamario inducidas por AGEs: impacto en la expresión de genes de la cadena respiratoria

Ma. Agustina Faulord Sosa[1*], María Paula Frade[1], Mercedes Rodríguez-Teja[1], Adriana Fernandez-Fernandez[2],Lucia Pastro Cardoso[1]

[1] Laboratorio de Interacciones Célula-Ambiente, Departamento de Genética, Facultad de Medicina, Universidad de la República.

[2]Laboratorio de Bioactividad y Nanotecnología de Alimentos, Área Química de Alimentos, Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Química, Universidad de la República.

La membrana basal (MB) del tejido epitelial está compuesta por colágeno tipo IV, laminina y glicoproteínas, con la función de brindar soporte mecánico, abastecer de factores de crecimiento e hidratación a la célula, regulando la proliferación celular, la migración y la estructura del citoesqueleto. La acumulación de productos finales de la glicación avanzada (AGEs por sus siglas en inglés) altera la estructura de las proteínas entrecruzando los residuos de aminoácidos básicos. La unión de los AGEs a su receptor RAGE desencadena respuestas inflamatorias que promueven un ambiente pro-oxidante. Estas alteraciones estructurales y metabólicas están asociadas con el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles como diabetes tipo II, cáncer y alzheimer. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de AGEs entrecruzantes en cultivos 3D de acinos mamarios y los posibles cambios a nivel metabólico que desencadenan. La formación de AGEs en la MB y por lo tanto el entrecruzamiento de sus componentes, se realizó sembrando MB comercial con glicolaldehído, (MB R) seguido de una incubación a 37°C [1], y se utilizaron células epiteliales de mama MCF10A (no tumoral). Como control se utilizó la misma MB comercial sin entrecruzar (MB N). Los resultados mostraron que las células MCF10A cultivadas sobre MB N forman acinos y muestran un fenotipo epitelial

mientras que sobre MB R estas estructuras son menos frecuentes y en su lugar se observa un cambio en el fenotipo. Se extrajo ARN de los cultivos y por retrotranscripción se obtuvo cDNA que fue utilizado en PCR cuantitativa (qPCR). Los genes analizados corresponden a cada uno de los complejos proteicos que forman parte de la cadena respiratoria mitocondrial. Los resultados preliminares muestran un aumento en los niveles de expresión de estos genes.

Póster #99

AGEs y ADN: modificaciones estructurales y epigenéticas asociadas con el envejecimiento y cáncer y posible rol inhibitorio de uva tannat

Frade, María Paula[1]; Faulord, Agustina[1]; Pastro Lucía[1], Cappetta Mónica[1], Rodríguez-Teja Mercedes[1]

[1] Unidad Académica de Genética, Facultad de Medicina, Udelar

Los AGEs (*Advanced Glycation Endproducts*) son moléculas heterogéneas derivadas de la glicoxidación no enzimática de proteínas y ácidos nucleicos mediante la reacción de Maillard. Su acumulación durante el envejecimiento contribuye al desarrollo de enfermedades crónicas, incluido el cáncer de próstata, al afectar proteínas y ADN y activar receptores específicos. En el ADN, los AGEs ejercen efectos genotóxicos, mutagénicos y epigenéticos. Para estudiar esto, realizamos la reacción de Maillard in vitro con ADN genómico y concentraciones crecientes de glucosa o metilglioxal, observando cambios en la absorbancia UV-Vis y en la movilidad electroforética, indicativos de alteraciones estructurales y bioquímicas en el ADN. En tejido prostático, los AGEs se acumulan en la membrana basal (MB) de los acinos e inducen una transición epitelio-mesenquimal. Para analizar los cambios de expresión génica detrás de esto, cultivamos células epiteliales prostáticas sobre MB rigidizada con AGEs, simulando un microambiente envejecido. Los resultados preliminares muestran aumento de la metilación global del ADN, cuantificada por cromatografía líquida de alta eficacia, y cambios significativos en la expresión de las histonas H3C4 y H2AC15, así como de genes vinculados a la metilación del ADN mediante ARNseq. La incorporación de extracto de uva tannat a los cultivos sobre MB, el cual presenta efecto antiglicante, atenua los efectos previamente descritos inducidos por los AGEs. Estos hallazgos aportan al conocimiento de las bases patogénicas de los AGEs en el cáncer de próstata y sugieren una posible estrategia terapéutica.

Póster #100

Secuencias de ADN involucradas en el apareamiento y recombinación homóloga durante la meiosis

Mateo François[1,2], Ricardo Benavente[2], Rosana Rodriguez-Casuriaga[2], José Sotelo-Silveira[3, 4], Adriana Geisinger[1, 6]

1 Departamento de Genética, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), Montevideo, Uruguay 2 Departamento de Biología Molecular, IIBCE, Montevideo, Uruguay. 3 Departamento de Genómica, IIBCE, Montevideo, Uruguay 4 Departamento de Biología Celular y Molecular, Sección Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguay 6 Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

