

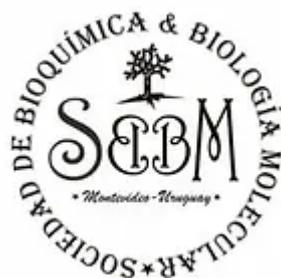
Libro de resúmenes



17 y 18 de Octubre del 2024

Torre de las Telecomunicaciones de ANTEL

Montevideo, Uruguay



Presentaciones orales seleccionadas de resúmenes

Mesa 1: Modificaciones post-traduccionales de biomoléculas

Glutación transferasas humanas catalizan la reacción entre el ácido nitrooleico y glutación

Martina Steglich¹, Sonia Salvatore², Nicole Larrieux³, Joaquín Dalla Rizza³, Ari Zeida⁴, Alejandro Buschiazco³, Francisco Schopfer², Beatriz Alvarez¹, Lucía Turell¹

¹Laboratorio de Enzimología, Facultad de Ciencias and Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad de la República, Uruguay, ²Department of Pharmacology and Chemical Biology, University of Pittsburgh School of Medicine, United States, ³Unidad de Cristalografía de Proteínas, Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay, ⁴Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina and Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Los nitroalquenos derivados de ácidos grasos (NO₂FAs) son compuestos de formación endógena que están siendo clínicamente desarrollados para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y fibróticas. Ejercen efectos citoprotectores al regular la actividad de proteínas diana mediante reacciones de adición de Michael con tioles críticos. La adición de NO₂FAs a GSH da lugar a la formación de aductos que luego son exportados fuera de la célula. Esta constituye una de las principales vías de metabolización de NO₂FAs. Las glutación transferasas (GSTs) son enzimas que participan en la metabolización de compuestos hidrofóbicos, catalizando su reacción con GSH. Un reporte previo no encontró evidencia en la catálisis utilizando ácido nitrooleico (NO₂OA). En este trabajo evaluamos si cinco isoformas de GST humanas (A4, M1, M2, M4, P1) catalizaban la adición de GSH a NO₂-OA, midiendo la formación del aducto GS-NO₂-OA por HPLC-MSMS (635.3/506.2). Se observó catálisis mayoritariamente con GST M1 y GST A4, siendo GST A4 la que logró la mayor cantidad de aducto formado en un tiempo dado, comparado con GST M1. Se realizó un análisis cinético usando distintas concentraciones de GST M1 (0.5-2.5 μM) o GST A4 (0.15-1 μM) y se midió el consumo de NO₂OA en un espectrofotómetro de flujo detenido (2 mM GSH, 20 μM NO₂OA, 25 °C, pH 7.4). La aceleración de la reacción entre GSH y NO₂OA fue 8.9 x 10⁵ M⁻¹ para GST M1 y 4.6 x 10⁶ M⁻¹ para GST A4. Recientemente, resolvimos la estructura cristalográfica de GST M1 en complejo con el aducto GS-NO₂-OA en el sitio activo, con una resolución de 2.55Å. También realizamos un modelo por homología para obtener la estructura de GST A4 en complejo con el aducto. De comparar ambas estructuras surge que las regiones que unen la cadena del ácido graso son particularmente distintas. Esto lleva a que GST A4 presente posibles puntos de interacción que ayudan a posicionar al ácido graso en el sitio activo mientras que GST M1 presenta interacciones pobres con dicha porción. Estos hallazgos son de relevancia biológica ya que la formación de aductos con GSH representa una vía principal de inactivación de NO₂OA, impactando en sus acciones señalizadoras.

Inactivación oxidativa de la glutamina sintetasa humana: mecanismos bioquímicos *in vitro* y estudios a nivel celular

Marcela Haberkorn^{1,2}; Nicolás Campolo^{1,2}; Mauricio Mastrogiovanni^{1,2}; Silvina Bartesaghi¹; Rafael Radi^{1,2}

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

La glutamina sintetasa (GS) es una enzima clave del metabolismo del nitrógeno que cataliza la síntesis ATP-dependiente de glutamina a partir de glutamato y amonio. Altamente expresada en astrocitos, desempeña un papel central en el ciclo glutamato-glutamina, encargado de la detoxificación de neurotransmisor de las sinapsis glutamatérgicas. Por ende, alteraciones en sus niveles de expresión o actividad pueden resultar en una severa disfunción astrogliar, comprometiendo la supervivencia neuronal. Estudios previos reportaron una asociación entre la pérdida de actividad GS y la enfermedad de Alzheimer (AD); dicha pérdida de actividad también mostró una correlación con el grado de modificación oxidativa experimentado por la proteína. Recientemente, nuestro grupo demostró que la inactivación oxidativa de la GS humana (HsGS) por peroxinitrito (ONOO⁻) ocurre como resultado de la acumulación de numerosas modificaciones post-traduccionales a lo largo de la cadena proteica. En particular, varios residuos de tirosina (Tyr) fueron identificados como importantes blancos de nitración.

Para comprender mejor el papel de estas modificaciones sobre la pérdida de actividad enzimática, expresamos y purificamos HsGS wt recombinante y dos mutantes sitio-específicas de la misma, en las cuales se sustituyó un residuo de Tyr identificado previamente como blanco preferencial de nitración (Tyr171 y Tyr283), por una fenilalanina, insensible a la misma. A continuación, se expuso a las diferentes variantes proteicas a ONOO⁻, y se las sometió a subsiguientes estudios comparativos para evaluar su sensibilidad diferencial frente a la inactivación oxidativa. Además, para tener una primera aproximación al estudio *in vivo* de este fenómeno, utilizamos un modelo celular de glioblastoma humano (U87-MG), el cual fue expuesto a ONOO⁻ para evaluar las consecuencias sobre la actividad y modificación de la GS endógena.

Las dos mutantes de HsGS demostraron ser sensibles a la inactivación oxidativa; para HsGS Y171F, se observó una mayor susceptibilidad frente a la inactivación, sugiriendo un rol protector para la modificación en dicho aminoácido. Para Y283F no se observaron diferencias en la susceptibilidad respecto a la enzima wt. Un subsiguiente análisis por HPLC-MS/MS-MRM reveló que la remoción de cualquiera de las dos Tyr evaluadas provoca un incremento de los niveles de nitración en sitios alternativos.

Estos resultados apoyan la noción de que la inactivación de la HsGS por ONOO⁻ no depende de la nitración de un único residuo de Tyr (171 o 283), sino que es el resultado de la acumulación de múltiples eventos de oxidación en diferentes sitios a lo largo de la proteína.

Mesa 2: Biología Celular y Molecular Vegetal

Generación y caracterización molecular de mutantes PpBAG mediante CRISPR/Cas

Santiago Rondán¹, Laura Saavedra^{2,3} y Alexandra Castro¹

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

Actualmente el cambio climático representa uno de los mayores desafíos ambientales con consecuencias profundas y generalizadas para diferentes ecosistemas y por ende para la sociedad humana. El cambio climático se manifiesta a través de fenómenos extremos como la alteración de los patrones de precipitaciones, la acidificación de los océanos y el aumento de las temperaturas globales. Estas variaciones climáticas afectan directamente al crecimiento de los cultivos, lo que puede tener consecuencias devastadoras para la producción de alimentos. Entender cómo las plantas toleran estas condiciones adversas es vital para desarrollar estrategias que mitiguen el impacto del cambio climático. La familia Bcl-2-associated athanogene (BAG) es un grupo evolutivamente conservado de co-chaperonas que regulan diversos procesos, entre ellos la muerte celular programada (PCD) y las respuestas al estrés. Estudios recientes han identificado el papel de los genes BAG de las plantas en estos procesos. Sin embargo, su función en la tolerancia al estrés, especialmente en plantas primitivas como los musgos, sigue sin explorarse. Nuestra investigación previa sobre *Physcomitrium patens* proporcionó información sobre la estructura, organización y perfiles de expresión de los genes BAG bajo varios tratamientos de estrés. Identificamos diez genes PpBAG y observamos un aumento significativo de cuatro de ellos (PpBAG1-3 y PpBAG8) en respuesta al estrés térmico y a la recuperación, acompañado de un aumento de la expresión de genes autofágicos como ATG8s y NBR1. Para investigar más a fondo, utilizamos la tecnología CRISPR/Cas9 para generar mutantes knockout para PpBAG1-3, que no tienen intrón y comparten una alta identidad de secuencia nucleotídica. Diseñamos ARNs guía dirigidos a estos genes y los clonamos en un plásmido que contenía casetes de expresión Cas9 y sgRNA, junto con marcadores de resistencia a kanamicina o higromicina. Estas construcciones se utilizaron para transformar *P. patens* de tipo salvaje y una línea Atg8:GFP. Se examinaron las plantas regeneradas en busca de mutaciones mediante secuenciación de Sanger. Actualmente, estamos llevando a cabo la caracterización fenotípica de los mutantes para dilucidar el papel de los genes PpBAG en la adaptación al estrés y los mecanismos de PCD. Esta investigación tiene como objetivo mejorar nuestra comprensión de las bases genéticas de la tolerancia al estrés en las plantas, contribuyendo al desarrollo de cultivos con mayor resiliencia al cambio climático.

Presencia y distribución de los cuatro patógenos asociados al Achaparramiento del maíz en el litoral del Uruguay

Ana Altieri¹, Horacio Silva², Esteban Hoffman³, Ximena Cibilis⁴, Silvina Stewarts⁴, Inés Ponce de León¹ y Astrid Agorio¹

¹Instituto de investigaciones biológicas Clemente Estable. ²Facultad de Agronomía. ³Unicampo Uruguay. ⁴Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias

El Achaparramiento del maíz es una enfermedad grave que afecta la producción de maíz en las Américas y es causada por un complejo de patógenos transmitidos por el insecto *Dalbulus maidis* (chicharrita). Estos patógenos incluyen *Spiroplasma kunkelii*, que causa el achaparramiento espigado; *Candidatus Phytoplasma*, responsable del enanismo del maíz; el Virus Rayado Fino del Maíz (MRFV), que provoca rayado fino en las hojas; y el Virus del Mosaico Estriado del Maíz (MSMV), que induce mosaicos y estrías en el follaje.

La chicharrita puede transportar los patógenos y desplazarse largas distancias, además de sobrevivir de 2 a 3 meses sin alimentarse, facilitando la dispersión de la enfermedad. El aumento de áreas cultivadas de maíz, la supervivencia de maíces guachos que proporcionan alimento y refugio para la chicharrita en invierno, y sobre todo los inviernos suaves de los últimos dos años, han favorecido la supervivencia del insecto y contribuido a la expansión de la enfermedad desde el norte hacia el sur de Argentina y Brasil. En Argentina, por ejemplo, se han reportado en los últimos años pérdidas de rendimiento por la enfermedad de hasta un 90%. A comienzos del 2024, se alertó sobre la presencia de síntomas en Uruguay y en otoño del mismo año nuestro laboratorio, en colaboración con Unicampo Uruguay, Facultad de Agronomía e INIA, confirmó la existencia de los cuatro patógenos en el territorio nacional.

Se analizaron muestras de 10 chacras ubicadas en los departamentos de Paysandú, Río Negro y Colonia. Mediante PCR sobre ADN genómico y RT-PCR sobre ADNc se estudió la presencia de los patógenos. En todas las chacras estudiadas se detectaron patógenos, entre uno a cuatro de ellos. El patógeno con mayor prevalencia fue el *Phytoplasma*, seguido en orden de prevalencia por *Spiroplasma*, MRFV y MSM. Los datos obtenidos se verificaron por secuenciación Sanger de los productos de PCR. Con el fin de obtener indicios del origen de la enfermedad en Uruguay, se realizó un estudio filogenético con el gen ribosomal 16S de *Phytoplasma* que se mostrará en la presentación.

Dado el impacto significativo de esta enfermedad en la productividad del maíz, es fundamental profundizar en el conocimiento sobre los patógenos presentes en Uruguay. Como continuación de este trabajo se estudiará la presencia y distribución de los cuatro patógenos en un mayor número de chacras con síntomas de Achaparramiento del maíz distribuidas por todo el país durante la zafra 2024/2025.

Mesa 3: Biología Celular y Molecular Animal

Estudio de la dinámica celular en distintas condiciones de estrés en células tumorales

Felipe Parietti¹, Magdalena Millán¹, Jimena Hochmann², Miguel Arocena¹

¹Departamento de Biología Odontológica, Facultad de Odontología, UdeLaR. ²Departamento de Diagnóstico en Patología y Medicina Oral, Facultad de Odontología, UdeLaR.

El estrés celular produce múltiples cambios en la fisiología celular, que permiten adaptarse y responder a cambios en el microambiente, o bien desencadenan procesos de muerte celular, como apoptosis o necrosis.

En el presente trabajo se realizaron registros de cultivos de líneas celulares derivadas de carcinoma oral, Cal27, bajo el efecto de diferentes tratamientos que inducen estrés celular, utilizando un microscopio holotomográfico Nanolive 3D Cell Explorer que permite realizar análisis detallado de las dinámicas celulares en respuesta a los distintos tratamientos de forma "label-free".

Los registros obtenidos revelaron cambios sustanciales en el comportamiento y la motilidad celular, observándose una detención completa de la motilidad celular como una respuesta temprana en todos los casos, más allá de las respuestas dispares según el tratamiento empleado. Como tratamiento inductor de apoptosis, usamos cisplatino 10 μ M, y observamos que, en todas las células que sufren cambios morfológicos típicos del proceso apoptótico, la detención de la motilidad ocurre varias horas antes, pese a que los niveles de ATP mitocondrial se mantienen en niveles altos hasta bien iniciado el proceso de apoptosis. Como tratamiento inductor de necrosis, usamos rotenona 1 μ M y, del mismo modo, observamos que la motilidad celular cesa mucho antes de que aparezcan rasgos típicos de un proceso de necrosis celular.

Por otra parte, utilizamos el método de hipoxia inducida por cubreobjetos, que recapitula las condiciones de hipoxia y acidificación extracelular observadas en el microambiente tumoral temprano, tanto en condiciones de alta como de baja glucosa. En ambos casos, el cese de la motilidad celular ocurre mucho antes de los drásticos cambios en la organización celular causados por la hipoxia inducida por cubreobjetos ya observados en estudios anteriores. No obstante, una diferencia entre las condiciones de alta y baja glucosa es que en baja glucosa, posteriormente a la detención de la motilidad celular también hay una marcada disminución de la dinámica intracelular (movimiento de gotitas lipídicas, mitocondrias y protrusiones de membrana, entre otros), mientras que en condiciones de alta glucosa esto no se observa, lo que sugiere que la motilidad celular es un parámetro más sensible a condiciones de estrés que la dinámica de componentes intracelulares.

En resumen, estos resultados preliminares sugieren que, frente a distintas fuentes de estrés celular, la disminución de la motilidad celular es una respuesta temprana muy anterior a las alteraciones típicas de procesos de daño y muerte celular.

Caracterización funcional y silenciamiento *in vivo* de lncRNAs mediante oligonucleótidos antisentido (ASOs) en testículo de ratón

Eliana de los Santos¹, Rosana Rodríguez-Casuriaga¹ y Adriana Geisinger^{1,2}

¹Laboratorio de Biología Molecular de la Reproducción, Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE). ²Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, UdelaR.

Los ARN largos no codificantes (lncRNAs) son transcritos de más de 200 nucleótidos que tienen un bajo o nulo potencial para codificar proteínas. Aproximadamente el 40% de los lncRNAs son intergénicos, mientras que el 60% restante se solapa o se encuentra adyacente a genes codificantes de proteínas. La función biológica de la mayoría de los lncRNAs, en especial los de tipo antisentido, ha sido poco estudiada debido a limitaciones técnicas. Las estrategias actuales de eliminación de expresión de lncRNAs basadas en CRISPR son eficaces para aquellos que están alejados de genes codificantes, pero no son aplicables a la mayoría de los lncRNAs, ya que pueden interferir con los genes adyacentes o solapantes. Por otra parte, los métodos de silenciamiento mediado por ARNs interferentes (siRNAs) actúan mediante la vía de los miRNAs, por lo cual suelen permitir el silenciamiento de ARNs citoplásmicos, siendo poco eficientes para silenciar a nivel del núcleo. Dadas las limitaciones mencionadas, nuestro objetivo fue desarrollar una técnica de silenciamiento (*knock-down*) *in vivo* de lncRNAs mediante microinyecciones testiculares basada en el uso de oligonucleótidos antisentido (ASOs) modificados. Ello implicó la puesta a punto de un mecanismo de *delivery* de estos lncRNAs vía microinyección a través de la *rete testis*. En este trabajo, se busca realizar la caracterización funcional de *Kcnmb4os1*, un lncRNA cuyo *locus* se ubica de forma solapante y antisentido del gen codificante *Kcnmb4*, codificante para la subunidad beta-4 de un canal de potasio activado por calcio. Por su localización determinada por FISH, este lncRNA se localiza en el núcleo de las células en profase meiótica en estrecha relación con los cromosomas homólogos apareados, y podría estar vinculado a la búsqueda de homologías durante la meiosis. Hasta el momento hemos logrado un silenciamiento de *Kcnmb4os1* superior al 50%. El desarrollo de esta metodología representa un importante hito ya que permitirá la caracterización funcional de lncRNAs *in vivo* en un sistema tan complejo como el testículo. A su vez, la metodología podría ser aplicable al estudio funcional de lncRNAs antisentido en otros órganos y tejidos.

Mesa 4: Biología estructural y funcional de biomoléculas

Caracterización de la acetilación de la aconitasa mitocondrial (ACO2) humana: estudios *in vitro* e *in silico*.

Santiago Mansilla^{1,2}, Mauricio Mastrogiovanni^{1,3}, Verónica Tórtora^{1,4}, Rosario Durán⁵, Ari Zeida^{1,3}, Laura Castro^{1,3}.

¹Centro de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. ²Departamento de Métodos Cuantitativos, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. ³Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. ⁴Departamento de Educación Médica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. ⁵Unidad mixta de Bioquímica y Proteómica Analíticas, IP Montevideo – IIBCE, Montevideo, Uruguay.

La acetilación de proteínas es una de las principales modificaciones postraduccionales en eucariotas, en la que el grupo acetilo de la acetil-coenzima A (Ac-CoA) se transfiere predominantemente a lisinas. Ocurre en distintos compartimientos subcelulares y puede revertirse por una serie de enzimas que utilizan NAD⁺ como cosustrato (sirtuinas). La ACO2 es una enzima esencial que cataliza la isomerización reversible de citrato a isocitrato en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (CAT). Contiene en su sitio activo un centro ferrosulfurado [4Fe-4S]²⁺ el cual se oxida y se inactiva por especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno. Dado que *in vivo* la oxidación es reversible, la ACO2 constituye un sensor redox mitocondrial que modula el flujo del CAT y destinos del citrato celular. Además, en estudios de acetiloma la ACO2 ha sido hallada en tejidos de varios mamíferos; no obstante, los sitios de acetilación reportados y las consecuencias funcionales varían en la literatura. Aquí evaluamos el impacto de la acetilación *in vitro* de la ACO2 recombinante humana en su estado activo [4Fe-4S]²⁺ e inactivo [3Fe-4S]⁺, en condiciones similares a las presentes en la matriz mitocondrial (pH alcalino y concentraciones de Ac-CoA entre 0,1-1,5 mM). La [4Fe-4S]²⁺-ACO2 no presentó cambios en la actividad catalítica. Sin embargo, la [3Fe-4S]⁺-ACO2 tratada con 1,5 mM Ac-CoA y luego incubada con Fe²⁺ y DTT sufrió una pérdida de 30% de su actividad catalítica. La acetilación fue detectada por WB utilizando un anticuerpo anti-acetil-lisina y mediante análisis por espectrometría de masas. Fueron identificadas las lisinas que presentaron una modificación dosis-respuesta respecto a la concentración de Ac-CoA (86, 144, 401, 458, 462 y 776). Por otra parte, las lisinas 138, 245, 520, 628 y 651-652 fueron detectadas en niveles similares para todas las concentraciones de Ac-CoA. Para profundizar en el mecanismo por el cual la ACO2 pierde actividad, realizamos simulaciones de dinámica molecular para la ACO2 WT o modificada en algunas de las lisinas encontradas. Observamos que algunas de ellas favorecen la conformación abierta de la [3Fe-4S]⁺-ACO2. Los resultados *in vitro* e *in silico* y su correlación con modelos *in vivo* sustentan que el principal mecanismo de regulación de la actividad de la ACO2 es la oxidación del centro FeS. Por otra parte, la acetilación puede afectar la actividad de la ACO2 directamente si ocurre en su forma [3Fe-4S]⁺ e indirectamente ya que tanto la MnSOD y la frataxina se acetilan con importantes consecuencias funcionales.

Un espacio conformacional similar al de Ramachandran, pero para ADN

Gabriela da Rosa^{1,*}, Leandro Grille¹, Pablo D. Dans^{1,2}

¹Laboratorio de Biofísica Computacional. Departamento de Ciencias Biológicas, CENUR Litoral Norte, Universidad de la República. Uruguay. ²Unidad de Bioinformática. Instituto Pasteur de Montevideo. Uruguay.

El ADN tiene la capacidad de existir en una amplia variedad de formas estructurales, subformas y motivos secundarios, lo cual es fundamental para numerosos procesos biológicos y ha impulsado el desarrollo de varias aplicaciones biotecnológicas (drogas antisentido, aptámeros, nanoestructuras de origami, etc). Unos de los principales determinantes de la flexibilidad del ADN son los múltiples grados de libertad torsional (ángulos diedro) alrededor de la columna de enlaces fosfodiéster (denominados: α , β , δ , γ , ϵ , ζ , χ). Esta alta complejidad puede ser racionalizada utilizando sólo dos ángulos pseudo-torsionales conocidos como η y θ , que conectan los átomos P y C4'. A partir de esos dos ángulos se pueden construir mapas de densidad utilizando como fuente de información el Protein Data Bank (PDB). Esta aproximación desarrollada por Pyle y colaboradores, se ha utilizado para ahondar en el entendimiento de las intrincadas estructuras 3D del ARN.

En esta contribución nos centramos en ADN, explorando la distribución de los ángulos η (eta: C4'_{i-1}-P_i-C4'_i-P_{i+1}) y θ (theta: P_i-C4'_i-P_{i+1}-C4'_{i+1}) en estructuras de rayos-X de alta resolución extraídas del PDB. Para el curado de las estructuras y su procesamiento se utilizó el paquete de R llamado veriNA3d. Tras eliminar las conformaciones canónicas/helicoidales típicas de la forma B, que han sido extensamente estudiadas encontramos la existencia de un mapa conformacional con regiones claramente permitidas y prohibidas, que recuerda el mapa de Ramachandran para proteínas. Algunas de esas regiones están pobladas por formas específicas de ADN, como la Z o la A, o por motivos secundarios específicos como los G-cuádruplex. Evaluamos la dependencia con la secuencia y la relación de energía entre las regiones de alta densidad identificadas en el espacio η - θ . Además, analizamos el efecto producido por las proteínas y los cationes al unirse al ADN, encontrando que ciertas proteínas generan conformaciones no-canónicas bien diferenciadas, mientras que algunas de las regiones más alejadas de la forma B, parecen estar estabilizadas por cationes divalentes.

Mesa 5: Biotecnología y Biocatálisis

Detección espacio-temporal de lipoperóxidos con un biosensor genéticamente codificado dirigido a diferentes regiones subcelulares

Natalia Oddone¹, Mariana Bonilla¹, Gonzalo Scalese¹, Gerardo Ferrer-Sueta², Leonel Malacrida³, Marcelo Comini¹.

¹Laboratorio de Biología Redox de Tripanosomátidos, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay. ²Laboratorio de Físicoquímica Biológica, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. ³Unidad de Bioimagenología Avanzada, Institut Pasteur Montevideo, Montevideo, Uruguay

Los lipoperóxidos (LOOHs), son especies reactivas del oxígeno que derivan de la oxidación incompleta de los ácidos grasos poliinsaturados. Si bien dichas especies pueden actuar como mediadores de señalización celular, concentraciones elevadas de los mismos provocan daño celular. Por esta razón, los LOOHs se han asociado con una variedad de condiciones fisiopatológicas, incluyendo enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, hepáticas, entre otras. A pesar de su relevancia, no se cuenta con sondas fluorescentes para su detección específica, dinámica, y no destructiva en células vivas. Para abordar esta limitación, hemos desarrollado un biosensor genéticamente codificado mediante la fusión de una peroxidasa de lipoperóxidos (proveniente de un protozoo unicelular), con una proteína fluorescente verde redox sensible (roGFP2).

Nuestro biosensor mostró una eficiencia de reducción de LOOHs derivados del ácido linoleico (9(S)-HpODE) y del ácido araquidónico (15(S)-HpETE), de 2 a 3 órdenes de magnitud, en comparación con la de H₂O₂. Las tasas catalíticas para cada paso del ciclo redox del biosensor fueron determinadas mediante ensayos cinéticos *in vitro*. Estudios *in cellula*, llevados a cabo en células eucariotas que incluyen *Leishmania tarentolae* y hepatocitos humanos, demostraron que el biosensor respondió con una alta sensibilidad y reversibilidad a concentraciones fisiológicas de LOOHs. Experimentos control, llevados a cabo con Hyper (biosensor de H₂O₂), confirmaron la selectividad del biosensor para LOOHs. Por otro lado, desarrollamos versiones dirigidas del biosensor a núcleo celular, matriz mitocondrial y membrana plasmática, demostrando que efectivamente se localizó en dichos sitios, pudiendo observar que la magnitud y cinética de la oxidación del biosensor ante estímulos de LOOH, variaba según la localización subcelular. Esto sugiere la presencia de barreras redox compartimento-específicas contra los LOOHs en células.

Podemos concluir, que la herramienta desarrollada ofrece un gran potencial para la comprensión del metabolismo de LOOHs, y avanzar en las campañas de descubrimiento de fármacos en modelos patofisiológicos diversos.

Generación de glicoisofomas de transferrina mediante deglicosilación quimio-enzimática: Un aporte biotecnológico para el diagnóstico de CDGs

Luciana Ottonello¹, Laura Franco Fraguas¹, **Cecilia Porciuncula González^{1*}**.

¹Área Bioquímica. Departamento de Biociencias. Facultad de Química. UdelaR. *dcpq@fq.edu.uy

Las enfermedades congénitas de glicosilación (CDGs) son un grupo de enfermedades de origen hereditario que se caracterizan por presentar alteraciones en el metabolismo de los glicanos. Dado su baja frecuencia son consideradas “enfermedades raras”.

A nivel clínico estas enfermedades se caracterizan por generar alteraciones de gravedad importante de tipo neurológico, cardiológico, hepático y hematológico entre otras. Si bien, algunas de ellas son incompatibles con la vida, en muchos otros casos es posible lograr una mejora en la calidad de vida mediante intervención terapéutica temprana.

Se ha detectado alteraciones en el patrón de glicosilación de ciertas glicoproteínas del suero sanguíneo de neonatos con CDGs, en particular transferrina, lo que la convierte en un importante biomarcador en la detección de estas enfermedades.

En ese marco, el objetivo de nuestro trabajo ha sido el desarrollo de herramientas para la detección de CDGs basadas en lectinas como sensores de las alteraciones en la glicosilación de glicoproteínas de suero sanguíneo del neonato.

Hemos desarrollado un método para detectar glicoisofomas de transferrina. Para validar la sensibilidad de este frente a las alteraciones en los glicanos, se evaluaron distintas glicoisofomas de transferrina. En este trabajo presentamos la generación de dichas glicoisofomas a partir de transferrina humana comercial, mediante desialilación y degalactosilación de la misma por estrategias quimio-enzimáticas.

El protocolo se llevó a cabo en dos etapas. En primer lugar, la glicoproteína se desialiló químicamente, mediante incubación con ácido acético 2N a 80°C durante 2 horas. Posteriormente, dicha proteína desialilada fue incubada durante 24 horas a temperatura ambiente con la enzima β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* previamente inmovilizada en soporte glutaraldehído-agarosa.

Las glicoisofomas generadas fueron evaluadas mediante reconocimiento diferencial por un panel de lectinas en el ensayo en microplaca puesto a punto previamente. Los resultados obtenidos demostraron que el ensayo es capaz de diferenciar las distintas glicoisofomas generadas, lo que representa un resultado auspicioso para seguir avanzando en el desarrollo de esta herramienta de detección. A su vez, la estrategia quimio-enzimática propuesta fue exitosa, lo que la convierte en una herramienta de gran interés, para la deglicosilación de otras glicoproteínas con interés biomédico y/o biotecnológico.

Mesa 6: Metabolismo y bioquímica celular

Evaluación del rol del oxígeno como modulador de la respuesta inflamatoria en macrófagos

Pereyra Domenech, Josefina^{1,2}; Rios, Natalia^{1,2}; Radi, Rafael^{1,2}; Alvarez, Maria Noel^{2,3}; Prolo, Carolina.^{1,2}

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UdelaR. ²Centro de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Medicina, UdelaR. ³Departamento de Educación Médica, Facultad de Medicina, UdelaR.

Gran parte de los mecanismos efectores de los macrófagos depende de la formación de oxidantes a expensas de O₂. En particular cuentan con la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la NADPH oxidasa 2 (NOX-2), capaces de sintetizar óxido nítrico y superóxido, respectivamente. Ambas especies son altamente reactivas y modifican distintas biomoléculas, contribuyendo a la destrucción del material fagocitado, directamente o por la formación de derivados más oxidantes como el peroxinitrito (ONOO⁻). En los últimos años, se ha reconocido la importancia de considerar el microambiente donde ocurren estos procesos, que muchas veces difiere de las condiciones estándar de laboratorio (20% O₂ y 5% CO₂). Previamente, se pudo determinar que existen variaciones en la velocidad de formación de superóxido y óxido nítrico en el rango fisiológico de O₂ (2-15%). Además, está establecida la conexión que existe entre la activación de los macrófagos, pO₂ y el factor de respuesta a hipoxia (HIF-1α). En este trabajo se evalúa la influencia del O₂ en la respuesta oxidativa de los macrófagos adaptados a distintas pO₂ (1-15%). Observamos que en las concentraciones más bajas de O₂ estudiadas hay una mayor expresión de la iNOS, y de la IL-6 en macrófagos activados con IFNγ y LPS. A su vez, se cuantificó la producción de óxido nítrico y peróxido de hidrógeno dependientes de iNOS y NOX2 en macrófagos a distintas pO₂. Para la detección y cuantificación de peroxinitrito se planteó el desarrollo de una nueva sonda derivada de boronatos (Red-BI), con reactividad similar a las comúnmente utilizadas, ácido cumarín borónico (CBA) y fluoresceína-boronato (FI-B), pero con mayor estabilidad frente a cambios de pO₂ y pH. Red-BI es un éster borónico derivado de xanteno cuyo fluoróforo Red-Ox, mostró características espectroscópicas óptimas ($\lambda_{exc} = 511\text{nm}$; $\lambda_{em} = 538\text{nm}$, $\epsilon_{511\text{nm}} = 67,000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\phi = 0.093$) y pKa ≈ 5.9 . Ensayos preliminares sobre la reactividad de Red-BI muestran una respuesta fluorescente dependiente de la concentración de peroxinitrito. Además, se determinó la constante cinética para H₂O₂ comparable a otros boronatos, $k = 0.5\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a pH 7.4 y 25°C

Futuros estudios permitirán validar la sonda como una herramienta para evaluar la formación de peroxinitrito en macrófagos expuestos a distintas pO₂ a través de métodos espectroscópicos y de microscopía.

Descifrando el código de direccionamiento a la membrana de UreA, transportador de urea de *Aspergillus nidulans*.

Gómez, Ania; Dacosta, Sofía; Sanguinetti, Manuel; Ramón, Ana.

Sección Bioquímica, Dpto de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias (UdelaR).

La Signal Recognition Particle (SRP) tiene un rol preponderante durante la síntesis de proteínas integrales de membrana (PIMs). En etapas tempranas de la traducción de éstas, SRP reconoce secuencias señal (SS) emergiendo de los complejos ribosoma-polipéptido nascente (RNC), y los dirige a la membrana del retículo endoplásmico (RE), donde se completa la traducción. A pesar de ser un mecanismo evolutivamente muy conservado, las SS varían en composición. Típicamente, están compuestas por trechos de 8 aminoácidos consecutivos y, muchas veces, pueden ser el primer segmento transmembrana (STM) de la proteína, mas no existe una secuencia consenso que sea reconocida por SRP.

En *Aspergillus nidulans*, UreA es una PIM que media el transporte de urea, compuesto que puede ser utilizado como única fuente de nitrógeno por el hongo. Nuestro grupo ha identificado, por un lado, un trecho de 6 aminoácidos hidrofóbicos al inicio del N-terminal (en las posiciones 2-7) que podrían estar actuando como SS; y por otro, demostrado que dos codones no-óptimos en su ARNm (en las posiciones 24 y 25), son indispensables para su correcta biosíntesis. Éstos codifican para aminoácidos ubicados en el límite entre el segmento N-terminal y el primer STM. Cepas portando sustituciones por sinónimos óptimos (*ureA*₂₄₂₅) crecen defectuosamente sobre urea a la temperatura óptima de crecimiento (37°C), y aumentan su resistencia a la 2-tiourea (análogo tóxico). Estos fenotipos son parcialmente restaurados cuando crece a 25°C. La delección de la posible SS integrada por los aminoácidos hidrofóbicos 2-7, en un contexto *ureA*_{wt}, no ha demostrado tener efecto alguno. En cambio, cuando se deletan en cepas *ureA*₂₄₂₅, se observa un fenotipo exacerbado en cuanto a deficiencia de crecimiento en urea y resistencia a 2-tiourea. A su vez, la adición de un tag 3HA en el N-terminal de la proteína, revierte el fenotipo observado para la cepa *ureA*₂₄₂₅. Nuestra hipótesis es que los codones no óptimos 24-25 determinarían una pausa traduccional en etapas muy tempranas, fundamental para el reconocimiento eficiente por SRP, que sería eliminada en el mutante *ureA*₂₄₂₅. Además, el trecho de los aminoácidos 2-7 también jugaría un rol preponderante en dicha interacción, junto con el largo del N-terminal.

En cepas portando el N-terminal de UreA fusionado a la proteína verde fluorescente (GFP), hemos observado que éste sólo, no es suficiente para dirigir a GFP hacia el RE, por lo que, por sí mismo, no actuaría como SS. Actualmente, estamos construyendo cepas que porten además, el primer STM.

Mesa 7: Ciencias ómicas y bioinformática

Caracterización de la maquinaria traduccional de *Trypanosoma cruzi* durante la metacicloogénesis y el ciclo celular.

Martín Rivara Espasandín^{1,2}, Santiago Radío³, Santiago Chávez², María Ana Duhagon^{2,4}, Pablo Smircich^{1,4}, José Sotelo-Silveira^{1,5}.

¹Departamento de Genómica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, MEC. ²Departamento de Genética, Facultad de Medicina, Universidad de la República. ³Institute of Evolutionary Biology (CSIC-Universitat Pompeu Fabra), 08003, Barcelona, Spain. ⁴Sección Genómica Funcional, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. ⁵ Departamento de Biología Celular y Molecular, Sección Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

Trypanosoma cruzi (*T. cruzi*), agente etiológico de la enfermedad de Chagas, regula su expresión génica principalmente mediante mecanismos postranscripcionales. Nuestro grupo observó que la regulación traduccional es un mecanismo importante durante la metacicloogénesis y la transición G1/S del ciclo celular. Recientemente, diferentes enfoques han demostrado que la composición de los ribosomas puede ser variable a nivel proteico, lo que puede llevar a cambios regulatorios. Esta observación, nos llevó a caracterizar en forma detallada la maquinaria traduccional de *T. cruzi* en los estadios del ciclo de vida epimastigota y tripomastigota metacíclico, así como en las fases del ciclo celular G1 y S. Primero, revisamos y pulimos la anotación actual de las proteínas ribosomales (PR), analizando el número de copias, la ubicación en el ribosoma, las extensiones de proteínas en los extremos terminales, los valores de expresión y posibles funciones extra ribosomales. Abordando esta caracterización de forma experimental, observamos a través de Ribo-Seq que existe una represión global de la traducción de los ARNm de PR en el estadio tripomastigota metacíclico, pero también existe variación individual, encontrando algunos ARNm de PR que resisten esa represión. También realizamos una aproximación multi-ómica (RNAseq, Ribo-Seq y espectrometría de masas) en parásitos sincronizados en las fases G1 y S del ciclo celular. Observamos variación individual en los cambios de eficiencia traduccional de los ARNm de PR y también en el nivel de abundancia de algunas PR. Estas observaciones podrían estar en línea con la hipótesis de que la composición de la maquinaria traduccional puede ser variable durante estas transiciones. Para explorar esta hipótesis, realizamos proteómica cuantitativa en fracciones enriquecidas en ribosomas, en parásitos sincronizados en las fases G1 y S del ciclo celular. Observamos diferencias en la abundancia de algunas PR entre fracciones ribosomales de las dos fases del ciclo celular estudiadas, lo que sugiere que pueden existir variaciones en la composición de la maquinaria traduccional.

Análisis transcriptómicos de dos isolíneas de tomate en respuesta al hongo *Stemphylium lycopersici*: mecanismos de resistencia mediados por el locus Sm

Ana Clara González-Ghiena¹, Alfonso Álvarez², Ana Arruabarrena³, Matías-González-Arcos³ e Inés Ponce de León¹.

¹Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay. ²Laboratorio de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias, Centro de Investigaciones Nucleares, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. ³Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria- INIA Salto Grande, Uruguay.

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es un cultivo de gran relevancia global y el segundo más importante en Uruguay. La mancha gris de la hoja, causada por hongos del género *Stemphylium*, es una enfermedad devastadora que provoca importantes pérdidas en las variedades susceptibles. En el marco del programa de mejoramiento del INIA, se generaron isolíneas de tomate con diferentes niveles de resistencia a *Stemphylium* mediante la incorporación del locus de resistencia Sm. Para identificar los mecanismos asociados a esta resistencia, se inocularon las isolíneas con un aislado virulento de *S. lycopersici* (UYSLS32). Se observaron síntomas claros en la isolínea susceptible a los 5 días post inoculación (dpi), con progresión hacia necrosis y clorosis a los 9 dpi. En contraste, la isolínea resistente mostró solo pequeñas manchas a los 9 dpi y sin síntomas significativos a los 5 dpi.

Se analizaron los transcriptomas de ambas isolíneas en plantas sin tratamientos y a los 5 y 9 dpi, comparándolos con un control tratado solo con agua. En plantas sin tratamiento, se identificaron 320 genes diferencialmente expresados (DEGs) entre las isolíneas. El análisis de enriquecimiento de ontología de genes (GO) reveló que, en comparación con la susceptible, la isolínea resistente mostró una inducción de DEGs en procesos biológicos como exportación de proteínas desde el núcleo, síntesis de cumarina, respuesta a estímulos bióticos, respuesta a estrés y regulación del ácido jasmónico. A los 5 dpi, la isolínea resistente presentó un aumento en la expresión de 257 DEGs, mientras que la susceptible mostró 688 DEGs. En la resistente, se observaron DEGs enriquecidos en funciones moleculares como actividad antioxidante, actividad catalítica y unión de ácido abscísico, así como en procesos biológicos como catálisis de componentes de la pared celular, detoxificación, respuesta a estrés y estímulo biótico, y proceso catabólico de quitina. A los 9 dpi, la resistente mostró 136 DEGs inducidos, mientras que la susceptible tuvo 384 DEGs inducidos. En la isolínea resistente, se observó enriquecimiento de genes asociados a vías de señalización de hormonas y sistemas de transducción de señales. Por otro lado, la isolínea susceptible mostró un enriquecimiento en funciones moleculares como unión de polisacáridos y quitina, actividad oxido-reductasa, actividad de proteína tirosina quinasa, y factores de transcripción. Estos resultados demuestran que la isolínea resistente presenta una activación de genes relacionados con la defensa, lo que podría explicar la resistencia observada frente a *S. lycopersici*.

Mesa 8: Biología Molecular y Bioquímica de Patógenos Emergentes y Enfermedades Infecciosas

Enterobacterias: un estudio combinado de actividad antimicrobiana y efectos antiinflamatorios

Florencia, Peñalba¹; Parada, Andrés¹; Daghero, Hellen²; Bollati, Marielai²; Iraola, Gregorio¹; Riera, Nadia¹

¹Laboratorio de Genómica Microbiana, Institut Pasteur de Montevideo. ²Laboratorio de Biología Celular, Institut Pasteur de Montevideo

La creciente resistencia a los antibióticos es una crisis global de salud pública que limita las opciones terapéuticas disponibles para tratar infecciones bacterianas, especialmente aquellas causadas por patógenos multiresistentes como *Klebsiella pneumoniae*. Este fenómeno acentúa la necesidad urgente de explorar alternativas terapéuticas, como nuevos agentes antimicrobianos. El microbioma intestinal humano ha sido postulado como un reservorio emergente de compuestos con potencial inhibitorio antibacteriano. Sin embargo, las interacciones dentro de este sistema son complejas y poco se sabe los mecanismos que gobiernan estas inhibiciones.

En este contexto, se investigó el potencial antimicrobiano y antiinflamatorio de enterobacterias aisladas de muestras de heces humanas. A partir de muestras de materia fecal, se aislaron once enterobacterias en condiciones anaeróbicas. Para evaluar el potencial antimicrobiano de estos aislamientos, se realizó un ensayo de antibiograma en disco utilizando una cepa clínica de *Klebsiella pneumoniae* multiresistente como microorganismo objetivo. Se realizó una curva de crecimiento de *K. pneumoniae* en medio líquido con los sobrenadantes libres de células (CFS) de las cepas entéricas. Se siguió el crecimiento de *K. pneumoniae* midiendo la densidad óptica en medio líquido a distintas horas y se cuantificó el potencial inhibitorio de los CFS. Algunas bacterias intestinales pueden producir metabolitos que interactúan con las células del hospedero, Para estudiar el potencial efecto en el intestino, se utilizó un modelo de organoides intestinales de ratón sometidos a los CFS. Se determinó el potencial antiinflamatorio en modelo de yeyuno NFkB en 3D cuantificando la activación de NFkB *in vitro*. Las once cepas fueron secuenciadas por tecnologías de tercera generación y clasificadas utilizando GTDBtK a partir del genoma completo, estas bacterias fueron identificadas como: *Enterococcus hirae*, *Escherichia coli*, *Catenibacterium sp.* y *Clostridium perfringens*. Se utilizó GutSMASH para predecir genes relacionados con la producción de metabolitos primarios y antiSMASH para determinar metabolitos secundarios en las cepas *in silico*. De los once sobrenadantes obtenidos, cuatro mostraron actividad antimicrobiana (*C. perfringens*, *Catenibacterium sp.* y *E. hirae*). De los estudios en organoides, se observó que de ocho cepas analizadas (provenientes de *Clostridium perfringens* y *Enterococcus hirae*) mostraron potencial antiinflamatorio *in vitro*.

Este estudio subraya la relevancia de la microbiota intestinal humana como fuente de nuevos agentes antimicrobianos y terapéuticos. Las cepas identificadas no solo tienen un potencial significativo como agentes antimicrobianos, sino que también podrían contribuir a la modulación de respuestas inflamatorias.

Herramientas basadas en proteínas recombinantes de Sars-Cov-2 producidas en células de insecto para estudiar la respuesta humoral frente a la infección viral y a vacunas

Federico Carrión¹, Florencia Rammauro^{1,2}, Natalia Olivero-Deibe¹, Martín Fló^{1,2}, Agustín Correa³, María Magdalena Portela^{4,5}, Analía Lima⁵, Rosario Durán⁵, Ana Ferreira^{6,7}, Otto Pritsch^{1,2}, Sergio Bianchi^{8,9}.

¹Laboratorio de Inmunovirología, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay.

²Departamento de Inmunobiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; Laboratorio de Inmunovirología, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay.

³Unidad de Ingeniería de Proteínas, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay. ⁴Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas, Institut Pasteur de Montevideo & Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay. ⁵Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. ⁶Unidad de Inmunología, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. ⁷Área Inmunología, Departamento de Biociencias, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. ⁸Unidad de Inmunología, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; Área Inmunología, Departamento de Biociencias, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. ⁹Laboratorio de Biomarcadores Moleculares, Departamento de Fisiopatología, Hospital de Clínicas, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; Laboratorio de Genómica Funcional, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay.

La pandemia causada por el SARS-CoV-2 ha generado impactos sanitarios, económicos y sociales significativos. El rápido desarrollo e implementación de vacunas ha sido clave para reducir la mortalidad y las formas graves de la enfermedad, principalmente mediante la generación de anticuerpos neutralizantes que impiden la entrada del virus a las células. Sin embargo, la aparición de nuevas variantes virales más transmisibles y capaces de evadir la inmunidad ha reducido la eficacia de las vacunas, lo que ha requerido el ajuste de su diseño y la administración de nuevas dosis adaptadas a estas variantes.

Este trabajo tiene como objetivo desarrollar estrategias *in vitro* para analizar la neutralización de anticuerpos frente a distintas variantes de SARS-CoV-2 y evaluar herramientas novedosas que bloqueen dicha interacción. Para ello, se produjeron de manera recombinante dominios solubles de la glicoproteína Spike de diversas variantes virales y de la glicoproteína humana hACE2, el receptor celular del virus. Se realizó una detallada caracterización biofísica y bioquímica de las proteínas y de su interacción *in vitro*, lo que permitió el desarrollo de ensayos serológicos cualitativos y cuantitativos para evaluar la respuesta de anticuerpos. Estos ensayos demostraron ser útiles no solo para evaluar la eficacia de las vacunas en individuos vacunados, sino también como una herramienta en la búsqueda de inhibidores virales, como pequeñas moléculas o dominios de anticuerpos.

En este contexto, los anticuerpos bovinos con CDR3 ultra-largos han surgido como una alternativa prometedora para unirse a epítopes de proteínas virales poco accesibles, generando anticuerpos ampliamente neutralizantes. Dos vacas fueron inmunizadas con la proteína Spike recombinante de SARS-CoV-2, lo que permitió obtener sueros reactivos y células B productoras de estos anticuerpos. Como prueba de concepto, se purificó un dominio de anticuerpo con CDR3 ultra-largo en células de insecto, demostrando su capacidad para unirse con alta afinidad al dominio RBD de la proteína Spike. Estos resultados sugieren que estas estrategias tienen un gran potencial para generar “*binders*” contra proteínas de diversos virus, y que los sistemas de expresión en células de insecto son útiles para su producción y análisis.

Mesa 9: Metabolismo del ARN

Vacunas de ARN en Uruguay: Diseño y evaluación de una vacuna de ARNm contra el virus de Mayaro

Alicia Costábile^{1,2,3,4}, Manuela Cardoso^{1,2,3}, Mariano Dellarole⁵, Pilar Moreno^{1,2,3}, Gonzalo Moratorio^{1,2,3}

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

Las vacunas han prevenido y salvado numerosas vidas a lo largo de los años. Si bien las vacunas convencionales, como las vacunas a virus vivos atenuados e inactivados y las vacunas de subunidades, proporcionan una protección duradera contra diversas enfermedades peligrosas, siguen existiendo importantes obstáculos para el desarrollo de vacunas contra diversos patógenos, especialmente los que presentan mayor capacidad de eludir la respuesta inmunitaria. Esto ha llevado a lo largo de los años a la necesidad de desarrollar plataformas tecnológicas que permitan el diseño y producción de vacunas más potentes y versátiles en menos tiempo. Si bien hace décadas se trabaja en las vacunas a base de ARNm, esta tecnología ha saltado recientemente a los titulares de todo el mundo debido a su destacado papel en la lucha contra el virus COVID-19, valiéndoles el premio Nobel en Medicina del 2023 a sus principales impulsores.

Este trabajo tiene como objetivo producir en Uruguay vacunas de ARN utilizando al Virus de Mayaro (MAYV) como modelo. MAYV es un arbovirus desatendido detectado en humanos en el norte de Sudamérica, que es transmitido por mosquitos del género *Aedes*. Este modelo es utilizado desde hace varios años en nuestro laboratorio para el estudio de la evolución viral.

Para lograr este objetivo diseñamos distintas construcciones de ADN molde para evaluar el efecto de distintos parámetros en la eficiencia traduccional. Como parámetros se consideraron: 1) las proteínas antigénicas seleccionadas, 2) el uso de codones para la traducción en células humanas o de ratón, y 3) las regiones no traducidas utilizadas. A partir de estos moldes, se realizó la producción del ARNm *in vitro* utilizando nucleótidos modificados, un CAP en el extremo 5' y una cola de poli-adeninas en el extremo 3'. Los ensayos en cultivos celulares realizados con estos ARNs muestran la producción de la poliproteína estructural de MAYV por células humanas, la cual es procesada para generar las glicoproteínas de superficie maduras. En el futuro, realizaremos la encapsulación de estos ARNm en nanopartículas lipídicas (LNP por sus siglas en inglés) y evaluaremos la inmunogenicidad de esta vacuna ARNm-LNP *in vivo* utilizando un modelo de ratón.

Una vez optimizada esta estrategia, podrá ser utilizada para el diseño de vacunas contra diversos patógenos relevantes para la salud humana y animal de nuestro país.

Un estudio multi-ómico revela a nc886/vtRNA2-1 como un regulador positivo de la inmunidad en Cáncer de Próstata

Carolina Oliveira-Rizzo^{1,2}, Camilla L. Colantuono^{1,2}, Ana J. Fernández-Alvarez³, Graciela L. Boccaccio^{3,4}, Beatriz Garat¹, José R. Sotelo-Silveira^{5,6}, Shahbaz Khan⁷, Vladimir Ignatchenko⁷, Yong Sun Lee⁸, Thomas Kislinger^{7,9}, Stanley K. Liu^{9,10,11}, Rafael S. Fort^{1,5}, María A. Duhagon^{1,2}.

¹Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Sección de Genómica Funcional, Montevideo, 11400 UY. ²Facultad de Medicina, Universidad de la República, Departamento de Genética, Montevideo, 11800 UY. ³Laboratorio de Biología Celular del ARN, Instituto Leloir (FIL) e Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Buenos Aires (IIBBA) - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), Buenos Aires, 1405 AR. ⁴Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular (FBMyC), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEN), Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, 1428 AR. ⁵Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), Departamento de Genómica, Montevideo, 11600 UY. ⁶Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Departamento de Biología Celular, 11400 Montevideo, UY. ⁷Princess Margaret Hospital Cancer Centre, Toronto, ON, M5G 2C4 CA. ⁸Graduate School of Cancer Science and Policy, National Cancer Center, Department of Cancer Biomedical Science, Goyang-si, Gyeonggi-do, 10408 KR. ⁹University of Toronto, Department of Medical Biophysics, Toronto, ON, M5G 1L7 CA. ¹⁰Odette Cancer Centre and Sunnybrook Research Institute, Toronto, ON, M4N 3M5 CA. ¹¹University of Toronto, Department of Radiation Oncology, Toronto, ON, M5T 1P5 CA.

El Cáncer de Próstata (PrCa) es el segundo cáncer de mayor incidencia en hombres en todo el mundo. Aún no se dispone de marcadores que permitan distinguir entre las formas indolentes y las formas agresivas de la enfermedad, o la sensibilidad del paciente a las terapias, por lo que el desarrollo de nuevos biomarcadores es necesario. Los ARNs no codificantes han surgido recientemente como actores clave en la iniciación y la progresión del cáncer y como prometedores biomarcadores en orina y plasma. Nc886 ha surgido como un ARN regulador clave con funciones tejido-específicas, actuando como modulador de la actividad proteica mediante interacción directa. Aunque es ampliamente reconocido como un supresor tumoral en el cáncer de próstata, los mecanismos moleculares subyacentes no se conocen completamente. El objetivo de este trabajo es identificar las principales vías en las que participa nc886 en PrCa. Para esto, realizamos ensayos de pérdida y ganancia de función de nc886 en células normales y tumorales de próstata usando oligonucleótidos anti-sentido y nc886 transcripto *in vitro*. Analizamos los cambios transcriptómicos y proteómicos 48 horas luego de la transfección, por secuenciación masiva del ARN poli-A (Illumina Hi-seq) y la detección y cuantificación libre de marcaje de las proteínas por espectrometría de masas (Orbitrap Fusion Tribrid). Identificamos genes diferencialmente expresados y vías de señalización celular enriquecidas, y utilizamos ensayos de genes reporteros, Western Blot y RT-qPCR para validar algunas de ellas. Los resultados mostraron un enriquecimiento significativo de vías relacionadas con el sistema inmune, incluyendo citoquinas y la señalización por interferón. La respuesta al interferón provocada por nc886 fue validada mediante ensayos funcionales. La invariabilidad de la fosforilación de PKR y la actividad de NF-κB sugieren un mecanismo de acción de nc886 independiente de PKR. La inducción de la vía del interferón se mostró dependiente del estado de fosforilación del extremo 5' del nc886 transcrito *in vitro*, lo que sugiere que el mecanismo de acción de nc886 en la activación de esta vía podría estar mediado por RIG-I. En concordancia, el análisis de enriquecimiento de genes (GSEA) del conjunto de datos PRAD-TCGA reveló la estimulación inmune como el nodo más asociado a la expresión de nc886 en el contexto clínico. En general, los resultados indican que nc886 actúa como un regulador positivo del sistema inmunológico, un papel consistente con su función previamente descrita como supresor tumoral en el cáncer de próstata, ya que su disminución contribuiría con la inmunosupresión.

Comprendiendo los mecanismos de regulación postranscripcional mediados por p53 durante la respuesta a proteínas desplegadas

Irene Larghero Valdivia¹, Catalina Barbot¹, Fabrizio Costa¹, Tamara Fernandez-Calero^{2,3}, Madelón Portela^{4,5}, Karen Perelmuter⁶, Mariela Bollati⁶, Rosario Durán⁴, Mónica Marín¹, Ricardo Ehrlich⁷, Robin Fåhrens^{8,9,10}, Ignacio López^{1,6}.

¹Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, UdelaR. ²Unidad de Bioinformática, Institut Pasteur de Montevideo. ³Departamento de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Católica del Uruguay. ⁴Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas, Institut Pasteur de Montevideo, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. ⁵Facultad de Ciencias, Universidad de la República. ⁶Unidad de Biología Celular, Institut Pasteur de Montevideo. ⁷Institut Pasteur de Montevideo. ⁸INSERM UMR 1131, Institut de Recherche Saint Louis, Université Paris Cité, París, Francia. ⁹Department of Medical Biosciences, Umeå University, Umeå, Suecia. ¹⁰RECAMO, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno, República Checa.

La proteína supresora de tumores p53 cumple un rol crucial en el control de la homeostasis celular ya que actúa como "hub" y modula diversas respuestas celulares frente a distintos tipos de estrés, incluyendo el estrés oxidativo, el daño en el ADN y la activación de oncogenes. p53 posee dominios de unión al ADN y de transactivación y su actividad como factor de transcripción está bien caracterizada y ha eclipsado el estudio de la regulación de otras etapas de la expresión génica. Estudios más recientes sugieren que p53 también controla la traducción de ARN mensajeros (ARNm), especialmente en ciertos contextos celulares, como es la respuesta a proteínas desplegadas (Unfolded Protein Response, UPR). Sin embargo, su estudio se encuentra en etapas iniciales y se desconoce el alcance de la regulación a este nivel así como los mecanismos moleculares involucrados.

La UPR es una respuesta adaptativa que se activa cuando se produce una acumulación excesiva de proteínas mal plegadas o agregadas en el retículo endoplasmático (RE), un fenómeno que puede ocurrir tanto en condiciones fisiológicas como en patologías como el Alzheimer, diabetes tipo 2 y, principalmente, en cáncer. En estas enfermedades se ha detectado estrés crónico en el RE y cambios en la expresión de diversos componentes de la UPR, sugiriendo que esta última podría contribuir con el desarrollo de esas enfermedades.

Nuestro laboratorio ha investigado el rol de p53 en la regulación postranscripcional durante la UPR analizando el transcriptoma y el proteoma de células humanas H1299 en condiciones de estrés en el RE, tanto en presencia como en ausencia de p53. Los resultados indican que la actividad de p53 es esencial para establecer una UPR completamente funcional y, a diferencia de otras condiciones, promueve una inhibición significativa de la expresión génica, tanto a nivel de ARNm como de proteína. Asimismo, análisis de ontología (Gene Ontology) indican que los procesos biológicos que ocurren durante la UPR se ven reforzados en células con p53. Además, muchas proteínas reguladas negativamente por p53 durante la UPR no presentan cambios en la abundancia de ARNm, sugiriendo la ocurrencia de control traduccional. En la actualidad nos enfocamos en evidenciar la regulación traduccional por p53 y en estudiar si esta actividad está mediada por interacciones directas entre p53 y los ARNm involucrados.

Mesa 10: Bases moleculares y bioquímicas de la patología humana

Especies fluorescentes de alfa-sinucleína modificadas para investigar el destino intracelular de sus fibras y oligómeros

Rodrigo Ivagnes^{1,2}, Cecilia Chavarría², José M Souza^{1,2}

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

La alfa-sinucleína (aS) es una proteína citoplasmática abundante en distintas regiones del cerebro. Pese a que es una proteína intrínsecamente desordenada, bajo ciertas condiciones *in vitro*, se agrega dando lugar a estructuras filamentosas con propiedades morfológicas y de tinción semejantes a las fibras de amiloides.

Existen diversas patologías neurodegenerativas, de relevancia para la comunidad biomédica, denominadas sinucleinopatías, cuya característica patológica es la presencia de agregados proteicos intracelulares donde la aS es su componente principal. Estos agregados se encuentran en poblaciones neuronales susceptibles, tanto en neuronas dopaminérgicas, como no-dopaminérgicas y también en células gliales.

La internalización de aS a distintos tipos celulares es un proceso cuyos mecanismos aún no se conocen en su totalidad, por lo tanto, consideramos importante el uso de herramientas para obtener formas fluorescentes de la proteína que nos permitan el estudio de la proteína *in cellula*.

Utilizamos el fluoróforo Alexa488 con el objetivo de generar el monómero de aS fluorescente. Se analizó el rendimiento del marcaje, obteniendo un rendimiento de 0.2 moléculas de Alexa por molécula de aS. A pesar de ser un rendimiento bajo, es deseable que las especies marcadas se comporten de igual forma a las especies sin marcar.

Se generaron especies oligoméricas marcadas a partir de oligómeros sin marcar previamente formados. En cambio, las especies fibrilares marcadas de aS fueron formadas a partir del monómero marcado. Tanto la cinética de formación de fibras ($t_{1/2}$ 95% IC: 19.95 - 25.98 hs vs 19.21-25.58 h, control vs marcado) como longitud de las fibras formadas (102.0 ± 45.98 nm vs 107.5 ± 37.85 nm, control vs marcado) fueron similares a la especie sin marcar.

Se analizaron las propiedades espectrales de las distintas conformaciones de aS, mostrando los picos de excitación y emisión correspondientes al fluoróforo ($\lambda_{ex} = 494$ nm, $\lambda_{em} = 519$ nm).

Se realizaron estudios utilizando una línea celular de microglía murina (BV2). Se incubaron estas células con las distintas especies marcadas de aS y se analizó, por microscopía y citometría de flujo, la fluorescencia luego de 3h de incubación. Se logró ver que tanto fibras y oligómeros ingresan al interior celular y aumentan la fluorescencia de la población celular. La utilización de estas formas marcadas nos permitirá estudiar los mecanismos moleculares subyacentes al ingreso de las distintas conformaciones de aS a otros tipos celulares que cumplen roles relevantes en las sinucleinopatías como astrocitos y neuronas.

Evaluación de nanoburbujas de hidrógeno como mecanismo cardioprotector ante agentes químicos promotores del daño oxidativo

Agustin Demarco Pimentel*, Franco Bernech*, Axel Santander, Aníbal Las, Valentina Guizzo, Milagros Benitez, Lucía Domínguez, Nicolás Mujica y Gonzalo Ferreira#

**Igual contribución al trabajo # autor correspondiente.*

Laboratorio de Canales Iónicos, Membranas Biológicas y Señalización Celular. Unidad Académica de Biofísica. Facultad de Medicina. Universidad de la República. Montevideo. Uruguay.

Las nanoburbujas son burbujas disueltas en solución con gas molecular dentro que pueden durar muchas horas en dicho estado, formando redes de interconexión sujetas a movimiento browniano. Las nanoburbujas de hidrógeno molecular en su generación producen radicales de hidrógeno en equilibrio, con fuerte tendencia a donar su electrón no apareado provocando reducción del medio. Decidimos probar si las nanoburbujas de H₂ (nH₂), son capaces de mitigar el daño producido por agentes químicos que promueven estrés oxidativo (AQO) ante exposición aguda, como Plomo (Pb²⁺), Antimonio (Sb³⁺) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Previamente reportamos que cuando se sometieron corazones aislados a concentraciones crecientes de nH₂ en partes por billón (ppb) en condiciones basales, disminuyeron la frecuencia cardíaca y el inotropismo cardíaco levemente (Guizzo et al., SBBM, 2023). Los resultados que obtuvimos ante la exposición de concentraciones micromolares crecientes de Pb²⁺, Sb³⁺ y H₂O₂ sugieren efecto preventivo y terapéutico por nH₂ al daño de AQO. Respecto al efecto terapéutico ante Pb²⁺, se observó que la exposición conjunta de 18 ppb nH₂ y Pb²⁺, recuperó los trastornos observados ante exposición aguda a Pb²⁺ solamente, entre 70-90% aproximadamente. Interesantemente, con Sb³⁺ en dosis de cientos de micromolar, hubo recuperación en contractilidad, tasa de arritmias y frecuencia cardíaca superior al lavado del tóxico en control, siendo superior al 150%. El efecto de las nH₂ con H₂O₂, mostraron una dependencia en tiempo y dosis más marcada con este agente que los anteriores. Se vio recuperación parcial de los efectos en frecuencia, contractilidad y tasa de arritmias con nH₂, siendo de aproximadamente 70% para dosis de 200 μM de H₂O₂ por 3 min. Mayores tiempos de exposición a H₂O₂, necesitaron mayores tiempos de exposición a nH₂. A dosis mayores a 500 μM de H₂O₂ por cierto tiempo, los efectos se volvieron irreversibles a exposición de nH₂, sugiriendo muerte celular. Estos datos fueron consistentes con lo observado en microscopía confocal de cardiomiocitos aislados, que muestran una tasa de sobrevivencia menor en los cardiomiocitos expuestos a H₂O₂, respecto a aquellos con H₂O₂ y nH₂. Los resultados sugieren que nH₂, dada su alta estabilidad y capacidad de difusión, pueden ser un tratamiento coadyuvante eficaz en patologías donde el stress oxidativo cardíaco juega un rol preponderante como ser injuria por isquemia reperusión (Guizzo et al., SBBM, 2023) y también exposición con AQO. Investigaciones en curso ayudarán a establecer posibles mecanismos de acción y extensión de esta acción.

Modificaciones post-traduccionales de MnSOD humana: rol de la acetilación de Lys29 en la regulación y protección del ciclo catalítico frente a la nitración

Gianfranco Frattini¹, Juan L. Puzzolo¹, Salvador I. Drusin¹, Santiago Mansilla², Rafael Radi^{2,3}, Diego M. Moreno¹, **Verónica Demicheli**^{2,3}.

¹Instituto de Química Rosario (CONICET-UNR) and Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Santa Fe, Argentina. ²Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad de la República, Uruguay. ³Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay.

La superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD) es una enzima antioxidante que puede ser inactivada por la nitración sitio-específica de la tirosina 34 (Y34), un evento que ha sido ampliamente observado en diversas patologías. La nitración sitio-específica de MnSOD de este residuo en particular ocurre por la reacción directa con peroxinitrito, un agente oxidante y nitrante que es capaz de acceder al sitio activo de la enzima. Por otra parte, la acetilación de la MnSOD es una modificación post-traducciona que también modula la actividad de la enzima, pero de manera reversible ya que la acción de la Sirt3 remueve la acetilación de esta y varias enzimas mitocondriales.