La espermatogénesis es el proceso de formación de espermatozoides; estas células serán todo lo que un organismo aportará a la siguiente generación, por lo que su correcta formación es fundamental para la conservación y prolongación de una especie. La meiosis es una de las etapas más importantes de la espermatogénesis; ésta es un proceso de división celular que implica una duplicación del ADN seguida de dos divisiones consecutivas (meiosis I y II), cuyo resultado son células haploides. Durante la profase de la primera división meiótica, ocurren dos eventos cruciales: el apareamiento y la recombinación de cromosomas homólogos. El primero es esencial para mantener el número cromosómico de la especie, mientras la segunda es fuente fundamental de biodiversidad para las especies con reproducción sexuada. Ambos procesos son mediados por una estructura proteica característica de meiosis, el complejo sinaptonémico (CS). En los mamíferos conocemos ocho proteínas que integran los CSs. Sin embargo, desconocemos las bases moleculares que permiten a los CSs mediar el reconocimiento, apareamiento y recombinación de cromosomas homólogos, ni si en este proceso están involucradas secuencias específicas de ADN, y mucho menos la identidad de las mismas. Se ha demostrado que algunas de las proteínas estructurales de los CSs, como SYCP3 y SYCP1, son capaces de unirse a ADN, pero se desconoce a qué secuencias. En el presente trabajo nos propusimos evaluar la existencia de secuencias específicas de ADN que interactúen con los CSs mediante ChIP-seq, empleando anticuerpos anti-SYCP1 y anti-SYCP3. Como resultado, observamos un enriquecimiento en elementos repetidos, principalmente SINEs para SYCP3 y, en menor medida, para SYCP1. La unión de elementos del CS a este tipo de repetidos podría implicar un nuevo tipo de funcionalidad para estas secuencias, hasta el momento consideradas muchas veces como ADN basura. Ambas proteínas mostraron una importante proporción de su señal en secuencias génicas y regiones promotoras, coincidiendo también con regiones accesibles de la cromatina (ATAC seq) y con señales de transcripción activa (ARN polimerasa II). Además, su señal correlacionó con γ-H2AX, marcador de rupturas de doble cadena, esenciales para la recombinación, así como también con proteínas de organización de la cromatina meiótica: REC8, RAD21L y CTCF. En conjunto, estos resultados nos acercan a una comprensión mayor de la estructura del CS y su relación con la cromatina, así como sus procesos asociados, los cuales son esenciales para todos

los organismos con reproducción sexuada y, sin embargo, tan poco conocidos hasta ahora.

Póster #101

Desarrollo de un modelo de silenciamiento inducible de CD147 en células de adenocarcinoma prostático de ratón TRAMP-C2

Melissa Pereira*, Rodrigo Martino-Kunsch, Mercedes Rodríguez-Teja.

Departamento de Genética, Facultad de Medicina, UdelaR.

En Uruguay, el cáncer de próstata (CaP) es la neoplasia de mayor incidencia en hombres. Durante la progresión hacia estadios avanzados, las células tumorales presentan un metabolismo predominantemente glucolítico (efecto Warburg), caracterizado por una elevada producción de lactato. La exportación de este metabolito depende principalmente de los transportadores de monocarboxilatos MCT1 y MCT4, cuya localización y estabilidad en la membrana plasmática requieren su asociación con la glicoproteína CD147 (*Basigin*, Bsg). Además de contribuir a la adaptación metabólica de las células tumorales, el lactato extracelular favorece la remodelación del microambiente tumoral y la modulación de la respuesta inmune, promoviendo un entorno inmunosupresor asociado a la progresión tumoral. En este contexto, este trabajo se propone generar una línea celular murina TRAMP-C2 con silenciamiento inducible de Bsg, que constituya una herramienta complementaria a los estudios realizados en líneas celulares humanas para investigar la interacción entre el metabolismo tumoral y la respuesta inmune en modelos murinos inmunocompetentes. Para ello, se diseñaron secuencias de oligonucleótidos tipo shRNA dirigidas contra el ARNm de Bsg de ratón y una secuencia control no específica (scramble). Estas secuencias fueron clonadas en el vector lentiviral inducible tet-pLKO-puro, un sistema "all-in-one" que integra los elementos necesarios para regular la expresión del shRNA mediante el represor TetR. Se obtuvieron partículas lentivirales recombinantes mediante la cotransfección en células HEK-293T del vector tet-pLKO-puro junto con los plásmidos de empaquetamiento. Posteriormente, la línea celular TRAMP-C2 fue transducida con las partículas lentivirales y se realizó una selección con puromicina para establecer líneas celulares estables con integración genómica del constructo. Como resultado de este trabajo se espera obtener líneas celulares estables con un sistema de silenciamiento inducible funcional. La eficiencia del silenciamiento será evaluada mediante RT-qPCR para cuantificar la expresión de Bsg a nivel de ARNm y mediante Western blot para evaluar los niveles de la proteína CD147 tras la inducción con tetraciclina. La generación de este modelo proporcionará una herramienta experimental para futuros estudios destinados a investigar el papel de *Basigin* en la interacción entre el tumor y el sistema inmune en modelos murinos de cáncer de próstata, complementando los estudios mecanísticos realizados en líneas celulares humanas y permitiendo evaluar procesos que requieren un sistema inmune funcional. Asimismo, permitirá superar las limitaciones de

los silenciamientos constitutivos, que pueden comprometer la viabilidad celular y dificultar el establecimiento de líneas celulares estables.