En este trabajo estudiamos los cambios estructurales y de actividad que causa la acetilación a nivel de lisinas (K) específicas (K29 y K98), con particular énfasis en aquella presente cerca del sitio activo (K29). Proponemos que la acetilación de la K29 bloquea el acceso de aniones al sitio activo, lo cual incluye el superóxido pero también al peroxinitrito. El bloqueo estérico de la entrada del peroxinitrito al Mn del sitio activo protegería la inactivación de la enzima ya que evitaría la nitración a nivel de la Y34. Se postula, asimismo, que la Sirt3 jugaría un rol en este mecanismo de protección. Nuestros estudios cubren tanto los aspectos experimentales como los computacionales de este fenómeno. Se realizaron simulaciones de dinámica molecular en MnSOD wild type y acetilada para poder determinar los cambios conformacionales que serían responsables de la regulación de la actividad de la enzima. Por otra parte se realizaron estudios de dinámica browniana para evaluar el efecto de estas modificaciones post-traduccionales en el acceso de superóxido y otros aniones al sitio activo de la enzima. Los estudios experimentales in vitro incluyeron análisis de actividad SOD luego de la exposición a acetilación y a agentes nitrantes, y se evaluó el efecto de la Sirt3 en diferentes condiciones. Por otra parte se realizaron estudios de nitración proteica. Nuestros resultados muestran que la acetilación de MnSOD a nivel de la K29 podría proveer una protección frente a la acción de peroxinitrito, previniendo la inactivación irreversible por nitración de la Y34.

Caracterización de un biosensor fluorescente basado en peroxirredoxina 3 humana y GFP “redox-sensible”

Giuliana Cardozo¹, Martín Hugo², Daniel Pastor-Flores³, Rafael Radi^{1, 4}, Aníbal M. Reyes^{1,4}, Madia Trujillo^{1,4}

¹Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; ² Department of Medicine, Health and Medical University, Postdam, Germany; ³KBI Biopharma, Leuven, Belgium; ⁴Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

La mitocondria representa una de las principales fuentes de especies reactivas del oxígeno y presenta múltiples sistemas antioxidantes que regulan su concentración y mantienen la homeostasis mitocondrial. Peroxirredoxina 3 (Prdx3), una peroxidasa basada en tioles, juega un rol fundamental en la reducción de hidroperóxidos de relevancia biológica, tales como peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y peroxinitrito, a nivel mitocondrial. Recientemente, nuestro grupo reportó que Prdx3 presenta actividad reductora de hidroperóxidos de ácidos grasos, provocando una rápida oxidación y sobreoxidación de la cisteína peroxidática de la enzima. En este sentido, Prdx3 funciona como un sensor endógeno de diversos hidroperóxidos en el compartimiento mitocondrial y puede ser aprovechada para la detección de estas especies tanto *in vitro* como *in cellula*. En este trabajo, se propuso diseñar y caracterizar una sonda fluorescente genéticamente codificada como reportero del estado redox mitocondrial. Se construyó una fusión recombinante entre PRDX3 humana y una proteína verde fluorescente “redox-sensible” (roGFP2), la cual fue insertada en un plásmido pET-28a(+)-TEV y posteriormente expresada en células bacterianas. Luego de su purificación y procesamiento, fueron estudiadas las propiedades espectrales y estado oligomérico de la proteína de fusión bajo condiciones reductoras y oxidativas. Mediante análisis por cromatografía de exclusión molecular, se encontró Prdx3-roGFP2 en forma dimerica tanto en el estado reducido como en el oxidado, a diferencia de Prdx3 nativa que se encuentra en forma dodecamérica en condiciones reductoras y dimerica en condiciones oxidativas. Por otra parte, la proteína de fusión exhibió espectros de excitación y emisión característicos, con longitudes de onda de excitación y emisión máximas esperadas para roGFP2. La exposición al agente reductor ditioneitol modificó los espectros de roGFP2, confirmando su capacidad de sensor cambios en el estado redox. Sin embargo, la incubación con H₂O₂ provocó cambios lentos en los espectros de excitación y emisión de roGFP2, sugiriendo que la transferencia de oxidación desde Prdx3 es poco eficiente. El estudio de la reactividad del biosensor frente a otros hidroperóxidos, así como la evaluación de su actividad *in cellula* se encuentra actualmente en proceso.

Apoptosis neuronal inducida por el factor de crecimiento nervioso (NGF) modificado oxidativamente

Garcimartín S^{1,2}, Campolo N^{1,2}, Mastrogiovanni M^{1,2}, Trias E³, Barbeito L³, Durán R⁴, Delgado-Esteban M⁵, Almeida A⁵, Radi R^{1,2} and Bartesaghi S^{1,2}.

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. ²Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. ³Laboratorio de Neurodegeneración, Institut Pasteur, Montevideo, Uruguay. ⁴Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable e Instituto Pasteur de Montevideo. ⁵Instituto de Biología Funcional y Genómica, Universidad de Salamanca, CSIC, Salamanca, España.

El factor de crecimiento nervioso (NGF) es una neurotrofina con un rol fundamental en el desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso central y periférico. Es susceptible a diferentes modificaciones oxidativas post-traduccionales mediadas por peroxinitrito y sus radicales derivados, de las cuales la nitración de tirosinas es la principal. Previamente, experimentos *in vitro* han demostrado la susceptibilidad del NGF frente al peroxinitrito, así como también una ganancia de función tóxica contraria a la del NGF nativo, cuya actividad es de supervivencia y neuroprotectora. La señalización a través de NGF es compleja y depende de los niveles de expresión de varios receptores y co-receptores. Mientras que el receptor TrkA (Tropomyosin receptor kinase A) provee de soporte trófico y estimula la supervivencia neuronal, el receptor p75^{NTR} (p75 neurotrophin receptor) está vinculado con la apoptosis celular. En este sentido, la presencia de NGF tratado con peroxinitrito (NO₂NGF) y un desbalance en la expresión de receptores favoreciendo p75^{NTR}, como se observa en escenarios neurodegenerativos, podría contribuir a la progresión de la patología. En este trabajo, se purificó el NGF a partir de glándulas submaxilares de ratón y se lo expuso a un flujo de peroxinitrito mediante infusión lenta (NGF 50 µM, ONOO⁻ 50 µM/min, 20 min). Los productos de reacción se analizaron mediante western blot y espectrometría de masas. La exposición de NGF a peroxinitrito resultó en la nitración de los dos residuos de tirosina presentes en el NGF: Tyr52 y Tyr79, con rendimientos comparables. Luego se estudió la actividad biológica del NO₂NGF en cultivos primarios de neuronas corticales. Se caracterizó la expresión de los receptores de NGF mediante western blot, observándose un aumento de p75^{NTR} durante la diferenciación neuronal. Se estudió la capacidad del NO₂NGF de inducir la apoptosis mediante citometría de flujo e inmunocitoquímica. El tratamiento con NO₂NGF dio lugar a un aumento de la apoptosis desde concentraciones tan bajas como 1 ng/mL, mientras que el NGF nativo no tuvo ningún impacto en la viabilidad celular, incluso a concentraciones de 100 ng/mL. Finalmente, se estudió la formación *in cellula* de NO₂NGF, luego de exponer a las neuronas a un flujo externo de peroxinitrito. El presente proyecto busca dilucidar cómo el peroxinitrito y el NO₂NGF promueven la muerte neuronal y podrían, en este sentido, contribuir a la progresión de enfermedades como el Alzheimer.

Nitración de hemo-proteínas mediada por $\bullet\text{NO}_2$ tras la fotólisis del agente nitrante DNI.

Natalia Rios^{1,2}, Adrián Aicardo^{2,3}, Mauricio Mastrogiovanni^{1,2}, Lorena Herrera^{1,2}, Lucía Piacenza^{1,2}, José M. Souza^{1,2}.

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

³Departamento de Nutrición Clínica, Escuela de Nutrición, Universidad de la República.

El agente nitrante fotoquímico 5-metil-1,4-dinitro-1*H*-imidazol (DNI) ha sido descrito recientemente como una herramienta eficaz para nitrar residuos de tirosinas. El DNI se descompone homolíticamente bajo la luz UV-A, produciendo radical nitroimidazol ($\bullet\text{NI}$) y $\bullet\text{NO}_2$, capaz de nitrar tirosinas tanto en proteínas aisladas como en células, siendo la primera molécula reportada con aplicación biológica que actúa como un dador de $\bullet\text{NO}_2$. Recientemente describimos un método para su síntesis, y realizamos una extensa caracterización bioquímica demostrando su aplicabilidad *in vitro* y en modelos celulares. Evidenciamos la producción de $\bullet\text{NO}_2$ tras irradiación de luz debido a la homólisis del enlace N- NO_2 del DNI, y demostramos cómo la fuente de luz puede modular los rendimientos y la cinética de la reacción de nitración. La homólisis de DNI activada por luz UV-A brinda la posibilidad de ajustar los flujos de $\bullet\text{NO}_2$ siendo una herramienta muy útil para generar eventos nitrooxidativos en proteínas aisladas y modelos celulares, permitiendo estudiar diferentes cuestiones relevantes para la bioquímica y biología redox. En este trabajo expandimos su aplicación a la nitración de hemo-proteínas (hemoglobina, mioglobina y citocromo c) donde evidenciamos que el grupo hemo juega un rol protector impidiendo la nitración de residuos de tirosinas tras irradiación del DNI. Sin embargo, otros blancos moleculares presentes en la solución si son capaces de ser nitrados. Mediante análisis de HPLC evidenciamos que la hemo-proteína no tiene ningún efecto en el clivado del enlace N- NO_2 . En estudios posteriores observamos que al bloquear el hierro hémico con azida de sodio se alcanza un bajo rendimiento de nitración. En cambio, la desnaturalización de la hemo-proteína con cloruro de guanidinio y posterior incubación con DNI y UV-A generó buenos rendimientos de nitración, observados por análisis de MS. Alternativamente, también se obtuvieron buenos rendimientos de nitración mediante el atrapamiento del radical $\bullet\text{NI}$ con el atrapador de spin 2-metil-2-nitrosopropano (MNP). El mapeo de NO_2 -Tyr en cyt c mediante MS-MRM mostró NO_2 -Tyr48, NO_2 -Tyr67, y NO_2 -Tyr74. Futuros análisis mediante EPR y MS nos permitirán evidenciar la formación de un aducto MNP-NI.

En conclusión, postulamos que el radical $\bullet\text{NI}$ actúa como reductor del hierro férrico, el cual una vez reducido a Fe^{+2} , es capaz de reducir al radical $\bullet\text{NO}_2$ dando nitrito (NO_2^-), impidiendo así la nitración de la propia hemo-proteína.

Diagnóstico y cuantificación de *Diaporthe aspalathi*, *D. caulivora*, *D. miriciae* y *D. longicolla* en plantas de soja mediante qPCR multiplex.

Jorajuría M.², Gurméndez J.², Grijalba P.³, Ponce de León I.¹, Mena E.^{1*}

¹Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay. ²Facultad de Ingeniería, Universidad ORT, Uruguay. ³Departamento de Producción de Plantas, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

La soja (*Glycine max* L.) es uno de los cultivos de mayor importancia económica en Uruguay. La soja se ve afectada por varios patógenos fúngicos, incluidas las especies del género *Diaporthe* que causan el cancro del tallo de la soja (CTS), enfermedad que reduce el rendimiento a nivel mundial. Hasta la fecha, los patógenos que causan el CTS son *Diaporthe aspalathi*, *D.caulivora*, *D.longicolla*, *D.miriciae*, y *D.masirevicii*. Los síntomas de la enfermedad son similares entre las especies de *Diaporthe* y consisten en lesiones necróticas de color rojizo-marrón en los tallos. La similitud entre las características morfológicas y los síntomas de la enfermedad entre las especies constituyen un desafío para el diagnóstico convencional de enfermedades. El presente estudio tiene como objetivo diagnosticar y cuantificar *D.aspalathi*, *D.caulivora*, *D. longicolla* y *D.miriciae*, mediante qPCR multiplex. No se incluyó *D.masirevicii* ya que fue la última especie reportada en el país, con baja de incidencia hasta la fecha. Se diseñaron cuatro conjuntos de cebadores y sondas TaqMan específicos de cada especie de *Diaporthe* basándose en las secuencias del gen del factor de elongación de la traducción 1-alfa (tEF1a). La especificidad y eficiencia de los conjuntos cebador-sonda se probaron utilizando ADN genómico de cultivos puros de especies de *Diaporthe*. Se evaluó el ensayo de qPCR múltiple en plantas de soja inoculadas con una o más especies de *Diaporthe*. Observamos que las especies de *Diaporthe* estudiadas se pueden detectar y cuantificar por qPCR múltiple solas o en simultáneo. Además, se analizaron 54 tallos, y semillas provenientes de 30 plantas con síntomas del CTS. Se detectó *D.aspalathi*, *D.caulivora*, *D.longicolla* y *D.miriciae* en tallos con síntomas del CTS y solo *D.caulivora*, *D.longicolla* en semillas. Se obtuvo un aislado de *D.aspalathi*, especie que creíamos no estaba afectando la soja en el país por la presencia de genes de resistencia *Rdm1-6* en las plantas. Se detectó en simultáneo más de una especie de *Diaporthe* en un mismo tallo de soja, lo que evidencia que las especies pueden co-existir o co-infectar en la planta. En plantas con lesiones muy avanzadas se detectó la misma especie de *Diaporthe* en tallo y semillas. La especie detectada con mayor frecuencia en el tallo y las semillas fue *D.longicolla* (especie que también causa la enfermedad de descomposición de las semillas). El uso de qPCR multiplex es una herramienta útil para el diagnóstico de *D.aspalathi*, *D.caulivora*, *D.miriciae* y *D.longicolla*, en plantas de soja con síntomas del CTS.

Explorando estrategias de edición génica para promover el reemplazo alélico en soja

María Pía Coronel, Sabina Vidal, Andrea Luciana Fleitas.

Laboratorio de Biología Molecular Vegetal (Instituto de Química Biológica), Facultad de Ciencias, UdelaR.

La soja es uno de los cultivos más relevantes para Uruguay, siendo el que mayor superficie de siembra ocupa y encabezando desde hace más de 20 años el rubro exportaciones. El déficit hídrico y otros factores de estrés afectan la productividad de este cultivo, la cual suele ser menor en Uruguay que la reportada para otros países de la región. Las nuevas tecnologías de edición génica han demostrado un enorme potencial para contribuir al mejoramiento genético de los cultivos. Estas tecnologías, principalmente las basadas en el sistema *CRISPR/Cas*, pueden utilizarse para introducir mutaciones en sitios específicos del genoma. Las mutaciones ocurren como resultado de la reparación de un corte a nivel de la doble hebra del ADN, generado específicamente por el sistema de edición génica. Los mecanismos de reparación del ADN incluyen aquellos que involucran la unión de extremos libres no homólogos (*NHEJ*), que predominan en células somáticas, o aquellos que dependen de la recombinación homóloga (*HR*), que operan principalmente en células sexuales mientras que suelen ser poco eficientes en células somáticas.

Aquí desarrollamos un sistema para realizar el reemplazo alélico mediado por *CRISPR/Cas9* de un gen endógeno de la soja (*EPSPS1*), en el que los eventos editados se pueden detectar fácilmente utilizando la resistencia a herbicidas como agente selectivo. Reemplazar la *EPSPS1* endógena con una variante mutante que confiera insensibilidad al glifosato conduciría a plantas resistentes al glifosato que simplifican el fenotipado de eventos editados.

En este trabajo se buscó determinar si las mutaciones TIPS (Thr102-Ile + Pro106-Ser) o TIPA (Thr102Ile + Pro106-Ala) en la proteína codificada por el gen *EPSPS1* de soja, confieren insensibilidad al herbicida glifosato. Para ello, se analizaron los niveles de expresión mediante RT-PCR semicuantitativo de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*, expresando una versión de la proteína conteniendo las mutaciones TIPS o TIPA. Posteriormente, se hicieron ensayos fenotípicos para evaluar la sensibilidad y el rendimiento de las plantas transgénicas tratadas con el herbicida glifosato, realizando los análisis correspondientes.

En segundo lugar, se generaron vectores multipropósito (serie PiLuCas) para transformar raíces de soja de forma transitoria mediante *Agrobacterium rhizogenes* y de esa manera evaluar la factibilidad y eficiencia de obtención de eventos de reemplazo alélico.

Se buscará iniciar el proceso para determinar la factibilidad, eficiencia y heredabilidad de eventos de reemplazo alélico en plantas enteras, mediante la introducción del sistema *CRISPR/Cas9* en cotiledones de soja mediante la transformación estable por *Agrobacterium tumefaciens*.

Caracterización molecular de híbridos interespecíficos entre *Eucalyptus grandis* y *Eucalyptus dunnii* empleando marcadores SNPs

Gastón Bonilla¹, Rodrigo Rubio¹, Damián Duarte², Héctor Oberti¹, Marianella Quezada³

¹Departamento de Biotecnología, Universidad ORT, Montevideo, Uruguay. ²UPM Forestal Oriental, Paysandú, Uruguay. ³Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía-UDELAR, Montevideo, Uruguay

Las especies del género *Eucalyptus* se destacan a nivel forestal por su alta productividad en diferentes condiciones de sitio y múltiples usos, tanto para madera sólida como pulpa para producción de celulosa. El cruzamiento interespecífico es una de las técnicas más utilizadas en el mejoramiento genético, permitiendo complementar características superiores de las especies puras. La evaluación y caracterización de la diversidad y estructura de las poblaciones resultantes de dichos cruzamientos requiere del uso de herramientas sofisticadas, como los marcadores moleculares. El objetivo de este trabajo es realizar una caracterización molecular de una población híbrida entre *Eucalyptus grandis* y *Eucalyptus dunnii*. La misma está conformada por 995 individuos, resultado del cruzamiento entre 25 progenitores puros de *E. grandis* y 31 progenitores *E. dunnii*. La población híbrida y 46 progenitores fueron genotipados con el chip de alta densidad de marcadores SNP (*single nucleotide polymorphism*) Euc72k Axiom *Eucalyptus* Genotyping Array. Para 10 progenitores *E. grandis* se contaba con datos genotípicos obtenidos con la versión anterior del mismo chip y los marcadores faltantes fueron imputados. Del estudio de los marcadores SNPs en el programa AxiomAnalysisSuite, se concluyó que un aumento del número de muestras permite obtener tasas más altas de call rate por individuo y mayor número de marcadores. Del total de 68.055 SNPs presentes en el chip, se obtuvieron 52.212 (76%), 46.929 (68%) y 54.138 (79%) marcadores de calidad para la población híbrida, progenitores *E. dunnii* y *E. grandis*, respectivamente. Para confirmar la identidad híbrida de la población, fueron comparadas las relaciones de parentesco por medio de la matriz de relaciones genealógicas (matriz A) con la matriz de relaciones genómicas (matriz G). La matriz A presentó valores desde 0 (sin relación) hasta 0.5 (relaciones progenitores-hijos y hermanos completos). Para la matriz G, se observó una distribución continua de valores, indicando relaciones no descritas por genealogía. Específicamente, fueron comparadas las relaciones genéticas entre híbridos y progenitores, donde se confirmó la identidad de los híbridos interespecíficos para el 50% de la población. Sin embargo, para los restantes individuos se observó una alta contribución de alelos maternos, y se está estudiando las posibles causas de esta predominancia. El análisis de PCA confirmó estos resultados, con individuos híbridos agrupados entre ambos agrupamientos parentales, pero otros agrupados junto la especie del progenitor materno. En conclusión, el uso de marcadores moleculares ha permitido lograr avances en la caracterización genética de esta población y permitirá la correcta identificación de híbridos.

Explorando el rol de los miembros de la familia de factores de transcripción NF-Y sujetos a control traduccional en plantas de soja noduladas y sometidas a déficit hídrico

Píriz-Pezzutto, Selene¹; Martínez-Moré¹³, Mauro; Filippi, Carla¹; Fleitas Luciana²; Sotelo-Silveira, Mariana¹; Borsani, Omar y Sainz María Martha¹.

¹Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía UdelaR; ²Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, UdelaR; ³Department of Crop Sciences, University of Illinois, USA.

El cultivo de soja (*Glycine max*) es uno de los más importantes en el mundo. La soja es capaz de establecer relaciones mutualistas con rizobios. Esta simbiosis induce cambios metabólicos y nutricionales significativos en la planta. Existen evidencias que sugieren que la condición de nodulación puede afectar las estrategias de respuesta a la falta de agua (respecto a la condición de no-nodulación) pero que no ahondan en los mecanismos moleculares responsables de la alteración de dicha respuesta. Estas estrategias de respuesta diferenciales —dependientes de nodulación— al déficit hídrico pueden ser explicadas por cambios en la regulación de la expresión génica. En particular, el control traduccional ha demostrado ser relevante en plantas ante situaciones de déficit hídrico, pues permite a las células responder rápidamente ante un estímulo confiriéndoles flexibilidad y adaptabilidad. Los factores de transcripción (FT) también son clave, pues están involucrados tanto en la regulación de mecanismos de tolerancia al estrés ambiental como en el proceso de nodulación. La familia de FT NF-Y (factor nuclear-Y) se compone por los miembros NF-YA, NF-YB y NF-YC, que conforman estructuras heterotriméricas para ejercer el control de la expresión génica sobre genes blanco al que reconocen mediante el motivo CCAAT. Existe evidencia de que estos FT están involucrados en la regulación transcripcional de procesos tales como la simbiosis y la tolerancia a déficit hídrico. En este trabajo, mediante el uso de datos de RNA-seq previamente generados en un ensayo diseñado para analizar el transcriptoma y el traductoma de raíces de plantas de soja noduladas (N) y sometidas a déficit hídrico (E), identificamos miembros pertenecientes a la familia de FT NF-Y que se encuentran diferencialmente expresados (DEG) a nivel traduccional (ya sea exclusivo o junto a control transcripcional) en plantas NE respecto a plantas en condiciones control (tanto de riego como de nodulación, contrastes NE vs NC y NE vs NNE, respectivamente). Asimismo, analizamos cuales de los blancos putativos de estos FT se encontraban DEG en las mismas condiciones experimentales en que lo estaban los FT. Actualmente, nos encontramos realizando la caracterización funcional (mediante sobreexpresión y knocko en *hairy roots* en soja) de aquellos FT más relevantes con el fin de comprender sus roles en los mecanismos de respuesta de las plantas noduladas al déficit hídrico. Esta información podría ayudar en la selección de proteínas que permitan obtener a futuro plantas que se desempeñen mejor en condiciones de déficit hídrico cuando están noduladas.

Filogenómica de *Feijoa sellowiana* berg (“guayabo del país”) basado en genoma cloroplástico completo

Mauricio Pesce, Hector Oberti, Magdalena Vaio, Clara Pritsch

Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía, Udelar. mauriciopesce@outlook.com

El “guayabo del país” (*Feijoa sellowiana* Berg., Myrtaceae) es una especie frutal que se distribuye naturalmente desde el sur del estado de Paraná (Brasil) hasta el norte de Uruguay, aunque los principales centros de producción se encuentran en Nueva Zelanda y Estados Unidos. La disminución en el costo de las tecnologías de secuenciación masiva ha facilitado la implementación de estudios filogenéticos intraespecíficos utilizando genomas cloroplásticos completos. En este trabajo se estudiaron las relaciones filogenéticas entre 13 accesiones de guayabo de Uruguay (URU), Brasil (BR) y Nueva Zelanda (NZ), utilizando genomas cloroplásticos completos. Se analizaron tres accesiones silvestres provenientes de UY (2) y BR (1), y 10 cultivares incluyendo 3 de UY, y 7 de NZ. Los genomas cloroplásticos de 12 accesiones se ensamblaron de novo con NOVOPlasty. La secuencia cloroplástica de una accesión de BR (KX289887.1) se recuperó de GenBank. Además, se realizó la anotación del genoma plastidial de la accesión TCO (UY) utilizando GeSeq v2.03. *Campomanesia xanthocarpa* (KY392760.1) se utilizó como outgroup. Los alineamientos múltiples se implementaron en MAFFT (algoritmo FFT-NS-i x1000, matriz 1PAM) y para la inferencia filogenética se utilizaron abordajes de máxima verosimilitud (ML) e inferencia Bayesiana (BI) usando el modelo GTR+G, en los softwares RAXML y MrBayes, respectivamente. Los genomas de TCO y KX289887.1 presentaron variantes en el largo de la región IR, y en la presencia/ausencia de: un fragmento truncado del gen *rps19*, del gen *ycf68* y de un segundo exón para el gen *trnI-GAU*. Las topologías de los árboles ML y BI fueron idénticas, y todos los nodos presentaron alto valor de soporte. Las 13 accesiones analizadas se dividieron en dos clados: el clado 1 integrado por la accesión KX289887.1 (BR) y un cultivar de NZ; el clado 2 integrado por las cinco accesiones de UY, y los restantes seis cultivares de NZ. A su vez, el clado 2 se subdividió en dos subclados con 3 (todas UY) y 8 (2 UY y 6 NZ) accesiones, respectivamente. Este trabajo reporta la primera evidencia de dos linajes claramente diferenciados en los guayabos de UR. Además, 6 de los 7 cultivares de NZ compartieron linaje plastidial con 2 de los 3 cultivares de UY, confirmando que plantas/semillas de origen UY fueron utilizadas para el desarrollo de cultivares en NZ. Estos resultados preliminares valorizan al guayabo de UY como recurso genético y alientan a ampliar la caracterización con nuevas accesiones del país y de la región.

Interacción de *Arabidopsis thaliana* y especies de *Diaporthe*: posible rol de las hormonas en la defensa vegetal.

Camacho E.¹, Ponce de León I.¹, Mena E.¹

¹Departamento de Biología Molecular. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.
ecamacho@fagro.edu.uy

El cancro del tallo de la soja (CTS) es una de las principales enfermedades que afecta la productividad de la soja en Uruguay. Es causado especies de *Diaporthe* como *D. caulivora*, *D. aspalathi*, *D. longicolla*, *D. masirevicii* y *D. miriciae*. Estudios previos de nuestro grupo mostraron que *D. caulivora* causa síntomas en *Arabidopsis thaliana*. La misma es utilizada como planta modelo por la disponibilidad de mutantes en vías hormonales, involucradas en la defensa vegetal. Hasta la fecha, existen pocos estudios sobre los primeros estadios de infección de *Diaporthe* spp. en mutantes de *A. thaliana*. El objetivo de este trabajo consistió en describir la infección de las especies de *Diaporthe* causantes del CTS en plantas de *A. thaliana* silvestres (*wt*) y mutantes en las vías hormonales. Se incluyeron los mutantes en la isocorismato sintasa 1 (*sid2*) involucrada en la síntesis del ácido salicílico (SA) y en el receptor del SA, NPR1 (non-expressor of pathogenesis-related genes 1) (*npr1*). Para la vía del etileno se utilizó un mutante en EIN2 (ethylene insensitive 2; *ein2*) involucrado en la señalización. Además, el mutante *aba1* (abscisic acid deficient 1) implicado en la biosíntesis del ácido abscísico (ABA); el mutante en el receptor de auxinas *tir1* (transport inhibitor response 1) y *axr1* (auxin resistant 1) involucrado en la señalización de auxinas. Fueron inoculadas hojas desprendidas de *A. thaliana* con micelio de las cinco especies de *Diaporthe* (n=48 por genotipo). Todas las especies de *Diaporthe* fueron capaces de infectar *A. thaliana*, observándose maceración del tejido a las 24 y 48 horas posteriores a la inoculación (hpi) en dependencia del patógeno. Se observó clorosis y muerte celular en el sitio de infección. Se midió el área de las lesiones y se evidenciaron diferencias significativas entre los tratamientos según Kruskal-Wallis/Dunn's $p \leq 0.05$, siendo *D. masirevicii* y *D. longicolla* las especies más agresivas. Además, se comprobó colonización y proliferación del hongo dentro de los tejidos mediante microscopia. Las plantas de *A. thaliana* mutantes para la vía de etileno (*ein2*) y ácido absícico (*aba1*) fueron las más susceptibles en todas las infecciones, sugiriendo que estas hormona participan en la respuesta de defensa a estos patógenos. Se requieren más estudios que incluyan otros mutantes y análisis moleculares que evalúen la expresión de los genes de defensa en estas plantas. Los estudios en *A. thaliana-Diaporthe* permitirán comprender mejor la interacción e inferir el rol de las hormonas vegetales para su estudio en plantas de soja.

Detección y caracterización del virus Turnip Yellow Virus (TuYV) de la colza en Uruguay

Jimena Delfino¹, Horacio Silva², Esteban Hoffman³, Inés Ponce de León¹ y Astrid Agorio¹

¹Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. ²Facultad de Agronomía. ³Unicampo Uruguay

El cultivo de colza (*Brassica napus*) se utiliza para la producción de aceite vegetal, biodiesel y alimento animal, y actualmente ocupa el segundo lugar después de la soja en cuanto a producción de aceite y consumo mundial de semillas oleaginosas. En Uruguay, el cultivo de colza se encuentra en crecimiento y cada vez tiene un rol más significativo entre los cultivos de importancia a nivel nacional: durante la zafra 2022 el área cultivada de colza en Uruguay fue de 162 mil hectáreas, habiendo aumentado 42% la superficie respecto a lo sembrado en el ciclo previo.

A pesar de su importancia económica, la producción de colza a nivel mundial no está alcanzando su máximo potencial de rendimiento y se considera que la infección por el virus Turnip yellows (TuYV) es una de las principales razones de que esto ocurra. La infección por TuYV afecta a todos los componentes del rendimiento en los cultivos de colza, pero suele pasar desapercibida debido a que los síntomas que se presentan son indistinguibles del estrés abiótico, incluyendo amarillamiento, enanismo, enrojecimiento de las hojas, clorosis interveinal y crecimiento atrofiado. Para identificar un cultivo infectado por TuYV se debe recurrir a técnicas moleculares que no están siempre disponibles.

En 2023 nuestro laboratorio, en colaboración con la industria semillera, reportó por primera vez la presencia del virus TuYV en Uruguay. Poder asociar síntomas asociables a virosis con la presencia del virus es de vital importancia para tomar medidas que ayuden al manejo del cultivo, como es el cultivo de un material vegetal resistente al virus. En este trabajo se presentan los resultados que fueron obtenidos hasta el momento a partir del estudio de plantas de 4 chacras diferentes del litoral uruguayo (zafra 2023). Estos incluyen los resultados de la puesta a punto de un sistema de detección del TuYV por PCR, así como los resultados de un estudio filogenético con secuencias obtenidas de TuYV identificado en Uruguay.

El trabajo de detección y secuenciación de TuYV continuará en la zafra 2024 ya que es de suma importancia establecer un sistema de vigilancia y diagnóstico para apoyar a los productores nacionales de colza, ayudar a evitar la propagación del virus y las pérdidas económicas que esto significaría para el país.

Respuestas al ambiente lumínico en cebada cervecera: bases fisiológicas y moleculares del mecanismo de foto-inducción floral.

Nicolás Mastandrea, Gastón Quero, Mariana Sotelo

Dpto. de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Av. Garzón 780, Montevideo, Uruguay. nicomasta@gmail.com

El ambiente lumínico que comprende al fotoperíodo, intensidad y composición espectral de la luz es tanto una fuente de energía para la fotosíntesis como una fuente de información para el desarrollo de las plantas. La calidad y la intensidad de la luz no son constantes en los ambientes naturales por lo que la integración de varias señales es esencial para que la planta descifre que es lo que está pasando en su entorno. La inducción floral es un proceso complejo que involucra la interacción de señales de varias vías que registran información de la planta y el ambiente, promoviendo la transición al estado reproductivo cuando las condiciones son favorables. Estudios genéticos en plantas modelo han ayudado a identificar genes claves para la inducción del estado reproductivo que conforman redes complejas de regulación involucrando mecanismos genéticos y epigenéticos. En cebada (*Hordeum vulgare* L.), se conocen tres clases de genes que influyen en la determinación del tiempo a floración: genes de sensibilidad al fotoperíodo (*PPD-H1* y *PPD-H2*), genes relacionados con el requerimiento de vernalización (*VRN-H1*, *VRN-H2*, *VRN-H3*) y genes de precocidad per se (*EPS*). Sin embargo, se conoce muy poco acerca de los genes que median el pasaje al estado reproductivo en respuesta a la intensidad lumínica en cebada. El objetivo de la presente propuesta es contribuir a la identificación de los mecanismos moleculares que subyacen a la inducción del estado reproductivo en respuesta a la intensidad lumínica. Para ello, estudiaremos el perfil de expresión de genes en la transición del estado vegetativo a reproductivo en respuesta a ambientes lumínicos diferentes a través de RNA-seq en dos genotipos de cebada con diferente sensibilidad al fotoperíodo. Como resultado se espera contar con una base de datos de las respuestas en los parámetros fotoquímicos de la fotosíntesis a las intensidades lumínicas diferenciales; obtener una base de datos con la caracterización fenológica y morfológica de los genotipos evaluados: tamaños de los meristemos, el tiempo a doble arruga, valor de filocrón, número de hojas desarrolladas, primordios de espiguillas iniciados de los genotipos en respuesta a los ambientes lumínicos evaluados. Se obtendrá el repertorio de los genes diferencialmente expresados en los distintos genotipos y ambientes lumínicos, lo que nos permitirá conocer más acerca de los mecanismos moleculares asociados al tiempo de inducción de la floración en respuesta a la intensidad lumínica y su relación con los mecanismos de partición de la energía.

Mecanismos de regulación de la ruta de vesiculación cloroplástica en soja.

Timothy Riley¹, Luciana Fleitas¹ y Sabina Vidal¹

¹Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, UDELAR. titorg16@gmail.com

La soja es uno de los cultivos más importantes económicamente en Uruguay. Esta especie es especialmente sensible a la sequía y por tanto el rendimiento del cultivo está limitado por el déficit hídrico. Este trabajo apunta a profundizar en el conocimiento sobre la regulación del gen CV1 (chloroplast vesiculation 1), cuyo perfil de expresión muestra una correlación negativa con la tolerancia a la sequía en soja. Los genes CV participan en la vía de degradación de cloroplastos durante la senescencia natural y la inducida por estrés. CV1 se expresa tanto en hojas como en raíces, sugiriendo que esta proteína cumpliría un papel en tejidos no fotosintéticos, además de los fotosintéticos. Para conocer el rol de CV en las raíces, se determinará la localización intracelular de la proteína y su posible colocalización con un marcador de plástidos de raíz (RFNR). Por otro lado, se determinará el patrón de acumulación de CV1 y su relación con la acumulación de auxinas, así como con distintas formas de muerte celular programada (PCD).

Para ello, se generaron plantas de *Arabidopsis* transgénicas conteniendo un cassette de expresión de CV1 como fusión a la proteína fluorescente amarilla (CITRINA), bajo el control del promotor de CV1 de soja (proCV1-CV1:CTR). A su vez, se generó una construcción génica expresando RFP retenida en el retículo endoplasmático (sec-RFP-HDEL), bajo el control del promotor de respuesta a auxina DR5, así como también bajo el control del promotor del gen BFN1, como marcador de PCD. Se generó además una construcción génica que expresa la proteína RFNR (localizada en los plástidos de raíz de *Arabidopsis*), fusionada a RFP, bajo el control del promotor de RFNR. La visualización en el confocal de las plantas de *Arabidopsis* transgénicas resultantes, que expresan cada una de las tres construcciones mencionadas arriba, junto con proCV1-CV1:CTR, permitirá saber si existe colocalización tisular o intracelular entre CV1 y los otros marcadores de las distintas vías u organelos. Además de la generación de plantas de *Arabidopsis* transgénicas, se transformarán plantas de soja con la construcción CV1:YFP, usando *Agrobacterium rhizogenes*, para obtener raíces peludas (hairy roots) transgénicas. Esas raíces serán noduladas y la expresión de CV1:YFP en raíces será analizada mediante microscopía confocal.

Este estudio contribuirá a comprender mejor los mecanismos moleculares implicados en la respuesta de la soja al estrés hídrico, y podrá proporcionar nuevas estrategias para mejorar la tolerancia de los cultivos a la sequía, crucial para la seguridad alimentaria y la sostenibilidad agrícola.

Modulando la expresión de genes reguladores de senescencia inducida por estrés en soja mediante CRISPR-Cas9.

Selene Briano, Joaquín Fernández, Andrea Luciana Fleitas, Sabina Vidal

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

La soja es el cultivo más importante en términos de área cultivada en Uruguay y en la región. Al ser un cultivo de verano, la soja está expuesta frecuentemente a períodos de sequía que afectan el rendimiento y la calidad del cultivo. Trabajos previos de nuestro grupo mostraron que la expresión de genes de Vesiculación Cloroplástica (CV) es inducida por el déficit hídrico y es diferencialmente regulada en genotipos contrastantes de soja, exhibiendo una correlación negativa entre sus niveles de expresión y la tolerancia a sequía. En soja existen dos genes CV: CV1 y CV2. Ambos participan en procesos de degradación cloroplástica, pero sólo CV1 se induce significativamente en condiciones de estrés. La especificidad funcional de los genes CV1 y CV2 fue confirmada por análisis de sus promotores específicos en *Arabidopsis* transgénica expresando el gen reportero GUS bajo el control de los promotores de CV1 y CV2 (proCV-GUS). El promotor de CV1 respondió principalmente a estímulos abióticos (hiperosmolaridad, salinidad y estrés oxidativo), mientras que el promotor de CV2 estuvo principalmente activo durante la senescencia natural. Por tanto, el gen CV1 resulta un blanco prometedor para retrasar la senescencia inducida por estrés mediante estrategias de modulación de la expresión del gen sin alterar la senescencia natural de las plantas.

Se generaron construcciones génicas para expresión del sistema CRISPR/Cas9 y se generaron plantas transgénicas para editar regiones específicas del promotor de CV1, a fin de determinar si dichas alteraciones disminuyen la inducción por estrés de CV1 in vivo.

A su vez, se diseñó una estrategia para estudiar el rol de dos factores de transcripción NAC en la expresión de CV1. Dichos factores están involucrados en la regulación de la senescencia y estrés. Se generaron plantas transgénicas proCV1-GUS con expresión condicional de los factores NAC. Dichas plantas permitirán cuantificar la actividad GUS en presencia o ausencia de los NAC y determinar el rol de estos factores de transcripción en la regulación de CV1.

Acumulación de prolina en plantas bajo estrés abiótico y su relación con la fotosíntesis

Tarragó-Mir V.¹, Sena F.^{1,2} & Signorelli S.¹

¹Grupo Food and Plant Biology, Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. ²Laboratorio de Biología de Apicomplejos, Instituto Pasteur Montevideo, Uruguay.

En situaciones de estrés abiótico se alteran los procesos fisiológicos y metabólicos de las plantas entre ellos la biosíntesis y acumulación de prolina. La relevancia bioquímica y fisiológica de esta respuesta sigue siendo poco clara, y por ello, poco usada para el desarrollo de cultivos tolerantes. En este proyecto utilizamos un enfoque innovador, centrado en el metabolismo de la prolina como una estrategia de las plantas para permitir la aclimatación efectiva al estrés abiótico. La hipótesis central es que durante el estrés la acumulación de prolina permite la regeneración de NADP⁺ cloroplástico, actuando como un mecanismo para evitar la fotoinhibición, así como la producción de especies reactivas del oxígeno. Para entender esto generamos líneas doble mutantes *pyrroline 5-carboxilate synthase 1-1/chlororespiratory reduction 2-2* (*p5cs1-1/crr2-2*) y *p5cs1/NADP-malato deshidrogenasa* (*p5cs1-1/NADP-mdh*). La proteína *crr2* está involucrada en la regulación del flujo de la cadena transportadora de electrones cloroplástica mientras que la NADP-MDH contribuye a balancear los niveles de NADP/NADPH entre el citoplasma y el cloroplasto, por lo que estas líneas permitirán explorar la relación entre la acumulación de prolina y la homeostasis redox a nivel de NADP/NADPH. A su vez, generamos líneas doble mutantes *p5cs1-1/plastid-roGFP* que se utiliza para monitorear los niveles de glutatión reducido y glutatión disulfuro como indicadores del estatus redox cloroplásticos. De este modo, con las plantas *p5cs1/plastid-roGFP* podremos investigar si la acumulación de prolina contribuye a un balance redox cloroplástico. Por otra parte evaluamos la actividad fotosintética en plantas incapaces de acumular prolina mediante ensayos donde utilizamos *Arabidopsis thaliana* Columbia 0 wild type (WT) y el mutante incapaz de acumular prolina *p5cs1-1*. Los resultados indican que la actividad fotosintética del PSII solo se ve afectada frente a condiciones de estrés osmótico, inducido con NaCl 150 mM, sin observarse diferencias significativas en la respuesta del fotosistema al comparar genotipos y tratamiento de sequía (capacidad de campo FC < 15%) y tratamiento control. Además, observamos que las plantas sometidas a tratamientos con salinidad, acumulan hasta el doble de prolina en sus tejidos fotosintéticos en comparación con las mutantes *p5cs1-1*. Los avances en esta temática nos permitirán entender si la acumulación de prolina contribuye o no a la regeneración de NADP⁺ cloroplástico, y si esto tiene un impacto a nivel de la actividad fotosintética.

Importancia de la homeostasis de arsénico en la interacción entre *Cupriavidus* sp. UYMMa02 y *Mimosa pudica*.

Ignacio Eastman¹, Virginia Ferreira^{2,1}, Verónica Alonso¹, Cecilia Rodríguez¹, Federico Battistoni³, Raúl Platero¹

¹Laboratorio de Microbiología Ambiental, Centro de Investigaciones en Ciencias Ambientales, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. ²Laboratorio de Microbiología Molecular, Área Microbiología, Departamento Biociencias, Facultad de Química. ³Laboratorio de Interacción Planta Microorganismo, Centro de Investigaciones en Ciencias Ambientales, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Uno de nuestros principales focos de investigación es el estudio de la interacción entre rizobios y leguminosas. En particular, nos interesa caracterizar los mecanismos implicados en la interacción entre rizobios pertenecientes a las beta-proteobacterias y sus plantas hospederas. Para ello desarrollamos un modelo basado en la cepa autóctona *Cupriavidus* sp. UYMMa02A, un rizobio aislado de nódulos de la leguminosa nativa *Mimosa magenta* (citas Platero et al., 2016, Iriarte et al., 2016).

Una característica destacada de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A es su capacidad para tolerar altas concentraciones de metales pesados, como arsénico, cobre y níquel (Platero et al., 2016). Esta resistencia, que comparte con otras especies del género *Cupriavidus*, es atribuible a la presencia de varios operones implicados en la resistencia a metales (Iriarte et al., 2016). Durante la interacción entre UYMMa02A y la planta hospedera *Mimosa pudica*, observamos la activación de operones relacionados a la homeostasis de varios metales, incluido los específicos para la resistencia a arsénico y cobre.

En este trabajo nos propusimos determinar el rol de estos mecanismos en la interacción simbiótica. Para esto se construyó una mutante por delección completa del gen *arsR*, el cual codifica presuntamente para un regulador del operón *ars*. Complementariamente, el gen *arsR* fue clonado en un plásmido que nos permite regular su expresión. Las cepas generadas fueron caracterizadas *in vitro* e *in vivo*. Los análisis fenotípicos *in vivo*, realizados tanto en conjunto con la planta como en condiciones *in situ*, permitieron evaluar la funcionalidad del operón *ars* y su esencialidad en la interacción rizobio-leguminosa. Además, se llevaron a cabo estudios de expresión génica diferencial en las etapas iniciales de la interacción simbiótica.

Los análisis de qPCR confirmaron que *arsR* actúa como represor del operón *ars*, ya que su delección resultó en la sobreexpresión del operón completo. Aunque la cepa mutante no mostró alteraciones en la velocidad de crecimiento ni en la nodulación en distintas especies de *Mimosa*, presentó mayor susceptibilidad al arsénico, evidenciando un crecimiento comprometido en su presencia.

Estos resultados no solo contribuyen a un mayor entendimiento de los mecanismos moleculares que subyacen a la resistencia al arsénico en *Cupriavidus* sp. UYMMa02A, sino que también subrayan el potencial de esta cepa en aplicaciones biotecnológicas. En particular, la capacidad de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A para resistir y prosperar en suelos contaminados con arsénico abre la posibilidad de utilizarla en la biorremediación ambiental.

Estudio de redes de interacciones genómicas de largo alcance vinculadas a desarrollo de fruto, mediante captura de la conformación de la cromatina y secuenciación masiva

Sotelo-Silveira, M.¹, Martín Rivara^{2,3}, Stefan de Folter⁴, Sotelo-Silveira, J.R.^{2,5}.

¹Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía, UdelaR, Uruguay. ²Departamento de Genómica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, MEC, Uruguay. ³Departamento de Genética, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay. ⁴Unidad de Genómica Avanzada (UGA-LANGEBIO), Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), Irapuato, Guanajuato 36824, México. ⁵Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay.

En las últimas décadas muchos estudios en la planta modelo *Arabidopsis* han llevado al conocimiento de los procesos y etapas del desarrollo de flores y frutos que han permitido contar con un marco morfológico para interpretar en detalle estudios genéticos y asignar funciones a genes durante este proceso (Alvarez-Buylla et al. 2010). Un gen importante es para el desarrollo del pistilo *SPATULA (SPT)*, este factor de transcripción interviene en el desarrollo del pistilo y determina el número final de semillas que la planta puede producir (Alvarez and Smyth 2002; de Folter et al, unpublished). Además, *SPT* tiene una función en la germinación de las semillas y en el tamaño de los cotiledones (Josse et al. 2011; Penfield et al. 2005). El control de la competencia reproductiva es necesario para lograr mejoras en el rendimiento de cultivos, por lo que entender en detalle la regulación y las interacciones de los principales genes que la regulan es crucial.

En este sentido, el objetivo de nuestro trabajo apunta a aumentar el conocimiento del control de la competencia reproductiva a través del entendimiento en detalle de la regulación y las interacciones de los principales genes que participan en la producción de las estructuras reproductivas en la planta modelo *Arabidopsis*.

La metodología 4C permite evidenciar los contactos de una región de interés con el resto del genoma, al generar una biblioteca de moléculas circulares de ADN conteniendo los interactores, que serán identificados por el alineamiento de las lecturas de secuenciación con el genoma de *Arabidopsis*. Los resultados de este trabajo contribuirán a ampliar la información sobre las redes de regulación transcripcional involucradas, y descubrir nuevos blancos o roles que ayuden a comprender el papel de dichas regiones en el control de la expresión génica en el proceso de desarrollo del fruto.

Eliminación masiva de núcleos somáticos durante el desarrollo larvario del cestodo modelo *Hymenolepis microstoma*

E. Failache^{1,*}, U. Koziol¹

¹Sección Biología Celular, Facultad de Ciencias (Udelar), Montevideo, Uruguay

Los cestodos son platelmintos parásitos con ciclos de vida complejos, que suelen incluir dos formas larvarias. La primera larva, conocida como oncósfera, es una forma de vida efímera y altamente reducida, que se especializa en la infección de un huésped intermediario. Trabajando con la oncósfera del cestodo modelo *Hymenolepis microstoma* evidenciamos que durante el desarrollo ocurre una reducción masiva en el número de núcleos: tras alcanzarse un máximo de 80-85 células nucleadas durante el desarrollo embrionario, la mayoría de los núcleos somáticos desaparecen, y en estadios tardíos del desarrollo larvario (cuando la oncósfera se vuelve infectiva) únicamente 25-30 células preservan su núcleo. Mediante hibridación *in situ* e inmunofluorescencia identificamos que las células nerviosas y musculares se encuentran dentro de las células somáticas que eliminan su núcleo durante el proceso final de diferenciación celular. Interesados en este llamativo proceso, en este trabajo combinamos la detección de marcadores moleculares por fluorescencia con análisis ultraestructurales para caracterizar el proceso de eliminación nuclear en el sistema neuromuscular de la oncosfera de *H. microstoma*. Reconstrucciones del sistema neuromuscular de embriones y larvas infectivas mediante *Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy* (SBF-SEM; realizado en colaboración con Eija Jokitalo e Ilya Belevich, de la Universidad de Helsinki), nos permitieron identificar 5 neuronas y cerca de 40 células musculares nucleadas durante el desarrollo embrionario, la mayoría de las cuales carecen de núcleo en la etapa de oncosfera infectiva.

La eliminación de núcleos somáticos es un fenómeno que ha sido previamente descrito en otros invertebrados miniaturizados con tiempos de vida cortos, como una forma de preservar espacio y recursos. Sin embargo, los mecanismos celulares y moleculares implicados aún no se conocen en detalle. En el caso particular del desarrollo larvario de *H. microstoma*, es posible detectar estructuras membranosas autofagosómicas rodeando herniaciones nucleares, así como observar compartimentos ácidos asociados a núcleos fragmentados *in vivo*. Estos resultados sugieren la participación de mecanismos macroautofágicos en la eliminación de núcleos somáticos de la oncósfera de nuestro cestodo modelo.

Evaluación del efecto antioxidante de nanomicelas en células tumorales de carcinoma oral

Benítez Verdier, M¹; Hochmann, J²; Olson, D¹; Ferreira, G¹; Arocena, M³.

¹Departamento de Biofísica, Facultad de Medicina, Udelar.²Departamento de Diagnóstico en Patología y Medicina Oral, Facultad de Odontología, UdelaR. ³Departamento de Biología Odontológica, Facultad de Odontología - UdelaR

Las nanomicelas son un tipo de nanopartículas con propiedades antioxidantes, que se especializan en prevenir la peroxidación de los lípidos presentes en las membranas, tanto plasmáticas como de organelos intracelulares. Este proceso incluye la sustitución de las membranas dañadas por nanomicelas fusogénicas, que se integran en las estructuras celulares.

Durante el cáncer, las células tumorales suelen sufrir un aumento del estrés oxidativo debido a las alteraciones metabólicas inherentes a su naturaleza patológica. Este estrés oxidativo contribuye al daño celular y, eventualmente, a la muerte celular. La exposición de estas células a compuestos que reduzcan la producción de radicales libres podría, en teoría, disminuir o incluso detener la apoptosis celular de manera diferencial, dependiendo de si el efecto es más pronunciado en las membranas o en el medio intracelular.

Para explorar estas hipótesis, se expusieron células de la línea CAL-27, un modelo de carcinoma escamoso de lengua humana, a distintas concentraciones de estos compuestos antioxidantes. Los estudios de viabilidad celular se llevaron a cabo utilizando el ensayo de azul tripán. Este ensayo reveló una mayor tasa de supervivencia en las muestras de control. Además, se cuantificaron los niveles de estrés oxidativo utilizando el kit CellRox, empleando un modelo de microambiente tumoral in vitro que genera condiciones de hipoxia y aumento de estrés oxidativo. Con el objetivo de estudiar cambios en la organización celular, se obtuvieron registros de las células utilizando microscopía de fase cuantitativa. Se observó una marcada disminución del estrés oxidativo mediante tratamiento con nanomicelas, simultáneamente al aumento de gotitas lipídicas citoplasmáticas. Estos resultados preliminares apuntan a efectos importantes de las nanomicelas que podrían contribuir a su eventual potencial terapéutico.

Ultrafast Doppler, Microscopía Confocal y abordajes comportamentales para estudiar alteraciones centrales en Charcot Marie Tooth

Mariana Martínez Barreiro, Lucia Vázquez Alberdi, Juan Pablo Damián, Jérôme Baranger, Mickael Tanter, Carlos Negreira, Javier Brum, Alejandra Kun.

La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT) es una de las enfermedades neurológicas hereditarias humanas más prevalentes, se caracteriza como una alteración del Sistema Nervioso Periférico (SNP). Los ratones Trembler-J (TrJ) sirven como modelo para esta condición. Recientes estudios en ratones TrJ dejaron ver alteraciones en el sistema nervioso central (CNS). En este estudio, adoptamos un enfoque integral para explorar el compromiso del SNC, incluyendo pruebas comportamentales y la evaluación de la fisiología y estructura del sistema vascular cerebral, utilizando Doppler ultrarrápido (uDoppler) para la evaluación in vivo del flujo sanguíneo cerebral, y microscopía confocal (CMicro) para la evaluación post-mortem del volumen vascular, de acuerdo a lo realizado en trabajos publicados por nuestro grupo (Damian, 2022).

En este estudio se utilizaron 24 ratones TrJ y WildType (Wt) de 3 meses de edad. Se llevaron a cabo pruebas de comportamiento, incluyendo el test de campo abierto y laberinto elevado en cruz, y se cuantificaron comportamientos indicativos de ansiedad. Para la obtención de imágenes uDoppler, se colocó en el plano coronal del cerebro una sonda lineal de 15 MHz y 128 elementos, controlada por un sistema Verasonics Vantage. Las imágenes resultantes se analizaron mediante un método de segmentación por cuartiles [Anzibar Sci.Rep. 2022]. Para CMicro, se extrajo el cerebro, se fijó y se cortó en rodajas. Las secciones de cerebro se incubaron con IB4. Los cortes se analizaron con CMicro (Zeiss 800) y la caracterización de la estructura vascular se realizó analizando cada imagen de CMicro para extraer y segmentar en cuartiles la distribución normalizada de la fracción de volumen de los vasos (VVF) utilizando el programa Image J.

Los resultados del uDoppler indicaron valores elevados en los cuartiles del hipocampo de los ratones TrJ (Fig. 1a). Los resultados de CMicro demostraron un aumento de la Fracción de Volumen Vascular (VVF) en los ratones TrJ para todos los cuartiles en el hipocampo y en los cuartiles 3 y 4 en la corteza (Fig. 1b). En la prueba de campo abierto, los ratones TrJ mostraron mayores conductas de freezing y grooming, mientras que los ratones Wt presentaron más conductas de rearing. En el laberinto elevado, los ratones Wt mostraron mayores entradas en brazos cerrados, entradas totales y rearing (Fig 1c). Estos hallazgos sugieren que los ratones TrJ muestran un comportamiento más ansioso que los Wt. Globalmente, estos hallazgos resaltan un compromiso central en la enfermedad CMT.

Estudio del efecto del vtRNA2-1/nc886 en la biología del cáncer de próstata mediado por factores extracelulares

Camilla Lucía Colantuono^{1,2}, Carolina Oliveira-Rizzo^{1,2}, Rafael Sebastián Fort^{2,3}, Germán Galliussi⁴, Marceo Hill^{4,5}, María Ana, Duhagon^{1,2}.

¹Departamento de Genética, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. ²Sección Genómica Funcional, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. ³Departamento de Genómica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay. ⁴Instituto Pasteur Montevideo, Uruguay. ⁵Unidad Académica de Inmunobiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

El cáncer de próstata (PrCa) es la neoplasia de mayor incidencia en hombres y la segunda en mortalidad a nivel mundial. Esta enfermedad todavía requiere de mejores marcadores pronósticos para la etapa temprana, así como predictores para la etapa avanzada, siendo los ARNs extracelulares objeto de intensa investigación para esta aplicación. Nuestro grupo investiga el papel de un ARN no codificante de tipo bóveda llamado vtRNA2-1/nc886 en el PrCa. Este ARN es supresor de tumor en el PrCa, aunque en otros tejidos es oncogénico. Si bien se sabe que la actividad reguladora de vtRNA2-1/nc886 requiere fundamentalmente de su interacción directa con proteínas (PKR, OAS1, Dicer, Snail, p62), sus mecanismos de acción no se encuentran bien definidos y probablemente varían entre los diferentes tejidos. Estudios de secuenciación de próxima generación revelaron la presencia de vtRNA2-1/nc886 en vesículas extracelulares. Además, los cambios transcriptómicos inducidos por vtRNA2-1/nc886 en líneas celulares de PrCa implican la modulación de la vía exosomal, y experimentos de pull down de ARN identificaron proteínas de esta vía. También sabemos que vtRNA2-1/nc886 modula la expresión de citocinas que participan en la respuesta inmunitaria innata. Debido a su asociación con la inmunidad innata y la vía exosomal, es posible que las moléculas efectoras de vtRNA2-1/nc886 en el PrCa no se limiten a operar en un contexto intracelular, sino que también se secreten en el medio extracelular.

Este trabajo busca determinar si vtRNA2-1/nc886 induce señales secretadas capaces de modificar el comportamiento celular en el PrCa, y también evaluar la presencia de vtRNA2-1/nc886 en el medio extracelular. Se generaron transfectantes estables de vtRNA2-1/nc886 y de vector vacío como control (ctrl) en la línea de PrCa LNCaP, y se confirmó el efecto antiproliferativo esperado. Posteriormente, se analizó la modulación de un panel de citocinas en los transfectantes vtRNA2-1/nc886+ en comparación con el ctrl mediante RT-qPCR. También se hizo un análisis preliminar sobre el efecto del secretoma modulado por vtRNA2-1/nc886 en la proliferación de células y en la maduración de células dendríticas. Nuestros resultados sugieren que el secretoma de vtRNA2-1/nc886+ estimula la maduración de células dendríticas. Por otro lado, se evaluó la localización de vtRNA2-1/nc886 en el compartimento extracelular en la línea celular prostática DU145 y los resultados sugieren que podría estar siendo secretado, posiblemente a través de exosomas.

Ensayos preliminares de ibogaína y análogos estructurales en corazones aislados de cobayo

Franco Bernech^{a*}, Agustín Demarco^{a*}, Milagros Benítez^a, Juan Manuel Mesa^b, Axel Santander^a, Aníbal Las^a, Bruno González^b, Ignacio Carrera^b, Inés Carrera^{c#} y Gonzalo Ferreira^{a#}

**Igual contribución al trabajo, # autores correspondientes.*

^aLaboratorio de Canales Iónicos, Membranas Biológicas y Señalización Celular. Unidad Académica de Biofísica. Facultad de Medicina; ^bLaboratorio de Síntesis Orgánica, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química; ^cÁrea Farmacología, Departamento de Ciencia Farmacéuticas, Facultad de Química; Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

El trastorno por uso de sustancias es un problema de salud en aumento a nivel mundial con un alto impacto social. La ibogaína es un alcaloide psicodélico originario del arbusto africano *Tabernanthe iboga* y otros miembros de la familia *Apocynaceae*. Presenta una promisoriosa actividad antiadictiva documentada en reportes observacionales y anecdóticos, pero lo que ha limitado de forma importante sus investigaciones clínicas son sus reacciones adversas a nivel cardíaco, dado que provoca un síndrome de QT largo adquirido por bloqueo de los canales de potasio hERG (Kv 11.1), que puede conducir a arritmias fatales. Debido a ello, se busca activamente obtener análogos de la ibogaína, que carezcan de dichos efectos, para lo que nuestro grupo generó una quimioteca de dichos fármacos con alta diversidad estructural. En este estudio, decidimos probar en corazones aislados de cobayo, los efectos de ibogaína y dos derivados de esta quimioteca, la noribogaína y el 18-MC. Las curvas dosis respuesta de la duración de potenciales de acción monofásicos, mostraron un aumento significativo de dicha duración con dosis micromolares crecientes de ibogaína, siendo resultados consistentes con un bloqueo de los canales hERG. Sin embargo, aparte de dichos efectos, encontramos pronunciados efectos inotrópico y cronotrópico negativos, de baja reversibilidad ante el lavado de dicho fármaco, que no pueden explicarse por el bloqueo de hERG. Los estudios realizados con noribogaína mostraron un menor efecto tanto en aumento de duración de potencial de acción, como en sus efectos ino y cronotrópico negativo, teniendo además mayor lavado en comparación con la ibogaína. El 18-MC en comparación, mostró diferencias significativas respecto a dichas curvas dosis-respuesta, teniendo un efecto bastante menor en estas variables. Estos resultados sugieren que la ibogaína aparte del bloqueo de hERG tiene otros blancos farmacológicos cardíacos, probablemente intracelulares, que afectan la liberación de calcio en los cardiomiocitos. Interesantemente, la noribogaína produce todos estos efectos en menor grado y menos aún el análogo 18-MC. Dadas las diferencias estructurales en estos compuestos, sugerimos que la presencia de las funciones metoxilo en el anillo indólico y la cadena etílica lateral del biciclo isoquinuclidínico, además del éster en posición 16, pueden modular de forma importante la actividad de análogos de ibogaína sobre blancos farmacológicos cardíacos en cobayo.

Receptores nucleares 2DBD de *Echinococcus granulosus*: localización subcelular e interacción proteica

Mozzo, Bruno; Blanco, Valentina*; Alvite, Gabriela

Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República; *Laboratorio de Genómica Funcional, Instituto Pasteur de Montevideo.

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 necesario identificar y estudiar nuevos blancos específicos del parásito, como podrían ser las proteínas Eg2DBDs. Estos receptores nucleares (NRs) pertenecen a la subfamilia 2DBD, cuyos miembros contienen dos dominios de unión al ADN (DBD) y se han encontrado solamente en algunos invertebrados. Debido a que los 2DBD-NRs no están presentes en los hospederos y que los NRs de helmintos parásitos son considerados posibles blancos de nuevas drogas antihelmínticas, nos proponemos dilucidar las funciones biológicas de los Eg2DBDs en protoesclólices (PE, estadio larvario) de *E. granulosus s.l.* Hemos identificado cuatro Eg2DBDs: Eg2DBD α , Eg2DBD α .1, Eg2DBD β y Eg2DBD γ ; siendo Eg2DBD α .1 probablemente una isoforma de Eg2DBD α . Hemos avanzado en la caracterización de Eg2DBD α .1, analizando la estructura, capacidad dimerización y de unión de ligandos; y además hemos descrito patrones diferenciales de expresión de Eg2DBD β y Eg2DBD α /Eg2DBD α .1 en PE. En este trabajo abordamos el estudio del mecanismo de acción de los Eg2DBDs mediante el análisis de la localización subcelular en PE de *E. granulosus s.l.* y de la capacidad de interacción proteica, utilizando ensayos de inmunohistofluorescencia *in toto* y de doble híbrido de levaduras (DHL), respectivamente. Hemos generado anticuerpos específicos contra Eg2DBD α /Eg2DBD α .1 y Eg2DBD β , dado que son los Eg2DBDs de mayor expresión en PE (relación Eg2DBD α /Eg2DBD α .1:121/1). Las inmunohistoquímicas muestran que Eg2DBD α /Eg2DBD α .1 se detectan en el núcleo y el citosol, mientras que Eg2DBD β se localiza principalmente en el citosol y la región perinuclear. Nuestros resultados indican que estas proteínas también presentan localizaciones diferenciales a nivel subcelular, sugiriendo diferencias en sus mecanismos de acción en células de PE. Además, mediante DHL, hemos evaluado la capacidad de Eg2DBD β de formar homodímeros y heterodímeros, y la posibilidad de interacción de Eg2DBD β y Eg2DBD α .1 con EgFABP1 que es la proteína de unión de ácidos grasos con mayor expresión en todos los estadios del parásito. Estos ensayos indican que Eg2DBD β interaccionaría débilmente con EgRXR β a y Eg2DBD α .1, mientras que solamente Eg2DBD α .1 se uniría a EgFABP1. Si bien estos resultados restan ser confirmados, nos sugieren que Eg2DBD β formaría heterodímeros, a diferencia de Eg2DBD α .1 que homodimeriza, y que EgFABP1 podría interaccionar con Eg2DBD α .1 posiblemente cediéndole el ligando para que regule la expresión génica de sus genes blanco.

Bases moleculares de las propiedades antiinflamatorias de cannabinoides.