Póster #102

Producción recombinante de la proteasa RgpB de *Porphyromonas gingivalis* y búsqueda de inhibidores

Nicole Gebelin[1,2,3], Bruno Manta[2], Federico Carrión[1], Marcelo Comini[2], Martín Fló[1,4]

[1]Laboratorio de Inmunovirología y Unidad Biofísica de Proteínas, Institut Pasteur de Montevideo. [2]Laboratorio de Biología Redox de Tripanosomátidos, Institut Pasteur de Montevideo. [3]Unidad de Biología Celular, Institut Pasteur de Montevideo. [4]Unidad académica de Inmunobiología, Facultad de Medicina, UdelaR.

La bacteria *Porphyromonas gingivalis* es uno de los patógenos claves asociados al desarrollo y progresión de la periodontitis, una forma avanzada de enfermedad periodontal. Se caracteriza por ser una enfermedad inflamatoria e inmunológica, crónica, que conlleva la destrucción progresiva e irreversible de los tejidos de soporte dental. Las gingipaínas son proteasas de cisteína con especificidad por arginina (RgpA y RgpB) o por lisina (Kgp), responsables de la mayor parte de la actividad proteolítica extracelular de *P. gingivalis*. Son importantes factores de virulencia, estando involucrados en la degradación de proteínas y tejidos del hospedero, la adherencia y colonización de células epiteliales, la hemaglutinación y hemólisis, y la evasión de la respuesta inmune. Recientemente se han vinculado, junto a la infección por *P. gingivalis*, a otras afecciones sistémicas, como enfermedades cardiovasculares, enfermedad de Alzheimer, artritis reumatoide y resultados adversos del embarazo. Actualmente, la mayoría de los pacientes no resuelven su cuadro de periodontitis con los tratamientos no quirúrgicos disponibles, y requieren intervenciones quirúrgicas. Aun así, cerca del 15% persiste con enfermedad periodontal activa, reforzando la necesidad de terapias alternativas más eficaces. En los últimos años, ha habido un interés creciente por el desarrollo de inhibidores específicos de gingipaínas, como blancos para el tratamiento de la periodontitis y las enfermedades asociadas. El presente trabajo tiene como objetivo la producción recombinante de la proteasa de cisteína RgpB, como modelo de gingipaína, con el fin de estudiar una selección de compuestos con potencial de actuar como inhibidores mecanísticos de esta proteasa. Se expresó el zimógeno de la RgpB de forma heteróloga en *Escherichia coli*, implementando diferentes estrategias de expresión y purificación para obtenerla de forma soluble y activa, con un rendimiento de 5mg por litro de cultivo. Este es el primer reporte de expresión heteróloga exitosa de una gingipaína soluble y activa. A su vez, se alcanzó la expresión recombinante del zimógeno en la línea celular S2 de *Drosophila melanogaster*, siendo el primer reporte de su expresión en células de insecto. Se puso a punto un ensayo de actividad de la RgpB utilizando un

sustrato fluorogénico, que permitirá la futura caracterización bioquímica de la enzima junto con la evaluación de potenciales inhibidores *in vitro*. Se realizó una primera búsqueda de inhibidores *in silico*, pertenecientes a un espacio químico diferente a moléculas patentadas como inhibidores de gingipaínas. Este trabajo sienta las bases para la futura búsqueda y caracterización de moléculas inhibidoras de RgpB con potencial farmacológico.

Póster #103

Mega-ExM, a novel super-resolution microscopy approach for the study of the synaptonemal complex

Omar Ignacio García-Martínez[1,2], Ignacio Vega Vásquez[1], Rosana Rodriguez Casuriaga[2], Adriana Geisinger[2,3], Markus Sauer[1,4] and Ricardo Benavente[1,2]

1. Department of Biotechnology and Biophysics, Biocenter, University of Würzburg, Würzburg, Germany. 2. Department of Molecular Biology, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), Montevideo, Uruguay. 3.Department of Genetics, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), Montevideo, Uruguay. 4. Rudolf Virchow Center, Research Center for Integrative and Translational Bioimaging, University of Würzburg

The synaptonemal complex (SC) is a highly ordered proteinaceous structure that is essential for homologous chromosome pairing and recombination during meiosis. However, its intricate nanoscale architecture has remained only partially resolved due to the inherent limitations of conventional fluorescence microscopy. Although electron microscopy has historically been used to investigate SC ultrastructure, it lacks the molecular specificity required to localize individual SC proteins with high precision. To overcome these challenges, we have optimized and integrated multiple super resolution imaging strategies, including the newly developed Mega Expansion Microscopy (Mega-ExM) protocol in combination with NHS ester pan-labeling, multiplexed immunostaining, and cryosection-based sample preparation. Together, these approaches establish a robust workflow for three-dimensional, multicolor visualization of the SC with lateral resolutions of 2–10 nm using standard Airyscan confocal microscopy. More recently, we optimized Mega-ExM for juvenile (13 days post-partum) mouse testis cryosections, enabling high-resolution visualization of the earliest stages of SC assembly. Combined with NHS ester pan-labeling and multiplexed immunostaining, this approach allowed us to characterize the canonical organization of the SC while identifying a previously undescribed intermediate assembly structure. We are currently investigating this novel architecture and its biological significance using complementary molecular labeling strategies and genetic models, including SYCE1 mutant mice, which exhibit complete asynapsis while retaining axial element associations. These studies provide new insights into the molecular mechanisms governing SC assembly and meiotic chromosome synapsis. Collectively, these integrated imaging approaches have enabled detailed

ultrastructural analyses of the SC through the generation of high-resolution three dimensional reconstructions while preserving the native tissue environment. By bridging the gap between conventional fluorescence and electron microscopy, our work establishes a robust, accessible, and high-throughput imaging platform for the molecular mapping of large supramolecular protein complexes with unprecedented structural detail. Beyond providing a comprehensive framework for studying SC architecture, this platform offers a powerful strategy for investigating dynamic assembly processes and elucidating the structural basis of meiotic defects associated with infertility.

Póster #104

Caracterización bioquímica de la respuesta al estrés inducido por radiación UV en la bacteria antártica *Pseudomonas* sp. AU10

Patricia Opiolo**,** Hanna Zehnle, Cecilia Letona, Susana Castro-Sowinski, Juan Marizcurrena, César García Laviña.

Sección Bioquímica, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Udelar.

La radiación ultravioleta (UV) constituye uno de los principales factores de estrés ambiental. En la Antártida, el adelgazamiento de la capa de ozono y el efecto albedo incrementan la exposición a UV, ejerciendo una fuerte presión selectiva sobre la microbiota nativa. Como consecuencia, estos microorganismos han desarrollado mecanismos eficientes de protección y reparación del daño fotoinducido. Previamente, nuestro grupo aisló una colección de cepas bacterianas antárticas UV-resistentes, en las cuales se identificaron fotoliasas con elevada actividad fotoreparadora del ADN, demostrando su potencial biotecnológico y dando origen a la startup Antarka. Este trabajo tiene como objetivo caracterizar la respuesta celular al estrés inducido por radiación UV en Pseudomonas sp. AU10, el modelo del grupo, mediante un abordaje integrado de análisis bioquímicos y proteómicos diferenciales. Para ello, se desarrolló un sistema de irradiación basado en lámparas LED UVA/UVB/visible y filtros neutros para controlar la irradiancia y reproducir un espectro similar al solar. Tras evaluar distintos medios de cultivo, se seleccionó M9 con succinato como fuente de carbono, por su fotoestabilidad y capacidad de crecimiento de AU10 en óptimas condiciones. Los cultivos en fase exponencial se expusieron al UV, buscando inducir una respuesta fisiológica sin comprometer la viabilidad celular. Tras una exposición aguda al UV se observó una disminución transitoria <25% de células viables, seguida de recuperación en presencia de luz visible. Se realizaron ensayos fluorimétricos con resazurina para evaluar la actividad metabólica y la viabilidad celular. El análisis microscópico evidenció un fenotipo filamentoso compatible con respuesta SOS. La resistencia se caracterizó mediante curvas de sobrevida, análisis turbidimétrico y recuento de células totales determinándose la velocidad de muerte y la constante de inactivación por fluencia. Los parámetros de

supervivencia obtenidos evidenciaron una elevada tolerancia al UV de AU10. Se optimizó la obtención de extractos proteicos evaluando diferentes buffers de lisis, condiciones de sonicación y métodos de cuantificación. La mayor recuperación proteica y reproducibilidad se obtuvo utilizando un buffer Tris-HCl 100mM, urea 6M y CHAPS al 2%, combinado con sonicación suave y cuantificación por Bradford. La calidad de los extractos se verificó mediante SDS-PAGE. Los resultados obtenidos permitieron establecer un diseño experimental robusto para el análisis proteómico diferencial por LC-MS/MS del cual se esperan resultados preliminares próximamente. Este abordaje permitirá identificar proteínas sobreproducidas y mecanismos moleculares asociados a la respuesta al estrés UV, contribuyendo al conocimiento de la adaptación de bacterias antárticas y a la identificación de activos de interés biotecnológico.

Póster #105

Aproximación *in cellula* para la selección de agroalimentos con propiedades antiinflamatorias y antioxidantes.

Rafael Velazco[1,2], Mikaela Rajchman[1,2], Aníbal Reyes[1,2], Mauricio Mastrogiovanni[1,2,3], Adrián Aicardo[1,2,4], Cecilia Chavarría[1,2], Esteban Vicente[5], Joanna Lado[5] y Rafael Radi[1,2,3].

[1] Programa en alimentos y Salud Humana (PAyS), Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay.[2] Centro de investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay.[3] Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay.[4] Departamento de Nutrición Clínica, Escuela de Nutrición, Universidad de la República, Uruguay.[5]INIA Salto Grande, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Uruguay.