Bruno Musseti¹, **Marcel Donzé**², Leonor Thomson²

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

La planta *Cannabis sativa* ha sido utilizada por la humanidad desde hace milenios, no sólo como fuente de fibras y aceites, sino también por sus propiedades medicinales. Los antiguos papiros de Ebers (1.500 a.C.) ya documentaban su uso en el tratamiento de la inflamación, mientras que en la antigua Mesopotamia existen registros que mencionan el empleo de cannabis para tratar la depresión. Con el avance de la ciencia, hemos profundizado en el entendimiento del Sistema Endocannabinoide (SE), un sistema biológico esencial que modula múltiples funciones en el organismo. Aunque existe una vasta evidencia sobre la interacción de los cannabinoides con los receptores CB₁ a nivel del sistema nervioso central, los efectos específicos a través de CB₂ en la inmunomodulación requieren mayor clarificación. Adicionalmente, existe una serie de receptores de cannabinoides no canónicos que se han visto implicados en la señalización inflamatoria y cuyas funciones en la inmunomodulación aún restan dilucidar. Resultados preliminares obtenidos en nuestro laboratorio soportan lo reportado por otros autores respecto a las propiedades antiinflamatorias de los fitocannabinoides. Algunos de estos resultados muestran una disminución en la expresión de una enzima clave en la respuesta inflamatoria, la óxido nítrico sintasa inducible (NOS₂), promovida por extractos de *Cannabis sativa* respecto al tratamiento con LPS/INF γ . Esta disminución en los niveles de la NOS₂ se acompaña de la concomitante reducción de los niveles de óxido nítrico. Además, a partir de la cuantificación de la pro-interleuquina 1 β (pro-IL1 β), se demostró que sus niveles disminuyen tras la incubación con los extractos respecto al tratamiento con LPS/INF γ . Esta citoquina es crucial en el montaje de la respuesta inflamatoria, por lo que su regulación por medio de los cannabinoides es un blanco de suma importancia. Por último, los extractos promovieron un aumento en la expresión de la hemo oxigenasa 1 (HO-1), enzima clave en el metabolismo del hierro cuyos productos se asocian a la resolución de la inflamación. Estos resultados fueron obtenidos en macrófagos murinos de la línea 774.1, por lo que nos proponemos extenderlos a la línea de macrófagos humanos THP-1. Adicionalmente, estamos desarrollando un proyecto en el que se pretenden dilucidar los mecanismos moleculares que subyacen los efectos antiinflamatorios previamente mencionados.

Búsqueda de los interactores moleculares de las proteínas Tax y proteasa del virus de la leucemia bovina como potenciales blancos farmacológicos

Yrupé Arhancet¹, Camila Sagasti¹, Mariana Salinas¹, Magdalena Portela², Florencia Rammauro^{1,3}, Federico Carrión¹, Martín Fló^{1,3}, Natalia Olivero¹

¹Laboratorio de Inmunovirología “Prof. Dr. Otto Pritsch”, Institut Pasteur de Montevideo. ²Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas, Institut Pasteur de Montevideo. ³Unidad Académica Inmunobiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República.

El virus de la leucemia bovina (VLB) es un deltaretrovirus oncogénico que infecta linfocitos B del ganado bovino en todo el mundo y es el agente causante de la Leucosis bovina enzoótica (LBE). La LBE provoca alteraciones en el sistema inmunológico de los animales infectados impactando negativamente en su salud y por tanto en la producción, afectando la economía del sector lácteo. La LBE es una problemática a nivel mundial la cual es difícil de atender dado que, hasta la fecha, no se han aprobado ni vacunas ni tratamientos para esta enfermedad.

Dos proteínas de VLB relevantes para su éxito replicativo son la proteasa (PR) y Tax. La PR es responsable de la maduración de la partícula viral al procesar la poliproteína estructural viral denominada Gag. En consecuencia, se genera un cambio estructural que determina la adquisición de la capacidad infectiva de la partícula viral. Además, se ha observado que, en otros retrovirus, e.g. VIH, presenta blancos celulares que le permiten modular varios procesos biológicos, favoreciendo así el éxito del virus. La proteína Tax es responsable de la activación transcripcional necesaria para la replicación viral, es clave en el proceso oncogénico y tiene un importante rol en la transmisión del virus célula-célula.

El objetivo de este trabajo es identificar posibles proteínas intracelulares que interaccionen con las proteínas virales PR y Tax.

Se expresaron ambas proteínas unidas a un doble Strep Tag en la línea celular CC81LTRVLBGFP, susceptible y permisiva a la infección por el VLB. Mediante un abordaje proteómico, basado en ensayos de pulldown seguido de análisis por espectrometría de masa, se identificaron 15 potenciales interactores de la PR-VLB. Mediante herramientas bioinformáticas, determinamos que los interactores identificados para PR forman parte de distintas clases de proteínas, tales como proteínas del citoesqueleto (5), chaperonas (3), proteínas adaptadoras (2), enzima de interconversión metabólica (1), proteína de traducción (1), proteína de unión a calcio (1), proteína del metabolismo de ARN (1).

El conocimiento obtenido sobre el interactoma celular de Tax y PR es relevante para entender mejor el rol de estas proteínas en el contexto celular, información que puede ser relevante para el desarrollo de estrategias terapéuticas, al identificar posibles blancos celulares clave en la replicación y transmisión del VLB. Este trabajo busca contribuir a la generación de tratamientos más seguros y efectivos contra la LBE, ofreciendo una esperanza para la mejora en la salud del ganado y la economía del sector lácteo.

Exploración del papel de Mxra8 y Zap en la replicación del virus mayaro

Hurtado, Joaquin^{1,2}; Gandioli, Juan^{1,2}; Paz, Mercedes^{1,2}; Palacios, Florencia³; Moratorio, Gonzalo^{1,2}; Moreno, Pilar^{1,2}.

¹Laboratorio de Virología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. ²Laboratorio de Evolución Experimental de Virus, Institut Pasteur de Montevideo. ³Laboratorio de Investigación en Leucemia Linfóide Crónica, Institut Pasteur de Montevideo

Los virus oncolíticos han surgido como una estrategia prometedora en el tratamiento del cáncer, aprovechando su capacidad intrínseca para infectar y replicarse selectivamente en células tumorales. Estos virus no solo inducen la lisis directa de las células tumorales, sino también pueden reactivar la respuesta inmune del organismo contra el tumor. El virus Mayaro es un *alfavirus* de ARN de cadena simple de la familia *Togaviridae*. Previamente hemos observado que este virus presenta efecto citopático y cinéticas de replicación diferentes entre varios tipos celulares de cáncer de pulmón y de páncreas. En este trabajo, buscamos entender el rol de factores del hospedero, como son la expresión del receptor de membrana celular (MXRA8) y la expresión de ZAP, un gen estimulado por interferón (ISG), en presencia del virus. Con respecto al estudio del receptor, se cuantificó la cantidad de MXRA8 en varios tipos celulares mediante las técnicas de Western blot y citometría de flujo. A fin de evaluar si las diferencias en la expresión del receptor celular eran responsables de las diferencias observadas en los efectos citopáticos en las diferentes líneas celulares luego de la infección, realizamos un ensayo de transfección a modo de promover la replicación viral, evadiendo al receptor celular y se cuantificaron los títulos virales producidos. Respecto al estudio de la proteína viral de dedos de zinc, ZAP, se evaluó la expresión de la misma en función del tiempo post infección mediante western blot. Nuestros resultados sugieren que el receptor no es un factor determinante en la replicación viral observada en las diferentes líneas y que la proteína ZAP, tiene un efecto regulador negativo en la replicación viral.

Estudio de la glucólisis en la cilia primaria en *Caenorhabditis elegans*

Victoria Núñez Barón, Gustavo Salinas, Laura Romanelli

Laboratorio de Biología de Gusanos, Unidad Mixta - Instituto Pasteur de Montevideo y Facultad de Química, UDELAR.

La producción de ATP está mediada principalmente por la glucólisis y la fosforilación oxidativa, siendo esta última la vía de mayor rendimiento energético. No obstante, en tejidos con altos niveles de consumo energético y rápidas fluctuaciones en su demanda se da el efecto Warburg, en el que se usa preferencialmente la glucólisis incluso en presencia de oxígeno. Por ejemplo, en el sistema nervioso para abastecer la demanda energética de la sinapsis, además del enriquecimiento de mitocondrias en la sinapsis, se ha reportado la formación de un “metabolón glucolítico”, una estructura transitoria formada por la agrupación de las enzimas glucolíticas acelerando así la vía.

La cilia primaria, organelo que protruye de la superficie celular, es esencial en la comunicación celular con el entorno. La ciliogénesis, su mantenimiento, y sus funciones sensoriales requieren de alta energía. Se ha descrito que el ATP que abastece a la cilia proviene de mitocondrias ubicadas en su base. No obstante, análogamente a lo que sucede en el axón de neuronas motoras de *C. elegans*, donde la glucólisis aeróbica es la fuente de energía en condiciones de alto requerimiento, nos preguntamos si la difusión del ATP desde la base de la cilia hasta el extremo apical cubre todos los requerimientos energéticos del organelo.

Este trabajo forma parte de un proyecto que plantea estudiar si hay glucólisis en la cilia primaria y en caso afirmativo, si se forma un metabolón glucolítico constitutivo o inducido en determinadas condiciones.

Específicamente, se plantea i) estudiar fenotipos morfológicos de un conjunto de neuronas ciliadas en gusanos mutantes en el gen que codifica para la enzima fosfofructoquinasa (pfk-1.1), utilizando el compuesto Dil y ii) determinar la localización subcelular de la enzima PFK-1.1. Los resultados indican que no hay fenotipos anormales en la incorporación del Dil, esto sugiere que la estructura de la cilia no se ve afectada en ausencia de dicha enzima funcional. Por otra parte, se observó una disminución en el éxito reproductivo de la estirpe mutante en relación a la salvaje.

Por otro lado, se generaron organismos transgénicos que expresan la PFK-1.1 fusionada al reportero mScarlet bajo un promotor de neuronas ciliadas (tsp-6). Actualmente, nos encontramos realizando el cruce de dicha estirpe con otra estirpe transgénica que expresa el gen *bbs-7* (específico de cilia) fusionado a GFP. De esta manera, evaluaremos la posible colocalización mediante microscopía confocal.

Evaluación de la función oncogénica de vtRNA1-2 en cáncer de próstata

F. Victorica¹, C. Ladra², E. Coitiño¹, L. Colantuono^{1,3}, R.S. Fort^{1,2}, M.A. Duhagón^{1,3}.

¹Sección genómica funcional. Facultad de Ciencias - UdelaR; ²Departamento de Genómica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo 11600; ³Departamento de Genética, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo 11800, Uruguay. #primera autoría compartida

Los vault ARNs (vtRNAs) son una clase de ARNs no codificantes de tamaño medio (84-141 nt) transcritos por la ARN polimerasa III. Estos vtRNAs se asocian con las partículas vault, formando un complejo ribonucleoproteico con estructura de barril. Se estima que entre el 5-20% de los vtRNAs están asociados con la partícula vault, mientras que el 80-95% restante se encuentra en forma soluble en el citoplasma, lo que plantea interrogantes sobre sus posibles funciones independientes. En humanos, existen cuatro vtRNAs: vtRNA1-1, vtRNA1-2 y vtRNA1-3 agrupados en un *locus* y vtRNA2-1, que se localiza en un locus diferente del mismo cromosoma.

VtRNA1-2 es el vtRNA menos estudiado, y nuestros estudios sugieren que podría ser oncogénico en la mayoría de los tejidos. Previamente observamos una correlación significativa entre la accesibilidad de la cromatina y la metilación del promotor de vtRNA1-2 en tejidos normales y tumorales, sugiriendo una mayor expresión en tejidos cancerosos. Además, una baja metilación del promotor de vtRNA1-2, en combinación con vtRNA1-1 y vtRNA2-1, está asociada con una menor probabilidad de sobrevida en pacientes con cáncer.

Este trabajo evalúa el efecto de vtRNA1-2 en la biología tumoral en el contexto del cáncer de próstata. Encontramos una correlación negativa entre la metilación del promotor de vtRNA1-2 y peores parámetros clínicos de la enfermedad. Asimismo, analizamos su asociación con vías y procesos celulares vinculados con ciclo celular y replicación del ADN mediante el estudio de su correlación con todos los ARNm y posterior análisis de *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA). Los resultados obtenidos refuerzan la hipótesis de que vtRNA1-2 podría tener un papel oncogénico.

Con el objetivo de determinar la contribución de vtRNA1-2 al fenotipo proliferativo y la viabilidad celular se realizó el silenciamiento transitorio de vtRNA1-2 utilizando oligonucleótidos antisentido (ASOs) en dos líneas celulares de próstata: LNCaP, y PC3, que modelan dos estadios de la enfermedad, la sensibilidad y la insensibilidad a andrógenos respectivamente. Mediante ensayos de MTT observamos una disminución de la viabilidad celular asociada al silenciamiento de vtRNA1-2. Por otra parte, se está realizando, un silenciamiento permanente (*knockout*) de vtRNA1-2 implementando el sistema de edición Crispr/Cas9. Esta metodología complementa la estrategia anterior de silenciamiento transitorio y permitirá evaluar el rol de vtRNA1-2 realizando otros ensayos fenotípicos.

Determinación de la función e impacto de svtRNA2-1-5p en la biología del cáncer de próstata

Evangelina Coitiño¹, José Sotelo Silveira^{2,3}, María Ana Duhagon^{1,4}, Rafael Fort^{1,2}.

¹Sección Genómica Funcional. Facultad de Ciencias - Udelar; ²Departamento de Genómica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable - MEC. ³Departamento de Biología Celular. Facultad de Ciencias - Udelar; ⁴Departamento de Genética, Facultad de Medicina, Udelar.

En los últimos años, se ha investigado la relevancia de las porciones del genoma no codificante de proteínas tanto en el funcionamiento normal del organismo como en su implicación en el desarrollo de enfermedades como el cáncer. El cáncer de próstata es el más frecuente en hombres y el segundo en mortalidad a nivel mundial. Se ha encontrado evidencia de variaciones en varios ARN no codificantes pequeños (sncRNAs) en muestras de plasma y suero de pacientes con cáncer, lo que sugiere el potencial de utilizar los sncRNAs como biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico del cáncer. Los vaultRNAs (vtRNAs) son ARN no codificantes de tamaño medio transcritos por la polimerasa III. Se han identificado cuatro vtRNAs humanos, de los cuales tres forman parte de la partícula vault (vtRNA1-1/2/3), la ribonucleoproteína más grande descrita en la célula eucariota, ubicada en el cromosoma 5q31.3. Por su parte, el vtRNA2-1 es un homólogo que se encuentra más distante del clúster.

Solo el 5% de los vtRNAs se unen a la partícula vault, mientras que la función del resto no unido se conoce poco. Nuestros antecedentes muestran que la expresión de vtRNA2-1 disminuye durante la progresión en cáncer de próstata y que actúa fenotípicamente como supresor tumoral. El vtRNA2-1 es procesado por DICER generando dos fragmentos: svtRNA2-1-3p y svtRNA2-1-5p, derivados del extremo 3' y 5' respectivamente. Analizando datos de secuenciación de pequeños ARNs no codificantes de tejido de próstata evidenciamos que la expresión del fragmento svtRNA2-1-5p se ve aumentada en el cáncer de próstata y se asocia con peores parámetros clínicos de la enfermedad. Si bien existen algunos reportes en la literatura que postulan al fragmento svtRNA2-1-5p como oncogén, no hay información sobre su rol funcional en el cáncer de próstata. Por esta razón, es importante continuar avanzando en su estudio y caracterización biológica. Este trabajo cuantifica la expresión de vtRNA2-1-5p mediante qRT-PCR en líneas celulares modelo de cáncer de próstata y evalúa el efecto funcional de la modulación de vtRNA2-1-5p en el fenotipo proliferativo y apoptótico en células de próstata mediante ensayos de viabilidad celular, y ensayos de apoptosis.

Hydrolytic activity of microbiota on gliadin using *Caenorhabditis elegans* as an animal model

Patarroyo Sánchez H¹, Poveda Espinosa E², Chaib De Mares M³

¹Departamento de Química (Facultad de Ciencias, UNAL), ²Departamento de Nutrición (Facultad de Medicina, UNAL), ³Departamento de Biología (Facultad de Ciencias, UNAL).
hpatarroyos@unal.edu.co

Enzymatic therapy is one of the promising treatments for diseases related to gluten consumption, utilizing proteins from various sources such as plants, animals, and bacteria. Lactic acid bacteria (LAB), widely used in the fermented dairy industry as probiotics to restore intestinal microbiota, have shown potential for gluten degradation resulting in the production of food products suitable for individuals intolerant, allergic, or sensitive to gluten. This study identifies the hydrolytic activity of bacteria from different sources on wheat gliadin using *Caenorhabditis elegans* as an animal model. A homology search revealed multiple genes encoding gliadin-degrading enzymes in the microbiota of both *C. elegans* and humans. Bioinformatic analyses highlighted homologous regions between the microbial communities of both hosts, with several identified sequences coding for serine- and metallo-peptidases with endo- and exopeptidase activity. These include enzymes such as glutamyl-endopeptidase, prolyl-endopeptidase, oligopeptidase B, aminopeptidase N, subtilisin, aminopeptidase G, aminopeptidase P, dipeptidyl-peptidase, and prolidase, all of which show potential for gliadin hydrolysis to varying extents. The findings suggest that, like in the human microbiota, the *C. elegans*-associated microbiota may play a significant role in gluten degradation, as well as in host protection against toxins and pathogens. We are currently conducting co-cultivation assays with promising bacteria, evaluating the physiological impact of their enzyme activity on the host, particularly on the integrity of intestinal epithelium cells and oxidative stress. This biological model and the results so far provide a foundation for further research into the pathophysiological effects of gliadin, not only at the intestinal level but also in the broader development of the nematode.

Desarrollo de un agente senoterapéutico que aborda al fenotipo secretor asociado a senescencia

Eliana Chacón¹, Jennyfer Martínez¹, Mariana Ingold^{2,3}, Mariana Didoménico⁴, Williams Porcal^{2,3}, Virginia López^{2,3}, Carlos Batthyány³, Carlos Escande⁵, Celia Quijano^{1*}

¹Departamento de Bioquímica y Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Facultad de Medicina, UdelaR, Uruguay, ²Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, UdelaR, Uruguay, ³Laboratorio de Biología Vasculare y Desarrollo de Fármacos, Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay. ⁴Unidad de Microscopía Confocal y Epifluorescencia (UMCE), Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. ⁵Laboratorio de Enfermedades Metabólicas y Envejecimiento, Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay.

Las células senescentes muestran un fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP, por sus siglas en inglés) distintivo, que puede desempeñar un papel importante en la patogenia de varias enfermedades asociadas al envejecimiento, incluido el cáncer. Por lo tanto, la senescencia se ha convertido en un objetivo atractivo para el descubrimiento y desarrollo de agentes terapéuticos conocidos como senoterapéuticos.

Dado que NF- κ B regula el secretoma proinflamatorio y los oxidantes son necesarios para el mantenimiento del fenotipo senescente, en este trabajo investigamos el potencial de un compuesto sintético (IP2), formado al unir un residuo redox a un inhibidor de NF- κ B (NI), como agente senoterapéutico. Caracterizamos el compuesto mediante técnicas espectrofotométricas y evaluamos su potencial senoterapéutico en la senescencia inducida por oncogenes mediante la expresión ectópica del H-RAS (G12V) en fibroblastos humanos y en la senescencia inducida por terapia en células de melanoma de ratón expuestas a temozolomida.

El IP2 no afectó la viabilidad celular de las células senescentes ni de las células control en un rango amplio de concentraciones (1-600 μ M, IC₅₀IP2 = 314 μ M); ni tampoco la actividad de la β -galactosidasa asociada a la senescencia. Sin embargo, IP2 (100 μ M) inhibió en un 50% la secreción de interleuquina 6 (IL-6), uno de los principales componentes del SASP. Los controles con la molécula precursora NI también inhibieron la secreción de IL-6, lo que indica que la porción redox puede no jugar un papel en este proceso. Además, se observó una reducción similar en la expresión de IL-6 y de otras interleuquinas medidas mediante RT-qPCR. Analizamos entonces la translocación nuclear de NF- κ B. Se observó un aumento significativo de NF- κ B en el núcleo de las células senescentes con respecto a las células control, pero la exposición a IP2 no redujo los niveles nucleares de NF- κ B, lo que sugiere que el compuesto puede alterar la capacidad de unión al ADN del factor de transcripción. Estos resultados sugieren que IP2 y su precursor NI son moléculas senomórficas capaces de inhibir la actividad transcripcional de NF- κ B. No obstante, se necesitan más estudios para determinar el mecanismo de acción de los compuestos, su impacto en otros componentes del SASP, y su potencial como senoterapéuticos in vivo.

Estructura y Dinámica de la MsrB1 humana: impacto de la formación del complejo enzima-sustrato

Andresa Messias^{1,2}, Santiago Sastre³, Darío Estrin^{1,2}, Ari Zeida³

¹Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física; ²CONICET-Universidad de Buenos Aires, Instituto de Química Física de los Materiales, Medio Ambiente y Energía (INQUIMAE); ³Departamento de Bioquímica and Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

La metionina sulfóxido reductasa B1 (MsrB1) es una enzima dependiente de selenocisteína, que desempeña un papel clave en la reparación de metionina oxidada en proteínas, protegiendo a las células del daño oxidativo.[1] A diferencia de otras Msr, la MsrB1 es específica para el enantiómero R del sulfóxido de metionina (MetSO), lo que demuestra su importancia en la regulación selectiva de este aminoácido oxidado. El mecanismo catalítico de la MsrB1 humana (HsMsrB1) aún no está completamente elucidado. Sin embargo, se sabe que ciertos residuos clave en el sitio activo desempeñan un papel crucial en la reacción, incluyendo la triada catalítica, compuesta por la selenocisteína (Sec95), histidina (His80) y ácido aspártico (Asp83). Estas interacciones son esenciales tanto para la estabilización del sustrato como para los pasos subsiguientes de la catálisis.[2]

En este estudio, investigamos los cambios estructurales y dinámicos inducidos por la unión de MetSO al sitio activo de la HsMsrB1 (PDBid: 3MAO). Para ello, realizamos simulaciones de dinámica molecular (MD) utilizando el software AMBER20,[3] con un tripéptido modelo (Ala-Met-Ala) que contiene una metionina S-sulfóxido, considerando diferentes estados de ionización para la His80. El campo de fuerza utilizado para la proteína fue el ff14SB, excepto para el residuo de selenocisteína, para el cual desarrollamos nuevos parámetros de Lennard-Jones para mejorar la descripción de las propiedades de solvatación de dichos residuos.[4]

Nuestros resultados muestran que la His80 se encontraría protonada a pH fisiológico, lo que es crucial para el siguiente paso catalítico: la transferencia de protones necesaria para la reducción de MetSO y la formación de un intermediario reactivo. Además, observamos que la red de enlaces de hidrógeno en el sitio activo es dinámica y se reorganiza en presencia del sustrato. También identificamos que algunas moléculas de agua ubicadas en la proximidad del sitio activo podrían actuar como donadores de protones, contribuyendo al mecanismo catalítico. Estas moléculas de agua parecen estabilizarse mediante interacciones con una lisina cercana. La redistribución de moléculas de solvente alrededor del sustrato y los residuos catalíticos puede modificar la interacción entre los residuos de la triada, promoviendo un entorno favorable para la reducción del MetSO. En suma, estos resultados sientan las bases para un futuro estudio detallado del mecanismo catalítico de esta importante enzima de reparación redox.

Biochemistry, kinetics and expression pattern of Ohr enzyme from the model organism *Physcomitrella patens*

Rebeca Bandeira Candia¹, Naiara Almeida de Toledo², Vania Gabriela Sedano Partida¹, Diogo de Abreu Meireles³, Marie Anne Van Sluys², Luis Eduardo Soares Netto¹

¹Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil. ²Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil. ³Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Ohr proteins are thiol-dependent peroxidases, which possess two highly conserved cysteine residues and remarkable ability to detoxify organic peroxides more efficiently than hydrogen peroxide. Since their initial characterization in *Xanthomonas campestris*, Ohr enzymes were considered to be exclusive to prokaryotes and were recognized for their role in defending cells against exposure to *tert*-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide. However, a pioneering study by our group in 2017 (doi: 10.1016/j.redox.2017.03.026) revealed the existence of hundreds of Ohr homologues in eukaryotes, most of them in fungi, reshaping the previous notion that Ohr enzymes were restricted to eubacteria domain of life. In that same work, we identified the first occurrence of Ohr in a plant, specifically in the model moss *Physcomitrella patens*, through bioinformatics analysis. *P. patens* is a valuable model organism due to its simple, haploid dominant life-cycle, and its fully sequenced genome, which facilitates the study of the *ohr* homologue. In this work, we propose to characterize the expression pattern of the *ohr* gene and conduct kinetic analyses of the recombinant protein. Until now, our analysis of the publicly available transcriptome data indicates that *ohr* is expressed exclusively in the antheridia, the male reproductive organs of *P. patens*. We have successfully induced antheridia production in *P. patens* and preliminary data detected *ohr* expression by qPCR, confirming our *in silico* analysis. Additionally, kinetic analysis applying the well-established lipoamide-lipoamide dehydrogenase coupled assay suggests that *P. patens* Ohr reduced *tert*-butyl hydroperoxide (TBHP) via a ping-pong mechanism, similarly to its bacterial counterparts. Moving forward, we aim to elucidate the crystal structure of Ohr from *P. patens*. Through this study, we hope to gain deeper insights into functional aspects of eukaryotic Ohr, taking full advantage of *P. patens* as a model organism.

This work was financially supported by FAPESP (CEPID redoxome 2013/07937-8)

Transulfuración de proteínas por la mercaptopiruvato azufretransferasa de *Leishmania major*

J.J. Ríos^{1,2}; D. Benchoam^{1,3}; R. Faccio⁴; M. Comini^{3,5}; B. Alvarez^{1,3}; M. Bonilla^{3,5}; E. Cuevasanta^{1,2,3}

¹Laboratorio de Enzimología, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias - UdelaR;

²Laboratorio de Físicoquímica Biológica, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias - UdelaR; ³Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), UdelaR; ⁴Departamento de Experimentación y Teoría de la Estructura de la Materia y sus Aplicaciones (DETEMA), Facultad de Química - UdelaR; ⁵Laboratorio de Biología Redox de Tripanosomátidos, Institut Pasteur de Montevideo

La enzima mercaptopiruvato azufretransferasa (MST) participa en el catabolismo de la cisteína y ha ganado relevancia por su papel en la generación de persulfuros (RSSH/RSS⁻) y sulfuro de hidrógeno (H₂S), moléculas de importancia en procesos como la transducción de señales y defensa frente a oxidantes. Esta enzima utiliza 3-mercaptopiruvato (3MP) como sustrato, el cual es producido endógenamente mediante transaminación de la cisteína. El azufre del 3MP es aceptado por una cisteína en el sitio activo de la MST, generando un persulfuro que luego se transfiere a diversos aceptores. Según varios investigadores, este azufre es capaz de ser transferido directamente a otras proteínas para formar persulfuros en ciertas cisteínas blanco. En este trabajo buscamos caracterizar el mecanismo de persulfuración de la MST, tomando como modelo a la de *Leishmania major* (*LmMST*). Se purificó la enzima a partir de un sistema recombinante en *E. coli* para realizar ensayos *in vitro*. Se confirmó la actividad utilizando 3MP como dador de azufre y cianuro como aceptor. Se evaluó la habilidad de la *LmMST* de transferir los azufres a la proteína roGFP2, aprovechando los cambios de absorbancia y fluorescencia que sufre la roGFP2 al oxidarse. Si bien esta oxidación depende de la concentración de 3MP y de la *LmMST*, se observó una baja eficiencia (24 %) de transferencia del persulfuro de la *LmMST* a la roGFP2. Además, se detectó un retardo en los primeros minutos de la reacción de oxidación de roGFP2, que desapareció al preincubar la *LmMST* con 3MP antes de agregar roGFP2, sugiriendo una etapa de formación de un intermediario. Utilizando HPLC y sondas fluorescentes, se observó que el 3MP es consumido al ser incubado con *LmMST* en ausencia de segundos sustratos, lo cual sugiere que el 3MP está funcionando como dador y aceptor de azufres. Cambios en la turbidez de las soluciones, espectrofotometría de absorbancia en el UV-Vis y espectroscopía Raman de muestras de *LmMST* con 3MP indicaron la formación de polisulfuros. Las particularidades cinéticas nos han motivado a explorar con mayor detalle el mecanismo y las especies oxidantes de bajo peso molecular involucradas. Nuestros datos sugieren que las especies polisulfuradas de bajo peso molecular podrían contribuir a la formación de persulfuros en las proteínas. Estos resultados contribuyen a comprender el rol fisiológico de esta enzima y los mecanismos de persulfuración.

Evaluación de diferentes metodologías para caracterización estructural y termodinámica del rol de disulfuros en proteínas

Santiago Sastre^{1,2}, Rafael Radi¹, Leandro Martinez³ y Ari Zeida¹

¹Departamento de Bioquímica and Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Facultad de Medicina, Universidad de la República, ²Unidad Académica de Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, ³Institute of Chemistry, University of Campinas, Campinas, SP and Brazil Center for Computational Engineering & Science, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil. corresponding author: azeida@fmed.edu.uy

Los enlaces disulfuro son cruciales para la función de las proteínas, ya que pueden cumplir un rol puramente estructural y/o funcional, entre los cuales se encuentran los enlaces disulfuro catalíticos o alostéricos. Su formación/reducción es un proceso bien conocido que participa en el ciclo catalítico de varias enzimas redox que desempeñan roles catalíticos y/o regulatorios. Estructuralmente, el proceso implica cambios conformacionales y dinámicos de corto o largo alcance, con una variedad de consecuencias para la estabilidad y función de las proteínas.

Con el objetivo de caracterizar dichos procesos en términos de estructura, dinámica y propiedades termodinámicas, en este trabajo evaluamos varias técnicas avanzadas de muestreo de simulación computacional, tales como: dinámica molecular acelerada (aMD), conjunto ponderado (WE) y dinámica molecular basada en modelos estructurales (SBM-MD), con el fin de caracterizar completamente los cambios en el paisaje energético de proteínas con disulfuros lábiles conocidos. Los resultados sugieren que la combinación de estas metodologías puede aplicarse para comprender completamente estos procesos redox y establecer un flujo de trabajo para predecir el impacto de la formación/reducción de disulfuros en proteínas donde estos desempeñan roles importantes.

Estudios conformacionales de un antígeno O-específico de *E. coli* (SC-UY1) aislado de necropsia de ganglio mesentérico de diarrea en terneros

Sylvia Cuchman^{1,2*}, Edgardo Giannechini³, Rodolfo Rivero³, Ileana Corvo⁴, Carolina Fontana¹.

¹Laboratorio de Espectroscopía y Físicoquímica Orgánica, DQL, CENUR LN, UdelaR, Paysandú, Uruguay. ²Programa de Posgrados de la Facultad de Química, UdelaR, Montevideo, Uruguay. ³División Laboratorios Veterinarios "Miguel C. Rubino", Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Paysandú, Uruguay. ⁴Laboratorio de I+D Moléculas Bioactivas, DCB, CENUR LN, UdelaR, Paysandú, Uruguay. *scuchman@fq.edu.uy

Los lipopolisacáridos (LPS) se localizan en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. La reactividad serológica del antígeno O-específico (O-Ag), que corresponde a la región más externa del LPS, se emplea para identificar los 182 serogrupos de *E. coli* reconocidos en la actualidad [1]. Aunque la mayoría de las cepas de *E. coli* son inofensivas, algunas pueden causar enfermedades patogénicas como la diarrea fulminante en terneros, lo que conlleva a pérdidas económicas significativas y una disminución en la productividad del ganado en nuestro país. Las cepas resistentes a antibióticos están evolucionando rápidamente, convirtiéndose en un problema sanitario urgente; en este aspecto, el desarrollo de vacunas contra serogrupos recurrentes podría ser una estrategia alternativa útil para abordar esta problemática.