Tradicionalmente, la selección de variedades vegetales se ha centrado en el rendimiento, poscosecha y características sensoriales, omitiendo sus efectos en la salud humana. A su vez, la actividad antioxidante se evalúa comúnmente mediante ensayos in vitro que no consideran la biodisponibilidad, la biotransformación ni los efectos nutrigenómicos. Dado que los compuestos bioactivos ejercen su rol citoprotector modulando vías de señalización intracelular y la expresión de genes clave, este trabajo se enfoca en una aproximación con mayor relevancia biológica. Este trabajo propone desarrollar y validar un ensayo de tamizaje in cellula para incorporar la evaluación de la actividad biológica (i.e. efectos antiinflamatorias y antioxidantes) como criterio de selección en los programas de mejoramiento genético de agroalimentos en Uruguay. Como modelo de estudio se emplean variedades y genotipos avanzados de boniato (Ipomoea batatas) del programa de mejoramiento del INIA, incluyendo materiales de pulpa crema (criollos), naranja (zanahoria) y violeta (antociánicos). El trabajo aborda la caracterización analítica y la evaluación celular de estos materiales. Con este fin, se optimizaron métodos de extracción y se determinaron los sistemas de solventes más eficientes: etanol al 62% y ácido fórmico al 0,07% en agua para polifenoles y antocianos, y una mezcla de acetona y etanol en partes iguales para carotenoides. Con los extractos se realizó la caracterización

química de compuestos bioactivos presentes mediante técnicas analíticas avanzadas, empleando espectrofotometría, cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS). Como paso previo indispensable a las pruebas de actividad en células, se realizaron ensayos de toxicidad celular exponiendo cultivos de células epiteliales de colon humano (i.e. HT-29) a diferentes concentraciones de los extractos en DMSO. Esto permitió determinar el rango de concentraciones no tóxicas, desde 0,25 hasta 1 mg/ml, para garantizar la viabilidad celular en los ensayos funcionales posteriores. En el rango de concentraciones seguras, se utilizaron líneas reporteras HT-29 NF-kB-hrGPF (Mastropietro et al, 2015), derivadas de HT-29 transfectadas con proteína verde fluorescente (GFP) para evaluar modulación biológica. Específicamente, se evaluó la capacidad de los extractos para modular la vía de activación del NF-kB tras la estimulación con TNF-α. Con esta metodología se busca discriminar las variedades de boniato con mayor capacidad protectora celular. Los resultados permitirán incorporar un parámetro de valor biológico en las etapas de selección de clones y parentales de interés, fortaleciendo el desarrollo de alimentos funcionales y promoviendo la salud de la población.

Póster #106

Influencia de la proteína Fstl1 secretada por los adipocitos en la modulación del microambiente inflamatorio del tejido adiposo blanco

Romina Libisch[1]**;** Valentina Perez; Leonardo Santos[1]; Carlos Escande[1]

[1]Laboratorio de Patologías del Metabolismo y Envejecimiento, Institut Pasteur de Montevideo.

La obesidad es una enfermedad multifactorial caracterizada por la acumulación excesiva de tejido adiposo blanco y un estado de inflamación crónica de bajo grado que favorece el desarrollo de alteraciones metabólicas, como resistencia a la insulina y enfermedad hepática grasa. Además de su función como reservorio energético, el tejido adiposo constituye un órgano endocrino e inmunológico cuya homeostasis depende del equilibrio entre poblaciones celulares con funciones pro- y antiinflamatorias. Durante la obesidad, la expansión del tejido adiposo promueve alteraciones celulares y el reclutamiento de células inmunes, contribuyendo al establecimiento de un microambiente proinflamatorio. En este contexto, la glicoproteína Follistatin-like 1 (Fstl1) ha emergido como un posible modulador de la inflamación asociada a la obesidad. Su expresión se encuentra aumentada en el tejido adiposo visceral en individuos con obesidad y se ha relacionado con la activación de vías inflamatorias. El objetivo de este trabajo fue estudiar el posible papel de Fstl1 derivada del tejido adiposo en la modulación de la respuesta de macrófagos y del microambiente inflamatorio del tejido adiposo visceral. Se utilizaron abordajes complementarios in vitro y ex vivo. Se evaluó el efecto de Fstl1 recombinante (rFstl1), sola o en combinación con lipopolisacárido (LPS), sobre macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) y células RAW 264.7, mediante análisis de expresión génica e

inmunofluorescencia. Asimismo, se estudió la respuesta de macrófagos frente a medios condicionados obtenidos de explantes de tejido adiposo perigonadal de ratones. En paralelo, se caracterizaron las poblaciones mieloides del tejido adiposo visceral de ratones wild type (WT) y deficientes en Fstl1, alimentados con dieta estándar y dieta alta en grasa.

La estimulación con rFstl1 mostró una tendencia al incremento de marcadores inflamatorios, mientras que su combinación con LPS moduló la respuesta inflamatoria de las células RAW 264.7 de manera dependiente de la concentración y del tiempo de estimulación. Asimismo, se observaron diferencias en la respuesta de los macrófagos tratados con medios condicionados provenientes de explantes de tejido adiposo, dependiendo del tipo celular utilizado. El análisis del tejido adiposo visceral permitió además explorar diferencias en las poblaciones mieloides asociadas al genotipo y al tipo de dieta. En conjunto, estos resultados preliminares sugieren que Fstl1 podría participar en la modulación de la respuesta inflamatoria de los macrófagos y en la composición del microambiente inmune del tejido adiposo durante la obesidad. Estos hallazgos aportan evidencia inicial sobre un posible papel de Fstl1 en la comunicación entre el tejido adiposo y las células inmunes.

Póster #107

Modulación diferencial del estrés oxidativo citoplasmático y mitocondrial sobre los efectos inotrópicos del monóxido de carbono en corazón aislado y cardiomiocitos ventriculares

Rincón, Sabrina[1*]; Montilla, Francisco[1*], Martínez, Luis[1*], Vázquez Varela, Manuel[1*], Escobar, Skylix[1*], Demarco, Agustin[1*], Cardozo, Romina[1#] y Ferreira, Gonzalo[1#].

[1] Laboratorio de Canales Iónicos, Membranas Biológicas y Señalización Celular. Unidad Académica de Biofísica, Facultad de Medicina.

Autor de correspondencia * Igual contribución al trabajo.

El monóxido de carbono (CO), además de su reconocida toxicidad, actúa como una molécula de señalización endógena cuyos efectos cardiovasculares dependen de la concentración y del estado redox celular. El presente trabajo evaluó los efectos agudos del CO sobre la función mecánica cardíaca y la homeostasis del calcio intracelular, así como el papel protector de antioxidantes con diferente localización subcelular.Se utilizaron corazones aislados de rata perfundidos mediante la técnica de Langendorff y cardiomiocitos ventriculares aislados. El CO fue administrado mediante el donador CORM-2 en concentraciones de 0, 1, 3, 7, 14 y 20 µM. Como estrategia de protección frente al estrés oxidativo citoplasmático se empleó N-acetilcisteína (NAC, 750 µM), mientras que para evaluar la participación del estrés oxidativo mitocondrial se utilizó quercetina. En cardiomiocitos aislados, las variaciones del calcio intracelular fueron

determinadas mediante microscopía de fluorescencia utilizando Fluo-3 AM. CORM-2 produjo una respuesta inotrópica bifásica en el corazón aislado. Se observó un incremento significativo del inotropismo a bajas concentraciones, con un máximo entre 1-3 µM, en situación control. En 750 µM NAC, hubo un desplazamiento del pico de respuesta hacia concentraciones cercanas a 14 µM y una disminución del efecto a concentraciones inferiores y superiores, configurando un desplazamiento de la curva dosis-respuesta a mayores dosis. Este comportamiento fue reproducido en cardiomiocitos aislados, donde las transientes de Ca^{2+} intracelular mostraron una variación paralela a los cambios observados en la contractilidad, sugiriendo que la modulación del manejo del calcio constituye un mecanismo central de la respuesta al CO. La administración de NAC atenuó las alteraciones funcionales inducidas por CORM-2, apoyando la participación del estrés oxidativo citoplasmático en los efectos del CO. Por su parte, la quercetina mostró una marcada dependencia de la dosis: mientras que concentraciones moderadas ejercieron un efecto protector desplazando la curva dosis-respuesta de CORM-2, la concentración de 40 µM resultó francamente cardiotóxica, provocando la pérdida irreversible de la función mecánica del corazón aislado. En conjunto, estos resultados indican que los efectos cardíacos del CO dependen críticamente del estado redox celular y de la regulación de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular. Asimismo, demuestran que la protección antioxidante difiere según el compartimento celular involucrado, destacando la importancia de considerar la localización subcelular del estrés oxidativo para el desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas frente a la intoxicación por CO.

Póster #108

El largo del cilio primario en células MDCK depende de la diferencia del potencial de membrana plasmática

Mateo Schaffner[1], Cristian Justet[1]

[1] CEINBIO, Dpto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, UdelaR

El cilio primario (CP) es un organelo presente en la mayoría de las células eucariotas. Cada célula cuenta habitualmente con un único CP no móvil. Su axonema está formado por 9 dobletes de microtúbulos sin doblete central, a diferencia de las cilias motoras. Su función principal es sensar y traducir señales extracelulares. Se proyecta desde el centríolo madre hacia el exterior. Es una estructura muy dinámica que se desensambla durante la mitosis para luego reensamblarse en la fase G1. Por otra parte, en células epiteliales en cultivo e in situ se ha encontrado que el citoesqueleto de actina y las uniones adherentes responden a los cambios en la diferencia del potencial de membrana (PMP). La despolarización del PMP (DPMP), induce la pérdida del fenotipo epitelial, la ruptura de las uniones intercelulares y estimula la migración, en forma dependiente de la PKA y de ROCK. Mientras que el efecto opuesto, la hiperpolarización del PMP (HPMP) provoca la estabilización de las uniones adherentes y el refuerzo del anillo subcortical de