La cepa SC-UY1 de *E. coli*, aislada de una necropsia de ganglio mesentérico de diarrea en terneros, presenta un O-Ag nuevo que no se corresponde con ningún serogrupo previamente reportado en *E. coli* ni en otras especies [2]. Esta cepa se cultivó en medio LB, y el LPS se extrajo mediante el método de fenol/agua caliente. El polisacárido nativo libre de lípido A (O-PS) se obtuvo tratando el LPS en condiciones ácidas suaves y se purificó mediante cromatografía de exclusión por tamaño. El polisacárido O-desacetilado libre de lípido A (PS-OH) se obtuvo hidrolizando los grupos éster del O-PS en un medio básico.

Este PS-OH es de interés para la formulación de vacunas polisacarídicas conjugadas, ya que su extremo reductor libre podría acoplarse a estructuras transportadoras como proteínas o nanopartículas. Analizar el comportamiento conformacional de estos PS-OH es crucial para identificar los epítopes expuestos en la superficie de las estructuras conjugadas y evaluar posibles diferencias con respecto al polisacárido nativo. Para ello, se realizaron simulaciones de dinámica molecular (DM) empleando un modelo de este PS-OH representado por tres unidades biológicas repetitivas. Las estructuras iniciales se generaron en la plataforma CHARMM-GUI, y las simulaciones se ejecutaron utilizando cajas de agua cúbicas de 10 Å adicionales alrededor del polisacárido, con el modelo de agua TIP3, el campo de fuerza CHARMM36 y el software GROMACS. También se obtuvieron espectros ¹H,¹H-NOESY 2D del PS-OH con diferentes tiempos de mezcla empleando un espectrómetro Bruker Avance III de 500 MHz, y se elaboraron curvas de crecimiento de NOE para estimar las distancias protón-protón inter-residuales. En este trabajo se presenta el análisis de las preferencias conformacionales del PS-OH de SC-UY1 de *E. coli* utilizando espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear y simulaciones de DM.

Evaluación de las propiedades antivirales e inmunomoduladoras de péptidos sintéticos derivados de la proteína signal-regulatory protein alpha (SIRPA)

María Paz García

Universidad Ort Uruguay, Institut Pasteur de Montevideo

La glicoproteína SIRPA es un receptor transmembrana comprendido por un ectodominio con tres dominios del tipo Ig, una región transmembrana y un dominio citoplasmático con dos motivos ITIM (inmunoreceptores inhibitorios basados en tirosina) que contienen 2 residuos de tirosina cada uno. La fosforilación de tirosina de ambos ITIMs media el reclutamiento y la activación de las fosfatasas de tirosina SHP-1 y SHP-2, que defosforilan distintos sustratos ejerciendo un efecto inhibitorio en vías de señalización intracelulares. La función mejor caracterizada de SIRPA es su rol inhibitorio en la fagocitosis mediada por actina filamentosa. Nuestro grupo demostró que, similar a su rol en la fagocitosis, SIRPA restringe la internalización de virus envueltos que explotan vías endocíticas para ingresar a las células. Además, la actividad de SIRPA también se asocia a la regulación de las vías de señalización MAPK y NF- κ B, inhibiendo la respuesta inflamatoria de macrófagos y granulocitos.

En este trabajo analizamos la actividad antiviral de SIRPA frente a virus de importancia para la salud pública pertenecientes a las familias Flaviviridae y Arenaviridae y su posible rol en la señalización inmune frente a estas infecciones. Con este fin, examinamos niveles de infección y la respuesta inmune innata en la línea celular humana A549 y en macrófagos primarios de ratón utilizando a los virus Zika y Dengue y el virus Junín como modelos de flavivirus y arenavirus, respectivamente, y moléculas agonistas sintéticas de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) en células SIRPA knockdown. Mediante esta estrategia, establecimos que SIRPA es un factor antiviral contra los flavivirus ZIKV, DENV y JUNV-C1, pero su contribución a la regulación de la respuesta innata difiere según la vía de señalización inmune activada.

Debido a la actividad preponderante de SIRPA en el contexto de infección viral, también diseñamos y sintetizamos péptidos miméticos representativos de su dominio citoplasmático, para evaluar su potencial antiviral e inmunomodulatorio. Esta es una estrategia terapéutica con gran potencial, debido al fácil diseño y síntesis de los péptidos, bajos costos de producción y especificidad de acción. En este trabajo, evaluamos un péptido representativo del ITIM-1 de SIRPA, demostrando que aquellas células tratadas con este péptido mostraron niveles de infección viral menores que células control, aunque su actividad no regula la señalización inmune durante la infección. Este trabajo aporta información novedosa acerca de la biología de SIRPA en el contexto de infección viral, así como su potencial utilidad en el desarrollo de biofármacos antivirales.

Caracterización fisicoquímica preliminar de las peroxirredoxinas citosólica y mitocondrial de *Trypanosoma cruzi*

Tamara Salvador^{1,2}, Diego Arias³, Carlos Robello^{1,2}, Adriana Parodi-Talice^{1,4}, María Dolores Piñeyro^{1,2}

¹Laboratorio de Interacciones Hospedero-Patógeno. Unidad de Biología Molecular, Institut Pasteur Montevideo, Montevideo, Uruguay; ² Unidad Académica de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; ³Laboratorio de Enzimología Molecular. Instituto de Agrobiotecnología del Litoral, CONICET-UNL, Santa Fe, Argentina; ⁴Sección Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Trypanosoma cruzi es el parásito responsable de la enfermedad de Chagas, cuyo éxito infectivo se debe en parte a su capacidad para resistir el ataque oxidativo del hospedero. Para ello posee sistemas antioxidantes, como las peroxirredoxinas (Prxs) citosólica (c-TXNPx) y mitocondrial (m-TXNPx), que han sido descritas como factores de virulencia. En este trabajo se realizó una caracterización fisicoquímica preliminar las TXNPx de *T. cruzi*. Este estudio buscó comprender cómo las TXNPx responden a diferentes tipos de estrés, analizando los cambios conformacionales que experimentan y su estabilidad termodinámica. Se estudio qué papel juegan las cisteínas en estos aspectos analizando mutantes de residuos de cisteína catalíticos y no catalíticos de la c-TXNPx.

Objetivo: Analizar las propiedades de estabilidad térmica y los cambios estructurales de las TXNPx en distintas condiciones redox a diferentes valores de pH.

Metodología: Se realizaron ensayos de estabilidad térmica bajo distintas condiciones redox a diferentes valores de pH a través de la técnica de *thermo shift assay*, monitoreando los cambios de fluorescencia indirecta en presencia de la sonda *SYPRO Orange*. También se evaluaron cambios estructurales bajo diferentes condiciones redox y de pH de las TXNPx y sus variantes, mediante espectroscopía de fluorescencia utilizando la sonda hidrofóbica ANS.

Resultados: En cuanto a la estabilidad termodinámica, se analizaron los cambios de valores de Tm_{app} para las proteínas estudiadas en las condiciones ensayadas. Las variantes de c-TXNPx, tanto en condiciones de reducción y de sobreoxidación a valores de pH ácidos (4,0-5,0), presentan valores de Tm_{app} menores comparativamente a la condición de oxidación. Curiosamente, a pH 7,4-8,0 no se visualizan diferencias significativas en los cambios de Tm_{app} . Por el contrario, la proteína m-TXNPx en condición de oxidación a valores de pH más básicos exhibe valores de Tm_{app} mayores en comparación a las otras dos condiciones redox; a valores de pH ácidos no se observaron cambios.

Los estudios de fluorescencia con ANS mostraron que la proteína c-TXNPx WT presenta mayor exposición de regiones hidrofóbicas bajo condición de oxidación en comparación a otras condiciones redox. Se pudo determinar que el nivel de exposición de regiones hidrofóbicas bajo condición de oxidación fue dependiente de la presencia o ausencia de los residuos de Cys en la proteína.

Conclusiones: Las condiciones de oxidación modifican la estabilidad termodinámica y la exposición de regiones hidrofóbicas en la c-TXNPx en mayor medida que para la m-TXNPx. Estos datos sugieren que existen diferencias estructurales y de estabilidad entre estas Prxs de *T. cruzi*.

Edición de *Trypanosoma cruzi* mediante la metodología CRISPR-Cas9 para el estudio de GP63

María José Díaz^{1,2}, María Laura Chiribao^{1,3}, Adriana Parodi Talice^{1,2}.

¹Laboratorio Interacciones Hospedero-Patógeno, Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay. ²Sección Genética Evolutiva, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay. ³Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay

GP63 (Glicoproteína 63) es una familia multigénica de metaloproteasas presentes en las tres especies de tripanosomátidos patógenos humanos *Trypanosoma cruzi*, *T. brucei* y *Leishmania sp.* En *Leishmania* GP63 es un factor de virulencia clave, presentando roles fundamentales en la infección y evasión del sistema inmune del hospedero. Sin embargo, en *T. cruzi* aún se desconoce qué funciones cumplen estas proteínas en el proceso infeccioso.

El genoma de *T. cruzi* contiene 96 secuencias de genes completos codificantes para GP63. Mediante análisis de identidad de secuencia y filogenéticos hemos organizado a estos genes en once grupos, cada uno con perfiles de expresión particulares. Estudios transcriptómicos muestran que varios miembros de esta familia presentan expresión diferencial en la forma infectiva tripomastigota.

Para estudiar el rol de GP63 en *T. cruzi*, nos propusimos generar líneas celulares *knockout* mediante la metodología CRISPR-Cas9. Para ello diseñamos ARN guías específicos para dos genes de GP63 con expresión diferencial en tripomastigotas; y utilizamos un ADN *Donor* que contiene genes de resistencia a fármacos, permitiendo la selección de los parásitos editados.

Obtuvimos líneas resistentes a los antibióticos empleados, que fueron caracterizadas mediante PCR usando cebadores específicos. Los resultados obtenidos muestran que las líneas fueron satisfactoriamente editadas. Actualmente estamos analizando la expresión de los genes blanco a nivel de ARN mensajero mediante PCR en tiempo real, y conduciendo ensayos de infectividad *in vitro*.

Este proyecto aportará información valiosa sobre la relevancia funcional de algunos miembros de GP63 en *Trypanosoma cruzi*, contribuyendo a la comprensión de sus mecanismos de patogénesis e infectividad.

Optimización de condiciones de cultivo para marcado isotópico de polisacáridos O-específicos de *E. coli* con carbono-13

Juliana Miranda¹, Ximena Samandú¹, Sylvia Cuchman², Carolina Fontana²

¹Pasantía final de carrera del Tecnólogo Químico UTU-UTEC-UdelaR. ²Laboratorio de Espectroscopía y Fisicoquímica Orgánica, Departamento de Química del Litoral, CENUR Litoral Norte, UdelaR.

Escherichia coli es un bacilo gramnegativo, anaerobio facultativo, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, que forma parte de la microflora intestinal de muchos animales. Los diferentes serogrupos de las enterobacterias se definen en base a la reactividad serológica del antígeno O-específico (O-Ag) presente en su superficie, habiéndose reconocido hasta la fecha 182 serogrupos de *E. coli*. Las estructuras químicas de los O-Ag de cepas lisas representativas de estos serogrupos ya han sido todas descritas en literatura, además de algunas pocas estructuras que no han sido incluidas aún en el esquema de tipificación serológico. Considerando el interés en estudiar la dinámica conformacional de estas biomoléculas mediante espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), nuestro grupo de investigación se está enfocando en la optimización de la producción de O-Ag marcado isotópicamente con ¹³C. Previo al empleo de una fuente de carbono (glucosa) marcada isotópicamente se llevaron a cabo estudios de optimización de las condiciones de cultivo empleando reactivos en abundancia natural. Por esta razón en una primera instancia se buscó optimizar las condiciones de crecimiento de las cepas de referencia internacional de *E. coli* O160 y O181, así como de la cepa SC-UY1. Esta última cepa fue aislada de la región a partir de la necropsia de un ternero con diarrea, resultando un nuevo serogrupo de *E. coli*.^[1-3] Además de evaluar las condiciones de crecimiento microbiano en medio LB a diferentes tiempos y concentraciones de inóculo inicial, se procedió a evaluar la respuesta frente al agregado de glucosa como suplemento. Para la extracción del LPS de la cepa SC-UY1 se utilizó el método Westphal y Jann 1965,^[4] donde se emplea una mezcla de fenol/agua a 65°C. El antígeno O-específico libre de lípido A se obtuvo por tratamiento del LPS con AcOH 1% (en reflujo por 1.5 hrs), o directamente a partir del pellet celular. Las diferentes preparaciones fueron analizadas empleando técnicas analíticas que incluyen reacciones colorimétricas (técnica espectrofotométrica basada en una reacción con orcinol-sulfúrico para cuantificación de carbohidratos, TLC y espectroscopía de RMN). Los resultados obtenidos nos han permitido definir condiciones óptimas de cultivo para proceder con el marcado isotópico, en el que se empleará [C₁-¹³C]-glucosa como fuente de carbono.

Optimización de la obtención del antígeno O-específico de *E. coli* SC-UY4 libre del lípido A nativo y modificado

Maia Bezmertny¹, Sylvia Cuchman², Carolina Fontana²

¹Pasantía final de la carrera Tecnólogo Químico UTU-UTEC-UdelaR, Paysandú, Uruguay;

²Laboratorio de Espectroscopía y Fisicoquímica Orgánica, Departamento de Química del Litoral, CENUR LN, UdelaR.

Reconociendo la importancia del desarrollo de vacunas veterinarias adaptadas a la realidad nacional, y la problemática de la diarrea fulminante en terneros que genera significativas pérdidas económicas en el país, se realizó un trabajo de investigación enfocado a la optimización de la obtención de material antigénico con potencial uso en la formulación de nuevas vacunas polisacáridicas. En este trabajo utilizamos una cepa de *Escherichia coli* (SC-UY4) obtenida de una necropsia de ternero con diarrea en el departamento de Paysandú. El antígeno O-específico de esta cepa fue caracterizado recientemente en nuestro grupo de investigación y presenta una estructura química novedosa (xiloramnano) que permitiría definir un nuevo serogrupo de esta especie.^[1] En este trabajo se llevaron a cabo curvas de crecimiento bacteriano utilizando la cepa de referencia internacional de *E. coli* O152, con el objetivo de mejorar condiciones de cultivo para su implementación en la cepa de interés. Tras la mejora, se obtuvo pellet celular de diferentes volúmenes y se aplicaron técnicas para extraer lipopolisacáridos nativos (LPS) y/o antígeno O-específico libre de lípido A (O-PS) de la superficie celular. Se emplearon diversas técnicas analíticas y separativas para estudiar los productos obtenidos. El espectro de ¹H RMN del O-PS obtenido por tratamiento directo del pellet celular con AcOH 1%, comparado con el espectro de referencia de un O-PS obtenido previamente a partir de LPS extraído con la técnica de fenol/agua en caliente, no mostraron diferencias significativas. Esto permitió obtener un producto final más puro y con mejores rendimientos, eliminando la necesidad de un paso de purificación adicional y evitando el uso de solventes nocivos para el medio ambiente. El material resultante fue modificado químicamente para introducir grupos carboxilatos a nivel de las ramificaciones, con el objetivo de evaluar su potencial acoplamiento a nanopartículas de oro como estrategia de formulación de nuevas vacunas conjugadas.

Evaluación de diferentes métodos de extracción del antígeno O-específico del aislado SC-UY1 de *E. coli* empleando SDS-PAGE

Ximena Samandú¹, Sylvia Cuchman² y Carolina Fontana².

¹Pasantía de Final de Carrera del Tecnólogo Químico, UTU-UTEC-UdelaR. ²Laboratorio de Espectroscopía y Físicoquímica Orgánica, Departamento de Química del Litoral, CENUR Litoral Norte, UdelaR.

Las bacterias Gram negativas se distinguen por una mayor complejidad en la morfología de su pared celular en comparación con las Gram positivas. En las primeras está pared está compuesta por una capa de peptidoglicano relativamente delgada y una membrana externa que en su superficie contiene principalmente lipopolisacáridos (LPS). El objetivo principal de este trabajo es la optimización de un protocolo de análisis de LPS (o materiales polisacáridicos obtenidos a partir de éste) por SDS-PAGE, evaluando diferentes métodos de extracción de este componente. La cepa de interés corresponde al aislado SC-UY1 de *E. coli*, obtenido durante una necropsia de un ternero con diarrea fulminante; el antígeno O-específico de este aislado fue caracterizado recientemente en nuestro laboratorio y correspondería a un nuevo serogrupo de esta especie.^[1] La cepa de referencia internacional de *E. coli* O84 también se empleó para optimizaciones de crecimiento iniciales. A partir de un cultivo bacteriano en medio LB de la cepa de interés se realizó una curva de crecimiento para evaluar el tiempo óptimo de proliferación bacteriana. En correlación fueron utilizados diferentes métodos de extracción tanto para LPS y polisacárido O-específico libre del lípido A (O-PS). En ellos se encuentran metodologías de Westphal y Jann,^[2] Hitchcock,^[3] un kit comercial y extracción con AcOH 1% directamente a partir del pellet celular, analizando la pureza de las diferentes preparaciones junto con técnicas de electroforesis SDS-PAGE y espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Modelado y simulaciones multiescala de ácidos nucleicos modificados: desde los electrones hasta el genoma de levadura

Pablo D. Dans^{1,2}

¹Laboratorio de Biofísica Computacional. Departamento de Ciencias Biológicas, CENUR Litoral Norte, Universidad de la República. Uruguay.²Unidad de Bioinformática. Instituto Pasteur de Montevideo. Uruguay. pdans@pasteur.edu.uy

Las modificaciones químicas reversibles y dinámicamente reguladas del ADN y ARN están mucho más extendidas de lo que se pensaba inicialmente. Estas modificaciones juegan roles clave en importantes procesos biológicos, incluyendo la regulación génica, la diferenciación celular, la determinación del sexo y las respuestas al estrés, introduciendo dos capas adicionales de control celular conocidas como el epigenoma y el epitranscriptoma. Además, los ácidos nucleicos modificados han surgido como una vía terapéutica prometedora. Más allá de las conocidas vacunas de ARN, los oligonucleótidos anti-sentido y los aptámeros pueden incorporar en diversas posiciones de la estructura molecular una amplia variedad de ácidos nucleicos modificados que sirven para generar uniones específicas, ofreciendo nuevas oportunidades para la industria farmacéutica.

En esta presentación, se recorrerán cuatro casos exitosos y un proyecto en curso en los que se emplearon modelado multiescala y simulaciones para investigar cómo las modificaciones epitranscriptómicas regulan la actividad del ribosoma [1], cómo las modificaciones epigenéticas 5-metilcitosina y 5-hidroximetilcitosina en el ADN afectan la estructura de la doble hélice [2], cómo el genoma 3D/4D de levaduras se ve perturbado por los efectos intrínsecos de la metilación del ADN [3,4], y cómo una nueva marca epigenética de la histona H3 está relacionada con la reparación del ADN [5]. Finalmente se introducirá modXNA, un enfoque basado en química cuántica para desarrollar una biblioteca de parámetros para modelado molecular. La biblioteca incluye 132.685 modificaciones de ARN y ADN, cubriendo holgadamente todo el espectro de ácidos nucleicos modificados naturales y no naturales conocidos, que al momento son menos de 500.

Evolución dirigida para incrementar el potencial oncolítico de virus RNA

Juan Gandioli, Mercedes Paz, Pilar Moreno, Gonzalo Moratorio

Universidad ORT, Laboratorio de Evolución Experimental de Virus (LEEV), GUSKA?

El siguiente trabajo presenta una investigación enfocada en la evolución dirigida del virus Mayaro (MAYV) para mejorar su potencial como virus oncolítico, es decir, un virus que puede ser utilizado en la terapia contra el cáncer. Los virus oncolíticos (VOs) son capaces de replicarse en células tumorales y destruirlas, lo que los convierte en una prometedora herramienta en el tratamiento del cáncer. Sin embargo, su eficacia está limitada por diversos factores, como la capacidad del sistema inmunológico de suprimir su replicación en células tumorales. La investigación se centra en superar una de las barreras principales para el uso de MAYV en la terapia oncolítica: la resistencia de ciertas células tumorales debido a la alta expresión de la proteína antiviral dedo de zinc (ZAP). Esta proteína reconoce y degrada el ARN viral uniéndose a regiones ricas en dinucleótidos CpG, inhibiendo la replicación de diversos virus, incluido MAYV. En particular, mi trabajo plantea mejorar la replicación del MAYV en células con alta expresión de ZAP mediante un proceso de evolución dirigida, donde el virus es adaptado a este entorno a través de múltiples pasajes en líneas celulares resistentes.

El trabajo describe en detalle el proceso de evolución dirigida, que incluye la exposición repetida del virus a líneas celulares resistentes y la selección de variantes que muestran una mejor capacidad de replicación en estas células. A lo largo del estudio, se realizaron pasajes en dos tipos de líneas celulares: aquellas con alta expresión de ZAP y aquellas donde se había suprimido la expresión de esta proteína (ZAP KO). Los resultados indicaron que, a pesar de los intentos de adaptación, el virus no logró proliferar eficientemente en las células con alta expresión de ZAP, lo que sugiere que en el marco del diseño experimental basado en evolución dirigida en este trabajo, no se ha logrado superar esta barrera. Sin embargo, en las líneas celulares ZAP KO, se observó una producción sostenida de partículas virales infectivas, lo que implica que la presión evolutiva ejercida por ZAP es un factor determinante en la capacidad replicativa del virus.

Finalmente se analizaron los virus evolucionados en la línea con baja expresión de ZAP para identificar posibles mutaciones que hayan surgido durante los pasajes y que puedan estar relacionadas con un cambio en el efecto citopático del virus.

Evaluación de la actividad de un péptido antimicrobiano de Ibirapitá utilizando diferentes vectores de expresión para su producción recombinante

Milagros Zerpa¹, Susana Rodríguez-Decuadro¹

¹Laboratorio de Biotecnología, Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía, UdelaR, Montevideo, Uruguay

Los péptidos antimicrobianos (AMPs) forman parte de la inmunidad innata de plantas y participan también en procesos fisiológicos de las mismas. Además de presentar actividad contra fitopatógenos, se ha encontrado que los AMPs vegetales presentan actividad antimicrobiana *in vitro* frente a agentes patógenos causantes de infecciones en humanos y animales. Nuestro grupo de trabajo ha aislado el gen de un AMP de la familia de las esnaquinas, presente en brotes de *Peltophorum dubium* (Ibirapitá). Esta esnaquina, denominada PdSN1 fue expresada de forma heteróloga en *Escherichia coli* utilizando el sistema Rosetta-gami/pET102. El plásmido utilizado incluye a la proteína Tiorredoxina, como proteína de fusión, que fue eliminada utilizando la proteasa Enteroquinasa. Si bien el péptido liberado presentó actividad contra patógenos vegetales y humanos, este proceso disminuye los rendimientos y aumenta los costos de producción. En este trabajo se propone evaluar otros vectores de expresión con el fin de optimizar las condiciones de producción y con la posibilidad de visualizar mediante microscopia el modo de acción de estos péptidos. Se seleccionaron los plásmidos pET28a y pET-His6-GFP-TEV-LIC, obteniendo en el primer caso His6-PdSN1 y en el segundo caso His6-GFP-PdSN1. En éste último, el péptido se puede liberar de la GFP con la enzima TEV. La secuencia PdSN1 correspondiente al péptido maduro fue subclonada en los vectores seleccionados utilizando *restriction-free cloning*. Se transformaron cepas de *E. coli* Rosetta-gami y luego de la inducción con IPTG y crecimiento a 28°C por 24 hs, en ambos sistemas se recuperó el péptido recombinante en la fracción soluble en cantidades adecuadas para su purificación, mediante cromatografía de afinidad Ni²⁺. Actualmente se están realizando ensayos de actividad antimicrobiana mediante CIM contra los fitopatógenos *Colletotrichum* spp y *Botrytis cinerea* con los péptidos His6-PdSN1, His6-GFP-PdSN1 y Trx-PdSN1-His6. Se compararán los valores CIM y en el caso de que His6-GFP-PdSN1, presente actividad contra alguno de los hongos evaluados, será utilizado para comenzar a estudiar el modo de acción de PdSN1 contra dicho patógeno. Además, el péptido His6-PdSN1 podrá ser utilizado en futuras líneas de investigación enfocadas en el desarrollo de productos útiles para el tratamiento o el control efectivo de enfermedades.

Desarrollo y evaluación de promotores para *Gluconobacter*

Magdalena Ripoll, **Manuela Machado Da Silva**, Mercedes Strauch, Malena Dalies, Lorena Betancor y Ana Paula Mulet.

Laboratorio de Biotecnología, Departamento de Biotecnología, Universidad ORT Uruguay, Mercedes 1237, Montevideo 11100, Montevideo, Uruguay

Las bacterias del género *Gluconobacter* se destacan por realizar reacciones de oxidación en su espacio periplásmico, utilizando enzimas deshidrogenasas asociadas a la membrana. Esta capacidad es crucial para aplicaciones industriales, ya que permite obtener productos de valor agregado como la dihidroxiacetona, el ácido glicérico y la L-sorbose. La ingeniería genética de estas bacterias, enfrenta desafíos significativos debido a que constituyen organismos no modelo. El desarrollo de herramientas moleculares para estos microorganismos es altamente relevante, ya que puede potenciar su utilidad industrial al permitir la creación de mutantes con mejor capacidad de producción de compuestos o incluso la generación de nuevos productos.

Un elemento clave en la regulación de la expresión génica son los promotores, que controlan el inicio de la transcripción y, por ende, la cantidad de proteína producida. La eficiencia de los promotores varía entre microorganismos, por lo que es esencial caracterizarlos en *Gluconobacter*.

En este estudio se evaluaron varios promotores en *Gluconobacter oxydans* (Gox) y *Gluconobacter frateurii* (Gfr), especies de interés para la producción de compuestos biotecnológicos. Se probaron el promotor J23104, conocido en acetobacterias; los promotores p2703 y pB932_2000, descritos para *G. oxydans* WSH-003; y el promotor pMD110, diseñado específicamente para este trabajo. El objetivo fue determinar el potencial de estos promotores para su uso en construcciones génicas que mejoren las capacidades biocatalíticas de estas bacterias.

Se realizaron construcciones utilizando el gen reportero para la proteína fluorescente mCherry y el plásmido pSEVA231-CRISPR como *backbone*. Los plásmidos, con las diferentes variantes de promotores, se transformaron en ambas especies de *Gluconobacter* y se evaluó la expresión del gen reportero mediante la cuantificación de fluorescencia.

Los resultados mostraron que la expresión en Gox fue en general superior a la de Gfr. En Gox, el promotor J23104 mostró los niveles más altos de expresión, alcanzando una intensidad de fluorescencia de 43008 ± 1554 unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF), seguido por los promotores p2703 y pMD110, con niveles de expresión de 13823 ± 3059 y 13049 ± 674 UAF, respectivamente. En Gfr, el promotor J23104 también presentó la mayor actividad, con una fluorescencia de 31793 ± 1016 UAF, mientras que p2703 y pMD110 mostraron valores de 5578 ± 320 y 2738 ± 75 UAF, respectivamente. Por su parte, el promotor pB932_2000 no mostró expresión significativa en ninguna de las dos especies.

Los resultados obtenidos durante este trabajo contribuyen a la ampliación de las herramientas genéticas disponibles para este género bacteriano.

Diseño de un método de secuenciación de amplicones para la detección de regiones genómicas únicas en microorganismos de interés clínico

Licandro, Santiago ¹; Lucía Bilbao ^{1,2}; Fabio Grill ^{3,4}; Cecilia Brito ⁵; Claudia Piccini ⁶; Pablo Smircich ^{1,3}; José Roberto Sotelo-Silveira ^{1,7}.

¹Departamento de Genómica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. ²Laboratorio de Genómica Funcional, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. ³Unidad de Enfermedades Infecciosas, Hospital Maciel (ASSE). ⁴Departamento de Medicina Intensiva, CASMU IAMPP. ⁵Área Preanalítica, CASMU IAMPP. ⁶Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. ⁷Sección Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

Las infecciones nosocomiales son aquellas que ocurren durante el tiempo de hospitalización del paciente. Las mismas representan un aumento en la morbi-mortalidad y del tiempo de hospitalización, lo cual resulta también en un importante aumento del costo de tratamiento. En este sentido, el estudio de los patógenos microbianos presentes en las superficies de las unidades de cuidados intensivos (UCIs) es de importancia para la implementación de protocolos de higiene dirigidos que intenten reducir dicho riesgo. En la actualidad, las metodologías de secuenciación masiva hacen posible la detección en simultáneo de todos los microorganismos en una muestra, sin necesidad de un paso previo por cultivo. El objetivo de este trabajo comprende el diseño y la implementación de dos paneles cebadores de AmpliSeq para la detección simultánea, por secuenciación de amplicones, de una lista de microorganismos de interés clínico. Uno de los paneles fue generado mediante el estudio de la bibliografía existente para la obtención de marcadores genómicos con potencial para diagnóstico. Por otro lado, a través del desarrollo y la posterior implementación de un pipeline bioinformático nos encontramos en el proceso de selección de posibles blancos para el segundo panel de cebadores. Dicho pipeline implementa un software llamado "finding unique regions" (*fur*), que permite la identificación de regiones genómicas únicas. Las secuencias devueltas por dicho programa son luego alineadas con la base de datos de nucleótidos a través del software "blastn" (NCBI). Posteriormente, el archivo de alineamientos es filtrado por porcentaje de cobertura y parseado para evaluar la especificidad y la conservación de las secuencias obtenidas. Por último, el pipeline utiliza las coordenadas de las secuencias únicas para buscar en un archivo de anotación "gff" información acerca de las regiones que solapan con dichas coordenadas. Haciendo uso de este pipeline, se obtuvo al menos una región genómica única para un 65% de los patógenos de interés, muchas de las cuales solapan con regiones codificantes y/o regulatorias. A su vez, se identificaron secuencias que corresponden a factores de virulencia, en específico factores de adhesión, sideróforos y toxinas. Tras su evaluación, se seleccionarán las secuencias más prometedoras para el diseño del segundo panel. Finalmente, ambos paneles serán utilizados en muestras de ADN tomadas de superficie de UCIs para estudiar la especificidad y sensibilidad de los mismos. La identificación de estas regiones genómicas únicas podría no solo aportar al diagnóstico de estos patógenos, sino que también a profundizar en el entendimiento de los mismos.

Microscopía de Super-Resolución en Uruguay: Implementación del Primer Sistema Compatible con dSTORM y DNA-PAINT

Garat, Joaquín¹; Oliveira, Carolina², Bentancor, Marcel³; Trigo, Federico²; Rodríguez-Casuriaga, Rosana²; Piccini, Claudia²; Sotelo-Silveira, José¹; Masullo, Luciano⁴; Di Paolo, Andrés².

¹Departamento de Genómica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay. ²Plataforma de Microscopía de Fluorescencia, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay. ³Espacio de prototipado. Facultad de Ciencias, Facultad de Agronomía, UdelaR, Montevideo, Uruguay. ⁴Jungmann Lab, Max Planck Institute of Biochemistry, München, Alemania

La microscopía de fluorescencia es una herramienta esencial tanto en la academia como en la industria, con avances notables en las últimas dos décadas. La necesidad de resolver estructuras biológicas a escala nanométrica, con preparaciones simples y en sistemas dinámicos, impulsó el desarrollo de metodologías que permiten obtener imágenes de superresolución al superar las limitaciones impuestas por el límite de difracción de Abbe de 1873, que restringe la resolución de la microscopía óptica a aproximadamente 200 nanómetros. En 2014, el Premio Nobel de Química fue otorgado a los desarrolladores de tres metodologías independientes de superresolución (SR): Microscopía de Localización Fotoactivada (PALM), Microscopía de Iluminación Estructurada (SIM) y Depleción de Emisión Estimulada (STED). De estas innovaciones surgieron tecnologías como dSTORM y DNA-PAINT, ambas técnicas de detección de molécula única. Estas técnicas se basan en el parpadeo estocástico de señales fluorescentes y, al poder implementarse en microscopios de epifluorescencia modificados, ofrecen una opción más económica en comparación con otras tecnologías de SR que requieren sistemas de iluminación más complejos. En este contexto, nuestro grupo instaló el primer sistema de SR tipo estocástico en Uruguay, utilizando un microscopio Olympus IX-81, láseres de 1 vatio de potencia y una cámara sCMOS con 95% de eficiencia cuántica, adaptando además un sistema de iluminación TIRF/HILO de bajo costo. Con un kit fluorogénico de DNA-PAINT, reconstruimos reglas de 80 y 40 nanómetros, alcanzando valores de resolución teóricos de aproximadamente 9 nm. Trabajando con muestras biológicas, hemos logrado reconstruir anillos de actina, detectar la distribución de proteínas ribosomales en forma de polisomas en criosecciones de 20 μm del nervio ciático, entre otras. Además, y para optimizar nuestro sistema, estamos adaptando un sistema activo de corrección de enfoque con un nanoposicionador de objetivo Nano-F100, basado en la luz reflejada por la iluminación HILO-TIRF. Asimismo, planeamos realizar experimentos de Exchange-PAINT para visualizar múltiples proteínas utilizando una misma longitud de onda de excitación. Aunque seguimos en fase de ajustes, nuestro microscopio de SR ya está operativo y anticipamos que pronto facilitará colaboraciones, incluyendo trabajos en curso con el Dr. Luciano Masullo del Instituto Max Planck de Bioquímica (grupo inventor del DNA-PAINT) así como con otros equipos de investigación nacionales e internacionales.

***Salmonella* LVR01 induce tolerancia en monocitos periféricos: impacto en su uso como inmunoterapia tumoral**

Chilibroste, S¹, dos Santos, CJ², Joosten, LAB^{2,3}, Moreno, M¹, Chabalgoity, JA¹.

¹Unidad Académica de Desarrollo Biotecnológico, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. ²Department of Internal Medicine, Radboud University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands. ³Department of Medical Genetics, Iuliu Hatieganu University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca, Romania.

Las células del sistema inmune innato tienen la capacidad de reprogramarse metabólicamente y experimentar modificaciones epigenéticas en respuesta a diversos estímulos. Estos cambios pueden dar lugar a dos resultados opuestos: inmunidad entrenada o tolerancia. La inmunidad entrenada se manifiesta como una respuesta inflamatoria más intensa ante un segundo estímulo, mientras que la tolerancia se caracteriza por una parálisis inmunológica, con una disminución de la respuesta frente a estímulos posteriores. La tolerancia inducida por LPS es un fenómeno que se ha estudiado en profundidad en situaciones de sepsis donde las células generan tolerancia como un mecanismo de defensa para prevenir una tormenta de citoquinas y evitar lesiones graves en el hospedero. También se ha descrito que cantidades bajas de LPS pueden inducir inmunidad entrenada en ciertas poblaciones inmunes. En nuestro laboratorio estudiamos el efecto antitumoral de una cepa atenuada de *Salmonella* Typhimurium llamada LVR01. Nos interesa determinar si LVR01 induce reprogramación en las células de la inmunidad innata y cómo esto impacta en su efecto inmunoterapéutico. Para ello, evaluamos la capacidad de LVR01 de inducir inmunidad entrenada *in vitro* e *in vivo*, y probamos un modelo de inmunidad entrenada en cáncer *in vivo*. Los resultados fueron bimodales: comprobamos que LVR01 induce tolerancia en monocitos periféricos humanos y murinos, pero *in vivo* observamos que los animales pre-tratados con LVR01 y que luego sus médulas fueron re-estimuladas *ex vivo* con LPS presentaron una respuesta inflamatoria aumentada. Además, en el modelo murino tumoral, la administración profiláctica de LVR01 retrasó el crecimiento de los tumores y aumentó la sobrevida global en los animales tratados. Estos hallazgos nos hacen reflexionar sobre el efecto transitorio que tienen las terapias basadas en el uso de *Salmonella* atenuada, y planteamos la hipótesis de que la tolerancia inmunológica periférica podría contribuir a la resistencia a la terapia.

Catálisis de la reacción entre glutatión y ácido nitro-oleoesteárico por la glutatión transferasa A1 humana

Martín Sosa¹, Martina Steglich¹, Francisco Schopfer², Lucía Turell¹

¹Laboratorio de Enzimología, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias y Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad de la República. ²Department of Pharmacology and Chemical Biology, School of Medicine, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA.

Los nitroalquenos derivados de ácidos grasos son potentes mediadores lipídicos que actúan como electrófilos. Se forman durante la digestión y en procesos inflamatorios, y también pueden administrarse como fármacos. Estos compuestos exhiben diversos efectos citoprotectores y antiinflamatorios, debido principalmente a su capacidad de participar en reacciones de adición-eliminación de Michael con tioles proteicos y no proteicos, como el tiol del glutatión (GSH). Hipotetizamos que la glutatión transferasa A1 humana (*hGST A1*), mayoritaria en hígado, cataliza la reacción entre GSH y el ácido nitro-oleoesteárico (NO₂EA), un nuevo nitroalqueno cuyos isómeros se observaron en orina de personas sanas. Así, proponemos que la *hGST A1* participa en las vías de inactivación y eliminación de los nitroalquenos. En este trabajo, se expresó la *hGST A1* de forma recombinante en *E. coli* y se la purificó por cromatografía en columna en dos pasos; primero usando una resina de GSH sefarosa y segundo por exclusión molecular. La pureza se evaluó por SDS-PAGE reductor, donde se obtuvo una única banda consistente con el peso esperado para el monómero de *hGST A1* de ~26 kDa. La concentración del lote resultó ser 16 μM. La actividad específica se midió utilizando GSH (4 mM) y CDNB (1 mM) como sustratos, resultando en 67 U/mg (pH 7.4, 25 °C). Una estrategia catalítica común de las *hGSTs* es disminuir el pK_a del GSH para aumentar la disponibilidad de su forma tiolato (nucleofílica). El pK_a del GSH unido al sitio activo de la *hGST A1* (7.3) resultó ser 1.8 unidades menor que el pK_a del GSH libre (9.1). Se evaluó la catálisis de la reacción entre NO₂EA (20 μM) y GSH (2 mM) por *hGST A1* (0–1.2 μM), siguiendo el consumo de NO₂EA en un espectrofotómetro de flujo detenido. Los cursos temporales muestran la existencia de catálisis enzimática en comparación con la reacción espontánea. En el perfil cromatográfico de la reacción catalizada se observaron al menos tres picos correspondientes a los aductos, que no se vieron en la reacción espontánea. A futuro se caracterizarán los productos de la reacción por espectrometría de masa y se evaluarán los efectos celulares del NO₂EA. La existencia de catálisis por parte de GSTs es de relevancia biológica y farmacológica puesto que puede afectar los efectos señalizadores de estos compuestos.

De la mesada al paciente: Desarrollo preclínico y clínico de un nuevo fármaco para el tratamiento de la obesidad

Karina Cal^{*1,9}, Alejandro Leyva^{*2,3}, Jorge Rodríguez-Duarte^{1,2}, Santiago Ruiz¹, Leonardo Santos¹, Lucía Colella^{2,23}, Mariana Ingold^{2,23}, Lucía Ziegler⁴, Mariana Bresque¹, Rachel M Handy⁵, Rachel King⁶, Larissa Menezes dos Reis⁷, Andrés Lopez⁸, Williams Porcal^{2,23}, Aldo Calliari^{1,9}, José Manuel Verdes¹⁰, John M Hollander^{11,12}, Rafael Radj^{13,14}, Guillermo Moyna⁸, Celia Quijano^{13,14}, Pedro Moraes-Vieira⁷, Graham P Holloway⁵, Roberta Leonardi^{6,11}, Marcelo A Mori¹⁵, Juliana Camacho-Pereira¹⁶, Eric E. Kelley^{11,17,18}, Rosario Duran³, Eduardo N. Chini^{19,20,21,22}, Gloria V. Lopez^{*2,23}, Carlos Batthyány^{*2}, Carlos Escande^{1#}

1- Lab. Patologías del Metabolismo y Envejecimiento, IPMon-Uruguay; 2- Lab. Biología Vascular y Desarrollo de Fármacos, IPMon-Uruguay; 3- Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas, IPMon-IIBCE-Uruguay; 4- Depto. Ecología y Gestión Ambiental, CENUR-Uruguay; 5- Dept. Human Health and Nutritional Sciences, University of Guelph-Canada.; 6- Dept. Biochem. and Mol. Medicine, West Virginia University-USA; 7- Lab. Immunometabolism, Institute of Biology, University of Campinas-Brazil; 8- Lab. Físicoqca. Orgánica, CENUR-Uruguay; 9- Unidad Biofísica, Fac.Veterinaria, Udelar-Uruguay; 10- Unidad Patología, Fac. Veterinaria, Udelar-Uruguay, 11- Mitochondria, Metabolism and Bioenergetics Working Group; School of Medicine, & 12- Div. Exercise Physiology, West Virginia University-USA; 13- Centro de Investigaciones Biomédicas & 14- Depto. Bioqca., Fac.Medicina, Udelar-Uruguay; 15- Dept. Biochem. and Tissue Biology, Institute of Biology, University of Campinas-Brasil; 16- Lab. Bioenergetics and Mitochondrial Physiology, Institute of Medical Biochemistry Leopoldo de Meis, Federal University of Rio de Janeiro-Brasil 17- Dept. Physiology and Pharmacology & 18- Center for Inhalation Toxicology, School of Medicine, West Virginia University-USA; 19- Mayo Clinic Robert and Arlene Kogod Center on Aging & 20- Dept. Anesthesiology & 21- Dept. Physiology and Biomedical Engineering; Mayo Clinic-Rochester-USA & 22- Dept. Anesthesiology and Perioperative Medicine, Mayo Clinic-Florida-USA; 23- Depto. Química Orgánica, Facultad de Química, Udelar-Uruguay- *Igual contribución. # Autor de correspondencia.

La obesidad y sus comorbilidades, incluida la diabetes tipo II (DTII) y las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de morbilidad a nivel global. El continuo ascenso de su incidencia, a pesar de continuos esfuerzos para promover hábitos de vida saludables, reafirma la necesidad de desarrollar nuevos tratamientos farmacológicos. En este sentido, el antiguo fármaco salicilato ha mostrado tener efectos beneficiosos en el tratamiento de enfermedades metabólicas en pacientes obesos y con DTII. Por otra parte, los ácidos grasos nitrados insaturados han evidenciado una protección significativa contra las consecuencias metabólicas de la obesidad, debido a la reactividad de su grupo funcional nitroalqueno. Recientemente hemos demostrado que este grupo químico se puede reubicar de manera eficiente en diferentes andamios moleculares para conferir acciones biológicas emergentes. Aprovechando este concepto, sintetizamos un novedoso nitroalqueno derivado del salicilato al que llamamos SANA y nos propusimos evaluar su efecto funcional y metabólico en un modelo de obesidad inducida por dieta.

Para ello, se alimentaron ratones adultos C57BL/6J con una dieta rica en grasas suplementada con SANA (o Salicilato) o sin suplementar (Control), durante 8 semanas. En este período se midió peso, consumo de alimentos, glucosa, insulina, leptina, ácidos-grasos-libres y tasa metabólica. También se realizaron análisis histopatológicos de hígado y tejido adiposo blanco subcutáneo (scWAT) así como, análisis proteómicos, metabolómicos y de expresión de ARNm y respiración mitocondrial del scWAT.

Nuestros resultados muestran que SANA previene la obesidad revirtiendo sus consecuencias metabólicas como ser la hiperglicemia, resistencia a la insulina y la esteatosis hepática. Los análisis proteómicos, metabolómicos y de expresión de ARNm revelaron que SANA estimula el catabolismo, la respiración mitocondrial y la termogénesis del scWAT. De hecho, SANA estimula una vía termogénica dependiente de creatina recientemente descrita, mientras que la depleción de creatina anula los efectos impulsados por SANA.

Finalmente, los estudios toxicológicos, de farmacocinética y farmacodinámica realizados con el objetivo de solicitar la aprobación de las agencias regulatorias, demostraron que el SANA es una molécula segura para el uso en humanos. Esto permitió conseguir la autorización para consumir el Fase I clínico en humanos, el cual fue realizado en Australia, obteniendo resultados auspiciosos respecto de la seguridad y tolerabilidad del SANA.

Este trabajo resume los principales resultados obtenidos de una nueva droga para el tratamiento de la obesidad, que fue desarrollada íntegramente en Uruguay, desde su síntesis hasta su primera prueba en humanos.

Desarrollo de vectores para la sobreexpresión de genes posiblemente implicados en la interacción *Cupriavidus-Mimosa*

Alonso, Verónica; Eastman, Ignacio; Ferreira, Virginia; Platero, Raúl

Laboratorio de Microbiología Ambiental. Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Ministerio de Educación y Cultura. valonso@fcien.edu.uy

La cepa UYMMa02A fue aislada de nódulos de la leguminosa nativa *Mimosa magentea*, en el Departamento de Lavalleja, Uruguay. Los análisis filogenéticos revelaron que esta cepa pertenece al género *Cupriavidus*, pero se separa de las especies conocidas del género, sugiriendo que podría tratarse de una nueva especie. Nuestro equipo identificó previamente una serie de genes y proteínas que se expresan diferencialmente en la cepa UYMMa02A en respuesta a flavonoides, exudados radiculares o a la presencia de la planta hospedera modelo *Mimosa pudica*. El papel de estos genes y proteínas en el proceso de reconocimiento y establecimiento de la simbiosis es desconocido.

El objetivo general de nuestro trabajo es definir la importancia de estos genes y proteínas tanto en vida libre como durante el establecimiento de asociaciones simbióticas con plantas hospederas.

En el presente trabajo decidimos clonar 6 de los genes identificados, en el plásmido pSEVA238, de forma que quedaran bajo la acción del promotor *xyIS-pm*. Esto nos permite inducir la expresión génica en presencia de 3 metil-benzoato. Los insertos fueron confirmados mediante su secuenciación y los plásmidos corroborados se transformaron en la cepa UYMMa02A. Para evaluar el impacto de la sobreexpresión de los genes en el fenotipo bacteriano en vida libre, se analizó el crecimiento bacteriano bajo diferentes condiciones ambientales: medios de cultivo ricos y definidos, distintos pH y temperatura, movilidad y producción de biofilms, resistencia a metales y al estrés oxidativo.

La construcción de estas herramientas moleculares, junto con el posterior proceso de caracterización de las cepas generadas, proporcionarán información valiosa sobre el rol de estos genes, ayudando a dilucidar la función de los mismos en vida libre y durante el establecimiento de simbiosis efectivas con plantas hospederas.

Arquitectura celular diferencial y respuestas microambientales de modelos celulares pretumorales y tumorales expuestos a hipoxia inducida por cubreobjetos

Magdalena Millán¹, Felipe Parietti¹, Florencia Lamela², María Cecilia De Rossi³, Belén Benítez⁴, Valeria Levi³, Manoela Domingues⁵, Ronell Bologna-Molina², Miguel Arocena¹, Jimena Hochmann²

¹Departamento de Biología Odontológica, Facultad de Odontología, Universidad de la República, Uruguay. ²Departamento de Diagnóstico en Patología y Medicina Oral, Facultad de Odontología, Universidad de la República, Uruguay. ³Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, CONICET-Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. ⁴Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, CONICET-Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. ⁵Departamento de Odontología Conservadora, Facultad de Odontología Universidad do Rio Grande do Sul

La carcinogénesis es un proceso complejo que implica la acumulación de mutaciones genéticas y epigenéticas como resultado de una creciente inestabilidad genómica. Estas mutaciones permiten que las células cancerosas adquieran características diferentes a las células normales como: proliferación descontrolada, evasión, angiogénesis, metabolismo, invasión y metástasis. Además, un microambiente hipóxico constituye otro cofactor en la transformación maligna y en la resistencia a los medicamentos. Los cambios morfológicos a nivel celular, y nuclear, generados por la transformación maligna, pueden ser observados mediante microscopía. En este caso, se utilizó el microscopio confocal y el microscopio Nanolive 3D Cell Explorer de alta resolución, el cual permite obtener imágenes de índice de refracción y también de fluorescencia. En este trabajo estudiamos el efecto de la hipoxia en la transformación maligna en dos modelos celulares in vitro: un modelo pretumoral que consiste en queratinocitos humanos transducidos con tres oncogenes virales del VPH-18 (HaCaT E5, E6, E7-18), y en la línea celular tumoral CAL-27, derivada de un carcinoma de células escamosas de lengua. Uno de los aspectos que se estudió, fue con respecto a la arquitectura nuclear. En este sentido, las células CAL-27 mostraron un menor número de focos nucleares de la proteína de unión a cromatina HP-1 en comparación con las células HaCaT y HaCaT E5/E6/E7-18. Además, las células CAL-27 exhibieron regiones de mayor densidad nuclear, en comparación con las células HaCaT.

Por otra parte, estudiamos la producción mitocondrial de ATP en ambos modelos, la línea celular pretumoral HaCaT E5/E6/E7-18 y en la línea celular tumoral CAL-27. En relación con este ensayo, observamos que, tras 24 horas de hipoxia, los queratinocitos control y los queratinocitos transducidos con oncogenes virales presentaban una ligera disminución en la fluorescencia del ATP. Sin embargo, la intensidad de la fluorescencia del ATP en las células tumorales disminuyó significativamente después de 24 horas de cultivo en hipoxia. En cuanto al ensayo de muerte celular, las células CAL-27 mostraron un incremento significativo en la intensidad de fluorescencia de las caspasas en comparación con los queratinocitos de control y las células pretumorales HaCaT E5/E6/E7-18. Estos resultados sugirieron que las células tumorales CAL-27 presentaron una mayor muerte celular en comparación con las células HaCaT después de 24 horas de hipoxia. En conclusión, nuestros resultados mostraron que las células pretumorales y las células tumorales diferían en algunas características relacionadas con la carcinogénesis, como el metabolismo mitocondrial, la apoptosis y la arquitectura nuclear.

Reacción de omeprazol y H₂S

Janina Lenzi Camisa¹, Dayana Benchoam^{1,2}, Mauricio Mastrogiovanni^{2,3}, Ricardo Faccio⁴, Jenner Bonanata^{2,5}, Beatriz Alvarez^{1,2}

¹Laboratorio de Enzimología, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, UdelaR. ²Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), UdelaR. ³Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UdelaR. ⁴NanoMat & Área Física, DETEMA, Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay. ⁵Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, UdelaR.

El omeprazol es un profármaco que actúa inhibiendo la bomba de protones (H⁺,K⁺-ATPasa) de las células parietales del estómago. Químicamente es un sulfóxido que a pH ácido produce un ácido sulfénico en equilibrio con una sulfenamida, cuya reacción con un tiol (RSH) forma un disulfuro mixto (RSSR'), el cual en presencia de reductor, decae a un tioéter (RSR). Considerando que el sulfuro de hidrógeno (H₂S/HS⁻) reacciona con los ácidos sulfénicos formando persulfuros (RSSH/RSS⁻), se hipotetiza que podría reaccionar también con los derivados de omeprazol y formar un persulfuro. Este último podría decaer a un disulfuro para finalmente producir el tiol 5-metoxi-2-mercaptobencimidazol. Alternativamente, la reacción del persulfuro con otra molécula de H₂S podría dar un tiolato que se convierte en un tioéter. La reacción de omeprazol con exceso de H₂S se estudió en amortiguador citrato a pH 4.5 y 25 °C, mediante espectrofotometría UV-Vis. Se observó la aparición de turbiedad, que fue revertida por la adición del reductor tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) y que no fue observada con omeprazol solo ni en presencia de β-mercaptoetanol, sugiriendo formación de polisulfuros y azufre elemental. Los productos del omeprazol y H₂S fueron analizados por HPLC de fase reversa, detectándose un pico que también estaba presente en muestras de omeprazol con reductor TCEP. Sin embargo, no se detectaron picos correspondientes al tiol 5-metoxi-2-mercaptobencimidazol, de acuerdo a la comparación con un estándar. Los experimentos de espectrometría de masas evidenciaron la formación del tioéter. Estudios de modelado computacional DFT en solución acuosa demostraron que, si bien la formación del disulfuro del omeprazol se encuentra favorecida termodinámicamente, la formación del tioéter se encuentra mucho más favorecida cinéticamente, lo cual explica que se observe la formación de este último. Por otro lado, mediante el método de cianólisis fría se demostró la formación de compuestos con azufre sulfano (átomo de azufre unido a dos átomos de azufre o a un átomo de azufre e hidrógeno ionizable), lo cual es consistente con la formación de polisulfuros sugerida por experimentos de espectroscopía Raman. Si bien no es probable que estas reacciones ocurran en contextos fisiológicos, los resultados demuestran que el omeprazol y el H₂S reaccionan a pH ácido produciendo el tioéter derivado del omeprazol, polisulfuros y azufre elemental.

Tolerancia al frío en *Eucalyptus* spp.

Basile, P ¹; De Palma ², N; Tesser Da Costa ², C; Borsani, O ³; Fett-Neto, A ².

¹PDU "Espacio de Biología Vegetal del Noreste, CENUR Noreste, UdelaR, Uruguay. ²Laboratorio de Fisiología Vegetal, Centro de Biotecnología, Depto. Botánica, UFRGS, Brasil. ³Laboratorio de Bioquímica, Depto. Biología Vegetal, Facultad de Agronomía, UdelaR, Uruguay.

Actualmente casi el 80% de la superficie total forestada de nuestro país pertenecen a las especies *Eucalyptus grandis* y *Eucalyptus dunnii*. El frío es uno de los principales factores limitantes para la producción de cultivos y de especies arbóreas subtropicales como los *Eucalyptus*. Las bajas temperaturas producen daños a nivel fisiológico y bioquímico que incluyen: inhibición del crecimiento, deshidratación, daño en las membranas celulares, acumulación de especies reactivas al oxígeno y vaciamiento de electrolitos entre otros. Algunas especies como *Eucalyptus dunnii*, *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage, *Eucalyptus gunnii* Miq. y *Eucalyptus nitens* (H. Deane y Maiden) Maiden son conocidas por ser más tolerantes al frío, al contrario de *Eucalyptus saligna* Sm., *Eucalyptus grandis* W. Mill ex Maiden y *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake. A través de estudios fisiológicos y bioquímicos es posible identificar las características y los posibles mecanismos asociados a la tolerancia al frío en *Eucalyptus* de interés. Los objetivos de este trabajo fueron identificar las características y los posibles mecanismos asociados a la tolerancia al frío de *E. grandis* y *E. dunnii*. El estudio se realizó en la Sede Tacuarembó del CENUR Noreste, en una cámara de crecimiento. Para el experimento, se utilizaron hojas sanas de plantines de 4 genotipos de *E. grandis* (Lumin S.A) y de *E. dunnii* (UPM). El experimento consistió en mantener discos de hojas 24 h a 25°C y 4 días a 6°C. Los discos fueron ubicados en placas de Petri de 9mm de diámetro con discos de papel de filtro embebidos en medio de cultivo Murashige y Skoog al 10% v/v (30 discos por placa). Los muestreos se realizaron los días 0, 2 y 4. Durante esos días se retiraron 3 placas por especie y se separó material vegetal para realizar determinaciones de clorofila total, vaciamiento de electrolitos, prolina, carbohidratos solubles totales (TSS), actividad super oxido dismutasa, antocianinas, carotenoides, contenido de malonaldehído, H₂O₂, fenoles totales y proteína soluble total (TSP). Los resultados del experimento muestran que existen diferencias a nivel de las dos especies en cuanto al tiempo de respuesta y a los parámetros de protección al estrés. En este sentido, en *E.dunnii* los sistemas de protección tienen una máxima respuesta el día 2 (fenoles totales, TSS) mientras que en *E.grandis* la respuesta máxima se alcanza el día 4 (prolina, TSP, Antocianinas).

Estrés oxidativo en la membrana de glóbulos rojos almacenados para transfusión

López, Ana Clara^{1,2,3}; Acosta, Cecilia⁴; Möller, Matías^{2,3}; Thomson, Leonor^{1,3}

¹Laboratorio de Físicoquímica Biológica, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, ²Laboratorio de Enzimología, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, ³Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad de la República, ⁴Departamento de Medicina Transfusional, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República.

Los glóbulos rojos (GRs) almacenados para transfusión experimentan cambios progresivos que afectan la calidad y la eficacia terapéutica de la preparación. Estas alteraciones, conocidas como lesiones de almacenamiento, incluyen cambios bioquímicos y morfológicos, que conducen a la liberación de microvesículas, alterando la membrana de los GRs. Estos eventos son inducidos, al menos en parte, por el estrés oxidativo. El uso de técnicas de leucorreducción en los países de la Unión Europea y en parte de los Estados Unidos ha disminuido la incidencia de reacciones adversas de la transfusión, lo que sugiere que los leucocitos y sus mediadores son responsables. En Uruguay, solo el 15% de los volúmenes de GRs transfundidos son leucorreducidos. Con el fin de colaborar en el establecimiento de políticas de salud tendientes a mejorar la provisión de esta importante herramienta terapéutica, nos propusimos evaluar el efecto de la leucorreducción en concentrados de GRs para transfusión. En este trabajo analizamos el efecto del almacenamiento en el estado de la membrana de los GRs, evaluando cambios en los lípidos y proteínas de la membrana y el citoesqueleto, con especial énfasis en las modificaciones oxidativas. Analizamos el contenido de alfa-tocoferol en la membrana de los GRs como un reflejo de su estado oxidativo y encontramos una leve disminución con el tiempo de almacenamiento, lo que indica una baja peroxidación lipídica. También estudiamos la fragmentación de la banda 3 del intercambiador de aniones cloruro/bicarbonato, la principal proteína de membrana de los GRs, la cual aumentó con el tiempo de almacenamiento. Finalmente, analizamos las proteínas de la membrana mediante proteómica, comparando las diferentes condiciones y el tiempo de almacenamiento. Aunque encontramos modificaciones oxidativas en diferentes proteínas, no se observaron diferencias con el tiempo de almacenamiento. No se observaron diferencias entre los GRs regulares y los leucorreducidos, lo que sugiere que los leucocitos afectan a los GRs no mediante la oxidación de biomoléculas, sino probablemente al aumentar la inmunorreactividad. Esto está respaldado por los resultados de nuestro grupo de investigación, que encontró concentraciones más altas de inmunoglobulinas e IL-1b en sobrenadantes de muestras no leucorreducidas y su capacidad para activar macrófagos en cultivo.

¿Es capaz el dominio C-terminal de UreA de aumentar la endocitosis de AzgA?

Scalese, S; Ramón, A; Sanguinetti, M.

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

Un aspecto importante del mantenimiento de la homeostasis celular y las respuestas al estrés es la regulación de la composición de los transportadores de membrana plasmática. Los mecanismos generales que controlan este proceso están altamente conservados entre los organismos eucariotas e involucran tanto la regulación transcripcional como la regulación del tráfico intracelular a través de la modulación del equilibrio de secreción, reciclaje y degradación de transportadores en respuesta a cambios en el entorno extracelular. La remoción selectiva de transportadores, mediada por un proceso de endocitosis (el cual requiere de la ubiquitinación de residuos de lisina), es uno de los más importantes mecanismos de regulación, ya que permite una rápida adaptación de las células a cambios en el ambiente. En el hongo ascomicete *Aspergillus nidulans*, la ubiquitinación de los transportadores es realizada por una ubiquitin-ligasa denominada HulaA, altamente conservada en hongos. HulaA reconoce motivos PPxY en sus proteínas blanco. No obstante, la mayoría de los transportadores de membrana carecen de este motivo, lo que hace necesaria la participación de proteínas adaptadoras llamadas α -arrestinas, que contienen dichos motivos. El modelo actual propone que las α -arrestinas reconocen parches ácidos en los extremos citosólicos de los transportadores, próximos a las lisinas a ubiquitinar, para luego ser reconocidos por las ubiquitin-ligasas.

En este trabajo pretendemos aportar al conocimiento de estos mecanismos de regulación, utilizando como modelo UreA, el transportador de urea de *A. nidulans*. Nuestro grupo de investigación ha identificado elementos en *trans* (e.g. ubiquitin-ligasa HulaA y un adaptador para ésta, ArtA) que están involucrados en el proceso de degradación de UreA mediado por endocitosis, así como elementos en *cis* (lisinas candidatas a ser ubiquitinadas y un parche ácido de potencial interacción con ArtA) presentes en el dominio C-terminal del transportador. Con respecto al posible sitio de unión a la arrestina ArtA, no podemos descartar la posibilidad de que la secuencia identificada pueda formar parte de un motivo tridimensional, interactuando con otras partes de la molécula de UreA. Para verificar esto, en este trabajo nos propusimos fusionar la región C-terminal de UreA a la región C-terminal de AzgA, un transportador de purinas, prácticamente insensible a la endocitosis inducida por amonio. Para ello generamos las quimeras AzgA::Ct-UreA::GFP y AzgA::Ct-UreA(m)::GFP (versión mutada en el parche ácido) para dilucidar si el dominio C-terminal de UreA es capaz, por sí solo, de inducir la internalización endocítica y posterior degradación de AzgA en presencia de amonio.

Curcumina como modulador de la proteostasis: impacto en cultivos de células de Schwann Trembler-J, modelo murino de CMT1E

Lucia Vázquez Alberdi¹; Miguel Calero², Alejandra Kun^{1,3}

¹Laboratorio de Biología Celular del Sistema Nervioso Periférico, Departamento de Proteínas y Ácidos Nucleicos, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Uruguay; lvazquez@iibce.edu.uy. ²Unidad de Encefalopatías Espongiformes, UFIEC, CIBERNED, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, España; mcalero@isciii.es. ³Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, UdelaR, Uruguay; akun@fcien.edu.uy

La principal neuropatía periférica hereditaria humana (Charcot-Marie-Tooth, CMT) se manifiesta en un progresivo déficit funcional-estructural de músculos y nervios periféricos. Más del 50% de todas las CMTs están asociadas con alteraciones en *pmp22*. Su traducción produce una proteína (PMP22), que se expresa mayormente en la mielina compacta de la célula de Schwann (CS). La variante CMT1E, representa un grupo de mielinopatías portadoras de micromutaciones en *pmp22*. El modelo murino Trembler-J (TrJ), presenta una mutación espontánea en *pmp22*, idéntica a una familia CMT1E humana. Ésta impide la correcta inserción de PMP22 en la membrana, generando agregados citoplasmáticos que dificultan el tráfico intracelular y bloquean las vías de detoxificación celular. En este contexto la estimulación de la proteostasis hacia procesos de degradación, parece ser una alternativa para disminuir el volumen de proteína agregada; siendo el eje PI3K/AKT/mTOR, la vía autofágica, y las chaperonas citosólicas; puntos claves para de análisis.

Estas vías se pueden regular con miméticos de restricción calórica, siendo un ejemplo el compuesto natural Curcumina, polifenol extraído de *Cúrcuma longa*. Este actúa de manera dosis y tiempo-dependiente: bajas dosis se relacionan con efectos antiinflamatorios, antioxidantes y neuroprotectores; pero a altas dosis es utilizada por su acción antitumoral. Debido a su carácter fuertemente hidrofóbico, la Curcumina suele solubilizarse en compuestos orgánicos (etanol y DMSO). Recientemente hemos informado los efectos inesperados de ambos vehículos sobre la viabilidad de cultivos primarios de CS de ratones sanos (Wt) y TrJ.

El uso de nanopartículas como sistemas de administración se ha convertido en una estrategia alternativa exitosa para diversas moléculas. Particularmente, el uso de nanopartículas de Polidopamina (PDA) ha sido señalado por su versatilidad para funcionalizar superficies y por su capacidad para vehiculizar compuestos.