actomiosina. Estudios preliminares de nuestro grupo sugieren que el PMP también modula los microtúbulos y sus modificaciones postraduccionales como la acetilación de la lisina 40 de la tubulina alfa, modificación especialmente abundante en los microtúbulos del CP. En este trabajo, buscamos determinar si los cambios del PMP inducen alteraciones del cilio primario en células epiteliales. Para ello se utilizó la ecuación de Goldman, según la cual el PMP depende de la concentración de los iones intra y extracelulares y de sus permeabilidades de membrana. De este modo, mediante la sustitución del NaCl extracelular por sales adecuadas, es posible inducir la DPMP y la HPMP en células en cultivo, en particular en este trabajo, células epiteliales MDCK. El cilio primario fue evidenciado por inmunofluorescencia específica para tubulina acetilada y la proteína específica ARL13B y utilizando el plugin CiliaQ de ImageJ se analizaron parámetros estructurales del CP. Se encontró que los tratamientos hiperpolarizantes provocaron una reducción significativa del largo del CP mientras que la DPMP indujo un aumento. Los resultados utilizando distintos inhibidores, sugieren que los cambios son dependientes de la concentración intracelular de calcio y de la fosforilación de la proteína estabilizadora de microtúbulos Tau.

Póster #109

Modulación del voltaje de la membrana plasmática como método para mejorar la calidad del endotelio corneal durante la preservación para trasplante

Daniel Galarza[1], Maira Souto[1], Cristian Justet[1]

[1] CEINBIO, Dpto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, UdelaR

La córnea es el órgano más trasplantado a nivel local y mundial. Un factor muy crítico en el éxito del trasplante es la calidad del endotelio corneal. Las células de este tejido, al igual que las neuronas, dejan de proliferar muy pronto luego del nacimiento. De este modo, la densidad del endotelio corneal define si el órgano puede ser usado para trasplante. En Uruguay, las córneas son preservadas refrigeradas a 4°C hasta 7 días. Estudios de diversos autores han mostrado que, la preservación por refrigeración en medio de cultivo, provoca la desorganización de las uniones intercelulares y el citoesqueleto, comprometiendo sus funciones. Por otra parte, en trabajos en células endoteliales en cultivo, se ha demostrado que tanto la despolarización del potencial de membrana plasmática (DPMP) como la hiperpolarización (HPMP) modulan las uniones adherentes y el citoesqueleto de actina. Por un lado, la DPMP induce el desensamblaje de la cadherina y la desorganización del citoesqueleto de actina, observándose características de una transición epitelio -mesénquima. Por otro lado, la HPMP induce estabilización de las uniones adherentes y el citoesqueleto de actina, permitiendo que las células endoteliales resistan mejor los desafíos como la falta de calcio extracelular. El objetivo de este trabajo es determinar si la HPMP puede mejorar la calidad del endotelio

corneal en cultivos organotípicos refrigerados durante 7 días. Se trabajó con hemi-botones de córnea de bovino siguiendo los protocolos de Wenzel (2019), que contienen el endotelio corneal, la membrana de descement y parte del estroma. Los hemibotones fueron cultivados en medio de cultivo refrigerado durante 7 días. Se separaron hemibotones control e hiperpolarizados. Cada día se sometió los cultivos a una solución control y una hiperpolarizante durante 1 hora. Para ello se tuvo en consideración la ecuación de Goldman, según la cual el PMP depende de la concentración de los iones intra y extracelulares y de sus permeabilidades de membrana. De este modo, mediante la sustitución del NaCl extracelular por sales adecuadas, es posible inducir la HPMP. El estado de las uniones se analizó por inmunofluorescencia. Nuestros resultados sugieren que luego de la incubación los endotelios corneales que fueron hiperpolarizados tienen mayor acumulación de cadherina y actina en la periferia que los hemibotones control. Asimismo, se observó menor despolimerización de los microtúbulos. En conjunto nuestros resultados sugieren que la HPMP intermitente de las córneas para trasplantes podría ser un método útil para mantener el fenotipo epitelial del endotelio corneal.

Póster #110

Secuenciación con nanoporos de paneles génicos como estrategia diagnóstica rápida de hipercolesterolemia familiar.

Eliana Tejera[1], Fernanda Domínguez[1], Alejandro Cuesta[2], Laura Garre[2], Silvana Pereyra[1], Santiago Fontenla[1], Victor Raggio[1], María Ximena Reyes[2], José Tort[1], Nicolás Dell'Oca[1]

[1] Unidad Académica de Genética, Facultad de Medicina, UdelaR. [2] Comisión Honoraria para la Salud Cardiovascular

En Uruguay la Enfermedad Arterial Coronaria (EAC) es una de las principales causas de muerte debida a enfermedades cardiovasculares, con repercusiones sociales y económicas. La Hipercolesterolemia Familiar (HF) es la principal causa genética de EAC. La HF es un trastorno genético de alta prevalencia caracterizado por niveles elevados de colesterol desde el nacimiento causado principalmente por mutaciones en los genes *LDLR, ApoB y PCSK9* y en menor medida por variantes en genes llamados secundarios (LDLRAP1, APOE, LIPA, ABCG5 y ABCG8). A pesar de su impacto clínico, la enfermedad sigue siendo subdiagnosticada en parte por altos costos del diagnóstico genético. En este trabajo, proponemos optimizar una estrategia diagnóstica rápida y de bajo costo, basada en la secuenciación de lecturas largas usando tecnología Oxford Nanopore (ONT). Diseñamos primers para generar amplicones de 8000 y de 4000 pares de bases (pb) para evaluar el rendimiento de distintos protocolos de secuenciación disponibles para ONT para todos los genes causantes. Logramos amplificar del 80% de

los fragmentos de 4000 pb y el 86% de los de 8000 pb. Como primera aproximación, la secuenciación permitió identificar variantes en genes LDLR, PCSK9 y LDLRAP1. Como perspectiva, estamos diseñando nuevas estrategias para secuenciar en forma completa todos los genes e identificar las variantes patogénicas. Una vez finalizada la optimización extenderemos el análisis a pacientes seleccionados.

Póster #111

Follistatin-like 1 modula la señalización de ERK1/2 mediada por BMP4 durante la ciliogénesis y la diferenciación de preadipocitos

Leonardo Santos[2], Lucía Guggeri[1], Søren Tvorup Christensen[3], Carlos Escande[2], José L. Badano[1], Victoria Prieto-Echagüe[1]

[1] Laboratorio de Genética Molecular Humana, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay.
[2] Laboratorio de Patologías del Metabolismo y el Envejecimiento, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay. [3] Departamento de Biología, Sección de Biología y Fisiología Celular, Universidad de Copenhague, Copenhague, Dinamarca.

Follistatin-like 1 (FSTL1) es una glicoproteína secretada implicada en diversos procesos biológicos, incluidos el desarrollo, las enfermedades cardiovasculares, la inflamación y la obesidad. Si bien FSTL1 se ha vinculado con múltiples vías de señalización, los mecanismos moleculares que sustentan sus funciones biológicas, incluidos sus mediadores intracelulares y receptores, aún no se comprenden por completo. Previamente, identificamos a FSTL1 como un regulador extracelular de la longitud del cilio primario y demostramos que la modulación del eje FSTL1/cilio influye en la diferenciación de preadipocitos, un proceso relevante tanto para la obesidad como para las ciliopatías. Este trabajo tiene como objetivo identificar mediadores intracelulares de la función de FSTL1 en la ciliogénesis y la adipogénesis. Utilizando células humanas de epitelio pigmentario de retina (hTERT-RPE1) y preadipocitos murinos (3T3-L1), analizamos la activación de las quinasas ERK1/2, la longitud del cilio primario y la adipogénesis. Los experimentos se realizaron tras el silenciamiento de FSTL1, la inhibición farmacológica de la vía ERK1/2 y la estimulación con la proteína morfogenética ósea 4 (BMP4). La depleción de FSTL1 aumentó la fosforilación de ERK1/2 y redujo la longitud de los cilios primarios, mientras que la inhibición de ERK1/2 revirtió los defectos de ciliogénesis causados por el silenciamiento de FSTL1. El tratamiento con BMP4 extracelular reprodujo los efectos de la depleción de FSTL1 sobre la longitud ciliar y la activación de ERK1/2. Además, FSTL1 extracelular atenuó tanto la señalización canónica de BMP4, mediada por SMAD1/5/9, como su señalización no canónica, mediada por ERK1/2. Durante la adipogénesis, la inhibición de ERK1/2 mediante U0126 alteró la dinámica ciliar y retrasó la diferenciación, lo que sugiere una relación funcional entre la regulación ciliar dependiente

de ERK y la progresión adipogénica. En conjunto, nuestros resultados identifican a ERK1/2 como mediador de la ciliogénesis dependiente de FSTL1 y respaldan un modelo en el cual FSTL1 extracelular contrarresta funcionalmente la señalización de BMP4, antes de la activación de ERK1/2.

Póster #112

The use of Benzonase to produce ribosome footprints simplifies translational levels quantification by Ribo-seq

Guillermo Eastman[1,2], George S Bloom[1,3,4], José R Sotelo-Silveira[2,5]

[1] Department of Biology, University of Virginia, Charlottesville, VA 22904, United States.

[2] Departamento de Genómica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Ministerio de Educación y Cultura, Montevideo 11600, Uruguay.

[3] Department of Neuroscience, University of Virginia, Charlottesville, VA 22903, United States. [4] Department of Cell Biology, University of Virginia, Charlottesville, VA 22903, United States.

[5] Sección Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo 11400, Uruguay.

Gene expression quantification through genomics methods is crucial for understanding diverse biological contexts. Among these methods, ribosome profiling (Ribo-seq) stands out as a valuable tool for uncovering post-transcriptional gene expression regulation by providing a comprehensive view of the translatome. While current protocols are time intensive with limited variations, we introduced the use of the Benzonase enzyme to generate ribosome footprints from a polysome-enriched fraction, streamlining the workflow and reducing time, cost and potential sources of bias. Comparing translatome from Benzonase- and RNAse I-derived footprints reveals minimal differences, with both separating from RNA-seq-based transcriptome quantification. Benzonase acts more gently on ribosomes, yielding larger footprints and a weaker triplet periodicity compared to RNAse I, while enabling its application to low-input samples. We further demonstrate Ribo-seq application in primary neuronal cultures, using Benzonase to digest the post mitochondrial supernatant, thereby bypassing the labor-intensive ribosome/polysome purification step. The introduction of such protocol variations for Ribo-seq, especially for challenging low-input samples, offers a significant advancement of this resource for the community.