Así, sintetizamos PDA y la cargamos con Curcumina (Curc-PDA) sin utilizar solventes orgánicos, para luego aplicarla a bajas dosis (0,1 μ M de curcumina) a cultivos de CS en ratones Wt y TrJ durante 5 días. Hacia el final de tratamiento, se observó un incremento de la viabilidad y la proliferación en ambos genotipos, en comparación a los cultivos tratados con PDA. Evaluamos la expresión de AKT, mTOR, HDAC6 y HSF1, encontrando en general que los valores tienden a nivelarse entre genotipos, pero HDAC6 y mTOR presentan diferencias con Curc-PDA, siendo mayor la expresión en TrJ. Estos resultados parecen indicar una inhibición de la macroautofagia, pero una activación de la autofagia mediada por chaperonas, como mecanismo de acción activado por la Curcumina.

La cadena de transporte de electrones dependiente de rodoquinona es esencial para la supervivencia de *C. elegans* en entornos de sulfuro de hidrógeno

Laura Romanelli-Cedrez¹, Franco Vairoletti^{1,2}, Gustavo Salinas^{1,3}

¹Laboratorio de Biología de Gusanos, Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay. ²Laboratorio de Química Farmacéutica, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. ³Departamento de Biociencias, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

En los animales, la principal vía de desintoxicación del sulfuro (H_2S) implica su conversión en formas menos tóxicas a través de una vía de oxidación mitocondrial. La primera enzima de esta vía es la sulfuro-quinona oxidorreductasa (SQRD/SQOR), que cataliza la oxidación del sulfuro y la reducción de la ubiquinona (UQ). Dado que el H_2S inhibe la citocromo c oxidasa (CitC-ox), y así la regeneración de UQ, esta vía puede verse comprometida en altas concentraciones de H_2S .

El nematodo de vida libre *C. elegans* se alimenta de bacterias y en su entorno natural puede enfrentar altas concentraciones de sulfuro. Este organismo tiene una cadena de transporte de electrones (CTE) alternativa que utiliza rodoquinona (RQ) como transportador de electrones lipídicos y fumarato como aceptor final de electrones. Este trabajo demuestra que la RQ es esencial para la supervivencia en sulfuro. Los animales sin RQ (*kynu-1*) no pueden sobrevivir a altas concentraciones de H_2S , mientras que los animales sin UQ (*clk-1*) muestran recuperación. Adicionalmente, describimos que en *C. elegans* el gen Y9C9A.16 (o *sqrd-2*), descrito previamente como pseudogen, estaría involucrado en la respuesta al sulfuro. Nuestros resultados destacan que SQRD-1 y SQRD-2 utilizan ambas benzoquinonas y que la CTE dependiente de RQ confiere una ventaja clave (regeneración de RQ) sobre la UQ en condiciones ricas en sulfuro. *C. elegans* también se enfrenta al cianuro, otro inhibidor de la CitC-ox, cuya desintoxicación conduce a la producción de H_2S , a través de CYSL-2. Nuestro estudio revela que la RQ retrasa la muerte por parte de la bacteria productora de HCN *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

Recientemente, estamos estudiando una vía de respuesta al H_2S de *C. elegans* independiente de la SQRD y su relación con la RQ. Dicha vía involucra las proteínas RHY-1 y RIPS-1 (*RHY-1-interacting protein in response to sulfide*). RHY-1 tiene dos roles: i) actúa como regulador negativo del factor HIF-1 (el cual aumenta la expresión de *sqrd-1* en H_2S); ii) participa en otra vía, en la cual en presencia de H_2S , el factor de transcripción SKN-1 aumenta la expresión de *rhy-1*, el cual es necesario y suficiente para la eliminación de H_2S . Interesantemente, los gusanos dobles mutantes deficientes en RQ y RHY-1 sobreviven al sulfuro, a diferencia de los mutantes simples (deficiente en RQ el cual es sensible al H_2S y deficiente en RHY-1 el cual es resistente al H_2S).

Búsqueda de secuencias promotoras en una cepa bacteriana de origen antártico

Valentín Ordoqui, Raúl Platero, Vanesa Amarelle

Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

En nuestro Departamento estamos generando nuevos aportes al campo de la biología sintética, identificando y caracterizando nuevas partes biológicas y nuevos modelos bacterianos para su utilización en aplicaciones de biología sintética. En este contexto hemos avanzado en la caracterización de la cepa *Pseudomonas* sp. UYIF39, aislada de una muestra de la Antártida, como potencial chasis biológico. Hemos evaluado distintas herramientas moleculares, contando actualmente con una caja de herramientas (toolbox) funcional en este microorganismo. Contamos con distintos orígenes de replicación, secuencias promotoras canónicas, y genes de resistencia a antibióticos que pueden utilizarse en esta cepa, así como genes reporteros funcionales. Contamos también con el genoma secuenciado y cerrado de la cepa, y hemos avanzado en la utilización de una aproximación de TnSeq para elucidar la funcionalidad de los genes anotados, identificando genes esenciales y genes requeridos en condiciones específicas. Para continuar avanzando en el conocimiento y la caracterización de este potencial chasis bacteriano de origen antártico, nos proponemos identificar in vivo secuencias promotoras funcionales en *Pseudomonas* sp. UYIF39. Identificar y conocer qué secuencias de ADN actúan como promotores funcionales en este microorganismo aportará más elementos a la toolbox disponible. Con esta finalidad estamos utilizando una aproximación de “trampa de promotores”, la cual se basa en la utilización de un vector plasmídico conteniendo un gen reportero carente de secuencia promotora, y por ende no se expresa. En este sistema, clonaremos secuencias de ADN_g de la cepa UYIF39 corriente arriba del gen reportero de manera que, si la secuencia introducida es reconocida por la maquinaria transcripcional, el gen reportero se expresará y detectaremos una señal. Actualmente nos encontramos construyendo la biblioteca genómica de trampa de promotores, la cual evaluaremos en distintas condiciones de cultivo de manera de identificar secuencias promotoras constitutivas, así como secuencias inducibles por distintos estímulos.

La expresión de NOX1 en células de endotelio de córnea en cultivo disminuye como consecuencia de la activación de receptores purinérgicos, en forma dependiente de PKC y CaMKII

Maira Souto¹, Francisco Castro¹, Cristian Justet¹

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

La cicatrización es un proceso complejo modulado por variedad de señales. En este contexto, diferentes autores han estudiado el efecto de los oxidantes como moléculas moduladoras o como agentes de daño tisular. En particular se ha demostrado que la formación de H₂O₂ es fundamental para la estimulación de la proliferación, migración y la quimiotaxis de diferentes tipos celulares (Lisse et al., 2017). Asimismo, otros autores demostraron que en el endotelio de córnea la actividad de la NADPH oxidasa 4 (NOX4) tiene efecto negativo sobre la transparencia y capacidad de cicatrización de la córnea. Por otra parte, se ha encontrado que como resultado directo de la lesión, se libera ATP al medio extracelular. Esta molécula actúa sobre receptores purinérgicos que promueven la formación de H₂O₂ por activación de la NADPH oxidasa dual dependiente de calcio (Van der Vliet et al., 2014).

En este trabajo se busca determinar si el incremento de calcio citosólico que ocurre de forma inmediata a la lesión, afecta la expresión de la NOX1 (dependiente de calcio). Los experimentos fueron realizados en células de endotelio de córnea de bovino (BCEC) en cultivo. Se analizó la expresión de NOX1 y NOX4 durante la cicatrización o la adición de ATP 100 µM, mediante Western blot, In-Cell Western e inmunofluorescencia. La fosfolipasa C (PLC) fue inhibida con U73122, la PKC con Ro 31-8220 y Chelerritrina, la CaMKII con KN-62.

Los estudios revelan que durante la cicatrización de BCEC en cultivo la expresión de NOX1 disminuye significativamente en el borde de la herida. Los resultados inhibiendo el incremento temprano de calcio, inhibiendo la PKC o la CaMKII muestran que la expresión de NOX1 aumenta hasta valores similares al control. Asimismo, la incubación con ATP, induce la disminución de la expresión de NOX1, en forma dependiente de calcio, PKC y CaMKII. Por otro lado, los análisis preliminares de la expresión de NOX4 sugieren que la proteína aumenta en el borde de la herida.

En conjunto los resultados sugieren que, en BCEC en cultivo, la señal de calcio desencadenada al inicio de la cicatrización, estimula la liberación de ATP, la activación de receptores purinérgicos y la activación de las quinasas antes mencionadas, que provocan la disminución de la expresión de NOX1. Asimismo, el aumento de NOX4 observado podría sugerir que existen diferencias en la modulación de la expresión entre estas dos proteínas.

Cambios estructurales del cilio primario en células de endotelio de córnea de bovino en cultivo durante los primeros minutos de cicatrización, rol del calcio y el peróxido de hidrógeno

Mateo Schaffner¹, Maira Souto¹, Cristian Justet¹

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

El cilio primario (CP) es un organelo único con forma de antena que se encuentra presente en la mayoría de las células eucariotas durante las fases no mitóticas. Es una cilia no móvil y está especializada en la transmisión de señales al resto de la célula. Por esta razón contiene gran variedad de receptores asociados a proteína G trimérica y mecanosensores. Frecuentemente se la ha asociado a la modulación de señales de calcio en respuesta al flujo extracelular y otros estímulos. Es de gran importancia en la regulación de la cicatrización y se ha observado que individuos con ciliopatías presentan una cicatrización defectuosa o irregular. Por otra parte, son varias las señales que modulan la cicatrización, entre ellas el incremento de calcio durante los primeros 5 min de realizada la lesión (FCW, "Fast Calcium Wave") o la formación de H₂O₂, •NO y otras especies oxidantes.

En el presente trabajo se busca determinar si el CP sufre cambios en su estructura durante los primeros minutos de realizada la lesión y el rol del calcio y H₂O₂ sobre los mismos. Los experimentos fueron realizados en células de endotelio de córnea de bovino (BCEC) en cultivo. Los cilios fueron evidenciados por inmunofluorescencia específica para tubulina acetilada y ARL13B, la FCW fue inhibida mediante incubación con U73122, inhibidor de fosfolipasa C (PLC) y se utilizó catalasa para la descomposición del H₂O₂ a nivel extracelular. Se obtuvieron imágenes por microscopía confocal y los parámetros estructurales fueron determinados utilizando la herramienta CiliaQ del ImageJ.

Nuestros resultados muestran que el CP de las células del borde de la herida se alarga significativamente ~20% y vuelve a acortarse durante los primeros 15 minutos de realizada la herida. No se logró observar diferencias significativas en otros parámetros como la curvatura, orientación o complejidad de forma. Sin embargo, en algunos experimentos se observó la aparición de fragmentos esferoides separados de los extremos, que podrían indicar un proceso de deciliación. Por otra parte, no se observaron cambios en el largo del CP en los experimentos en los de se inhibió la FCW con U73122 o se incubó con catalasa.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que el CP de las células del borde de la herida se alarga durante la cicatrización de BCEC en cultivo y que dicho proceso está relacionado con la FCW y la formación de H₂O₂.

Durante la cicatrización de células de endotelio de córnea de bovino en cultivo se forma peroxinitrito, producto de la activación de la NOS mediada por la onda lenta de calcio

¹Francisco Castro, ¹Mateo Schaffner, ¹Cristian Justet

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

Durante la cicatrización se producen dos ondas de incremento de calcio. La onda fugaz de calcio FCW (Fast Calcium Wave) y la onda lenta de calcio SCW (Slow Calcium Wave) que se inicia a la hora de generada la lesión. Se ha demostrado que la SCW depende del funcionamiento en modo reverso del intercambiador de sodio calcio (NCX). Por otra parte, se ha demostrado que durante la cicatrización se forman especies oxidantes como el H₂O₂ y el •NO que pueden modular la migración y proliferación celular.

En este trabajo se busca determinar si durante la cicatrización de células de endotelio de córnea de bovino (BCEC) en cultivo se forma peroxinitrito (ONOO⁻) y el rol de las señales de calcio sobre este proceso. Para detectar la formación de ONOO⁻ se utilizó la sonda Fluoresceína Boronato (FI-B). Se intentó evidenciar la formación de •NO utilizando la sonda DAF-2 DA sin embargo esta generaba una señal artefactual no específica. Se inhibieron las NOS (NO sintasas) por incubación con L-NAME o amino-metil piridina (AMPyr), la FCW con U73122 (inhibidor de la fosfolipasa C) y la SCW con SN-6 o KB-R7943 (inhibidores del NCX).

El uso de la sonda FI-B permitió evidenciar, tanto por microscopía de epifluorescencia como por fluorimetría, la formación de ONOO⁻. Este fenómeno resultó medible desde dos horas de realizada la lesión en adelante. Se constató que la inhibición de la FCW no provoca cambios en la señal de FI-B. Sin embargo, la inhibición de la SCW provoca una disminución significativa de la señal. Asimismo, la inhibición de las NOS también provocó la disminución de la formación de ONOO⁻.

En conjunto, los resultados sugieren que la SCW induce la formación de ONOO⁻ en forma dependiente de la actividad de la NOS.

Identificación integrada de diversas alteraciones genómicas accionables en pan-cáncer mediante NGS

Agustina Pons¹, Santiago Chávez¹, Adriana Della Valle², José Roberto Sotelo-Silveira^{3,4}, María Ana Duhagon^{1,5}, Cecilia Mathó^{1,3}

¹Unidad Académica de Genética, Facultad de Medicina, UdelaR, Montevideo, Uruguay. ² Centro de Oncogenética Uruguayo, Banco de Tumores, Hospital Central de Las Fuerzas Armadas, Montevideo, Uruguay. ³ Departamento de Genómica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, MEC, Montevideo, Uruguay. ⁴ Sección Biología Celular, Facultad de Ciencias, UdelaR, Montevideo, Uruguay. ⁵Sección Genómica Funcional, Facultad de Ciencias, UdelaR, Montevideo, Uruguay.

En Uruguay, el cáncer es la principal causa de muerte en personas menores de 70 años. La oncología está en transformación con el avance de diagnósticos más precisos y nuevos fármacos. Esta "Medicina de Precisión" utiliza la genómica de los tumores para elegir tratamientos personalizados. Actualmente, los análisis genómicos personalizados en Uruguay suelen ser costosos y lentos debido a la fragmentación del proceso en varios laboratorios, lo que dificulta la estandarización del diagnóstico y la decisión terapéutica. El objetivo fue desarrollar un test integrado que, a partir de una única muestra de tumor embebido en parafina (FFPE), permita secuenciar genes con mutaciones accionables y detectar inestabilidad de microsatélites (MSI) utilizando Next Generation Sequencing (NGS). Se seleccionaron 17 genes y se diseñó un panel con cebadores específicos para amplificarlos mediante PCR. Además, se amplificaron 76 regiones para estudiar inestabilidad de microsatélites. Diferentes cantidades de ambos productos de PCR se combinaron para generar una única librería de secuenciación por muestra. Se extrajo ADN genómico de las muestras de parafina (FFPE), que fue cuantificado con absorbancia 260/280 nm (NanoDrop) y con sondas específicas para ADN en un fluoróforo (Qubit). Se crearon librerías de secuenciación AmpliSeq (IonTorrent), cuantificadas con Qubit y Bioanalyzer, y luego se combinaron de manera equimolar para la secuenciación en el Ion GeneStudio™ S5 System del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

El análisis bioinformático incluyó la detección de variantes accionables y la determinación de MSI. Para probar el flujo de trabajo, se secuenciaron muestras comerciales de tumores con mutaciones conocidas y, finalmente, muestras de tumores de pacientes en FFPE del Banco de Tumores del Hospital Central de Las Fuerzas Armadas.

Validamos las condiciones de amplificación para detectar mutaciones en genes del panel y la inestabilidad de microsatélites en las muestras analizadas. Se identificaron mutaciones en muestras tumorales de diferentes antigüedades. Estos resultados destacan el potencial del test como herramienta útil para el análisis integral de muestras tumorales mediante NGS.

Estructura y dinámica del microbioma intestinal y la respuesta a la inmunoterapia de puntos de control en cáncer de riñón

Peñalba, Florencia¹; Parada, Andrés¹; Elgul, Nabila¹; Pittini, Álvaro²; Carlos, Meyer³; Cawen, María Laura³; Ferrari, Aracely³; Laureiro, Elena³; Alonso, María Isabel³; Malvasio, Silvina³; Staton, Catherine⁴; Berois, Nora²; Osinaga, Eduardo²; Iraola, Gregorio¹; **Riera, Nadia¹**

¹Laboratorio de Genómica Microbiana, Institut Pasteur de Montevideo. ²Laboratorio de Glicobiología e Inmunología Tumoral, Institut Pasteur de Montevideo. ³Departamento de Oncología, Centro Asistencial del Sindicato Médico del Uruguay. ⁴Teagasc Food Research Centre, Cork, Irlanda

En Uruguay se diagnostican aproximadamente 375 casos nuevos de cáncer de riñón por año, ubicándose en el noveno lugar en incidencia en hombres y onceavo en mujeres. El fondo nacional de recursos estima que esta enfermedad cobra 210 muertes anualmente. Las terapias dependen de la edad y el estado de salud del paciente así como la severidad de la enfermedad. En los últimos años, el uso de la inmunoterapia por puntos de control aparece como una nueva avenida de tratamiento para el cáncer de riñón. El éxito de esta terapia, sin embargo, es altamente variable y difícil de predecir. El conjunto de microorganismos que habitan nuestro intestino, llamado microbiota intestinal, tiene la capacidad de modular el sistema inmune del hospedero y juega un papel relevante en la respuesta a la inmunoterapia. De hecho, el uso de antibióticos previo al comienzo de esta terapia está asociado a peor respuesta. Hasta ahora, el estudio del rol del microbioma intestinal se ha enfocado mayoritariamente en las bacterias que habitan el intestino y no en otros componentes del microbioma.

Utilizando metagenómica *shotgun* de alta profundidad caracterizamos el microbioma intestinal de dos pacientes con cáncer de riñón. A partir de estos resultados, evidenciamos cómo los elementos genéticos móviles, como plásmidos y bacteriófagos, actúan en forma dinámica en el intestino moldeando las comunidades microbianas presentes. Uno de estos pacientes fue inicialmente tratado con antibióticos previo a comenzar la inmunoterapia mientras que el otro no. Si bien ambos pacientes muestran una respuesta favorable, los genes de resistencia a antibióticos demuestran dinámicas diferentes en ambos.

Las bacterias presentes en el intestino tienen la capacidad de producir metabolitos que interfieren con el hospedero y modular así el sistema inmune. Utilizando metabolómica cuantificamos los ácidos grasos de cadena corta de la materia fecal en dos momentos diferentes. Ambos pacientes muestran mayor cantidad de ácidos grasos de cadena corta totales, y se observa un aumento en el valerato que ha sido reportado relevante para la función renal. Los resultados obtenidos pueden guiar el desarrollo de nuevas herramientas de predicción de respuesta para esta enfermedad.

Single cell RNA-seq para comprender la heterogeneidad en la expresión de genes de proteínas de superficie en poblaciones de *Trypanosoma cruzi*

Lucas Inchausti^{1,2}, Lucía Bilbao^{1,2}, Joaquín Garat³, Vanina A. Campo⁴, José Sotelo-Silveira^{3,5}, Javier De Gaudenzi⁴, Pablo Smircich^{1,2}

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

Trypanosoma cruzi, el agente causante de la enfermedad de Chagas, representa un desafío significativo para la salud pública en Latinoamérica, afectando a aproximadamente 10 millones de personas, con millones más en riesgo de infección. Este protozoario exhibe características únicas, especialmente en su expresión génica, lo que plantea retos específicos para combatir la enfermedad.

Los genes de *T. cruzi* están organizados en policistrones, que suelen transcribirse de manera constitutiva, aunque muestran niveles variables en el estado estacionario de sus transcritos, lo que sugiere mecanismos de regulación post-transcripcional. Los estudios transcriptómicos a lo largo de su ciclo de vida han revelado patrones de expresión diferencial que subrayan la complejidad de sus mecanismos de regulación génica.

El ciclo de vida de *T. cruzi* implica transiciones entre las formas epimastigota, tripomastigota metacíclico, amastigota y tripomastigota sanguíneo, cada una de las cuales se caracteriza por cambios morfológicos y moleculares significativos, adaptados a diferentes hospedadores y ambientes. A diferencia de otros tripanosomátidos, *T. cruzi* carece de mecanismos de variación antigénica, pero depende de diversas proteínas de superficie codificadas por grandes familias multigénicas, como trans-sialidasas, mucinas, MASP y GP63, cruciales para su infectividad y evasión del sistema inmune.

A pesar de la extensa investigación sobre los perfiles de expresión génica a nivel poblacional, la variabilidad intra-poblacional en la expresión de proteínas de superficie sigue siendo poco comprendida. Los avances recientes de *single cell RNA-seq* ofrecen una vía prometedora para descubrir mecanismos moleculares sutiles relevantes para la patogénesis, como se ha demostrado en parásitos relacionados como *P. falciparum* y *T. brucei*.

Este proyecto tiene como objetivo dilucidar la heterogeneidad transcriptómica de parásitos de *T. cruzi* en la forma tripomastigota utilizando datos de *single cell RNA-seq*. En particular, al centrarnos en el estudio de la diversidad de expresión de genes de proteínas de superficie, esta investigación busca profundizar en la comprensión de la biología celular y las estrategias de infección de *T. cruzi*.

***In Silico* Study of putative UFGTs in *Vitis vinifera* L. cv. Tannat Associated with Fruit Color Development**

Jorge Cantero,¹ Cecilia Da Silva,² Margot Paulino¹

¹Área Bioinformática, Departamento de Experimentación y Teoría de la Estructura de la Materia, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. ²Departamento Sistemas Agrarios y Paisajes Culturales, Centro Universitario Regional Este (CURE), Universidad de la República, Rocha, Uruguay.

Tannat grapes (*Vitis vinifera* L. cv. Tannat) are prized for producing high-quality wines with a striking deep purple color, a characteristic attributed to their unusually high concentrations of anthocyanins, a subgroup of polyphenolic compounds, including malvidin, delphinidin, and petunidin monoglucosides. The present research investigates the relationship between gene variants in Tannat, the structure and function of the enzymes they produce, and how these factors influence anthocyanin accumulation and, consequently, grape color development. The central enzyme in this study is anthocyanidin-3-O-glucosyltransferase (UFGT), which plays a pivotal role in the formation of glucosylated anthocyanins—precursors to the pigmented polymers that give grape skins their intense color. By identifying eight UFGT variants through sequence homology, we filtered these potential UFGTs by assessing their gene expression patterns and correlating them with key stages of grape color development. Of these, four variants were distinct from those found in *Pinot Noir* PN40024 clone (*V. vinifera* reference genome), featuring point mutations in regions likely to affect the enzyme's catalytic efficiency. These mutations could alter anthocyanin synthesis, thereby impacting the intensity and quality of the grape's color. To explore the structural and functional differences among these UFGT variants, molecular models were generated using the threading method, followed by 100 ns molecular dynamics simulations in NAMD3, employing the Amber ff19SB force field under periodic conditions with explicit solvent. Each UFGT variant was simulated in complex with UTP-Glucose and four different anthocyanins: malvidin, petunidin, peonidin, delphinidin, cyanidin and a flavonol, quercetin. The modeled structures revealed two symmetrical Rossmann-like fold parallel domains for UFGTs. The binding sites for both, the substrate and the sugar donor (UDP-Glu), were located at the domain's interface, involving shared amino acids from both sides. Notably, the simulations indicated selective binding capabilities for each UFGT variant, suggesting a degree of specificity in their glucosylation targets. Analysis of the interatomic distances between the UTP donor and anthocyanin acceptors aligns with a glucose transfer reaction, further supporting the observed catalytic behavior. These findings pave the way for further investigation using quantum mechanics/molecular mechanics (QMMM) simulations to better characterize the catalytic efficiency of these UFGT variants, deepening our understanding of the molecular processes that contribute to the vibrant color of Tannat grapes.

Perfiles de pequeños RNAs no codificantes en mujeres con Lupus Eritematoso Sistémico

Sofía Dacosta¹, Maria Rosa García-Silva¹, Tamara Fernández², Sergio Bianchi^{1,3}.

¹Laboratorio de Genómica Funcional, Institut Pasteur de Montevideo. ²Unidad de Bioinformática, Institut Pasteur de Montevideo. ³Laboratorio de Biomarcadores Moleculares, Departamento de Fisiopatología, Hospital de Clínicas, Universidad de la República.

La pérdida de la autotolerancia por parte del sistema inmune genera respuestas aberrantes contra el propio organismo, lo que está en la base patogénica de las enfermedades autoinmunes (EA). En particular, el Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune sistémica, que presenta problemas diagnósticos importantes y aún no tiene un tratamiento curativo. El transcriptoma humano incluye una amplia gama de ácidos ribonucleicos que no codifican para proteínas (ncRNAs). Estas moléculas, o sus fragmentos, han sido descritos a nivel extracelular como moléculas circulantes en el plasma. Desde entonces, la comunidad científica se ha interesado en la detección de estos ncRNAs en distintos biofluidos, con la finalidad de establecer a estas moléculas como analitos identificables en biopsias líquidas mínimamente invasivas, ya que podrían facilitar el diagnóstico, seguimiento y predicción la evolución de distintas enfermedades. Distintos ncRNAs han sido reportados alterados en la circulación de pacientes con LES, y por lo tanto han sido propuestos como prometedores biomarcadores de la enfermedad a través de su detección en biopsias líquidas. En este trabajo se secuenciaron pequeños RNAs de muestras de plasma de 3 pacientes con LES en actividad, 3 pacientes con LES en remisión y 3 controles sanas. Los resultados obtenidos constituyen evidencia preliminar de que las pacientes con LES en actividad comparten algunas características en cuanto a la composición de miRNAs en plasma. Estos resultados sugieren la existencia de un perfil de miRNAs asociados a la actividad del LES. Sin embargo, no todos tienen características que los posicionen como buenos candidatos a ser un biomarcador de la enfermedad. En este sentido se plantea como un resultado interesante la disminución de miR-150 y miR-106b en el plasma de las pacientes cursando un periodo de actividad. Se trata de miRNAs específicos de linfocitos, y sus fluctuaciones han sido asociadas a procesos relevantes para la patología del LES, como lo es la pérdida de la autotolerancia. Estos resultados son un punto de partida para futuros ensayos en los que se buscará validar lo observado y continuar explorando el potencial de miRNAs como biomarcadores en biopsias líquidas mínimamente invasivas.

Análisis bioinformático de pequeños ARNs derivados de los vault ARNs humanos

Jake Sheppard¹, María Ana Duhagon^{1,2}, Rafael Fort^{1,3}.

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

Pese a que la fracción codificante del genoma protagoniza nuestra búsqueda de comprender a los complejos sistemas biológicos, la vasta mayoría de nuestros genes se transcriben como ARNs no codificantes (ncRNA), clasificados en familias según su tamaño y función. Ellos regulan la expresión génica en múltiples niveles además de participar en un amplio repertorio de otros procesos. Entre los ARNs no codificantes pequeños (sncRNA) encontramos la clase de los microRNAs. Estas moléculas se asocian a las proteínas Argonauta (AGO) del complejo RISC para modular la expresión de ARNs mensajeros (mRNA) de forma post-transcripcional, y su desregulación cumple un rol fundamental en la iniciación y progresión del cáncer y otras patologías.

Los vault ARNs (vtRNAs) son ncRNAs de 88-102nt transcritos por la ARNpol III. En humanos hay cuatro, distribuidos entre dos loci. En conjunto con algunas proteínas, conforman un organelo ribonucleoproteico que es ubicuo y abundante en eucariotas cuya función es elusiva: la partícula vault. Sin embargo, la vasta mayoría de los vtRNAs no integran a la partícula, sugiriendo que cumplen otras funciones en la célula.

Inicialmente descartados como productos de degradación, actualmente se reconocen sncRNAs derivados de familias como los tRNAs, rRNAs, y otras. Entre otras funciones, se propone para ellos roles novedosos en cáncer, enfermedades neurodegenerativas y otras patologías. Se suman a esta lista los vault ARNs pequeños (svtRNAs).

Nuestro grupo previamente reportó la existencia de dos fragmentos derivados del vtRNA2-1 cuya expresión se regula diferencialmente entre la condición normal y tumoral en cáncer de próstata. Motivados por estos antecedentes, y por la ausencia de estudios de expresión global de los svtRNAs en líneas celulares humanas, desarrollamos un pipeline de anotación computacional para estudiar su expresión en datos transcriptómicos de sncRNAs.

Generamos un catálogo de los fragmentos con mejor representación producidos a partir del procesamiento de vtRNAs en muestras de smallRNA-seq públicamente disponibles de distinto origen tisular y en distintas condiciones. Validamos nuestro pipeline al observar la presencia de los svtRNAs y otros sncRNAs previamente identificados. Luego, con el fin de ponderar la posibilidad de un rol tipo microRNA para svtRNAs, estudiamos su presencia en datos de asociación a proteínas AGO disponibles en la literatura. Los resultados indican que algunos fragmentos están asociados a AGO, lo que apoya la posibilidad de que participen de la represión de ARNm mediada por RISC.

Stop Making Sense: uso de codones y aminoácidos en virus con códigos genéticos alternativos

Diego Simón^{1,2,3}, Pilar Moreno^{1,2,4}, Gonzalo Moratorio^{1,2,4}, Héctor Musto³

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

Aunque el código genético es una característica compartida por todos los organismos, el código genético universal presenta ligeras variaciones. Los códigos genéticos alternativos son adaptaciones de uno o varios codones, típicamente codones de terminación (*stop*). Los codones *stop* canónicos son UAA, UAG y UGA. En eucariotas, por ejemplo, las algas dasicladáceas y algunos protistas como los ciliados y las hexamitas, utilizan exclusivamente UGA como codón de terminación, mientras que UAA y UAG codifican glutamina. La gran mayoría de los procariotas, por su parte, utilizan un código genético idéntico al estándar, con la diferencia de algunas alternativas de codones de inicio de traducción mejor documentadas. *Mycoplasma* y *Spiroplasma* son algunas de las excepciones, dado que el codón UGA (que suele ser un codón *stop*) se ha reprogramado para codificar triptófano. El objetivo de este estudio fue describir algunos patrones composicionales que emergen de la interacción de los virus con sus hospederos y, más particularmente, su dependencia de la maquinaria de traducción del hospedero. En general, los virus utilizan el código genético canónico, como en la mayoría de los genomas celulares. Los codones *stop* co-optados en los diferentes códigos alternativos se utilizan con alta frecuencia en los virus que infectan hospederos que emplean dichos códigos. También describimos la distribución de frecuencias de codones y de aminoácidos según los códigos genéticos presentes en los genomas virales disponibles. Observamos que, aunque los virus muestran adaptación y especificidad en su uso de codones según el código genético del hospedero, esto no se traduce necesariamente en una mayor frecuencia de los aminoácidos codificados por los codones co-optados.

Desarrollo y evaluación pre-clínica de una vacuna oral contra SARS-CoV-2

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

Unidad Académica de Desarrollo Biotecnológico / Instituto de Higiene / UDELAR

Desde el comienzo de la pandemia por el virus SARS-CoV-2, se han realizado numerosos esfuerzos para desarrollar vacunas eficaces para controlar la enfermedad. La mayoría de estas vacunas de administración parenteral potencian una fuerte respuesta inmune sistémica, pero no así a nivel de mucosas, la cual es esencial para evitar la entrada y transmisión del virus. En el presente trabajo se propuso diseñar, construir y evaluar una vacuna oral contra SARS-CoV-2, utilizando *Salmonella* Typhimurium LVR01 como vector, la cual generaría una fuerte respuesta a nivel de mucosas.

Se desarrollaron dos estrategias diferentes presentando como antígeno dos copias del dominio de unión al receptor de la proteína Spike del SARS-CoV-2 (RBD) en tándem. La primera estrategia fusiona el antígeno con el fragmento C de la toxina tetánica (TetC) para aumentar la inmunogenicidad, mientras que la segunda lo fusiona a SseJ, una proteína del sistema de secreción tipo 3 de la isla de patogenicidad SPI2 de *Salmonella*, este sistema es necesario para la infección sistémica del patógeno. La experiencia previa con proteínas heterólogas de otros patógenos sugiere que la primera estrategia puede inducir una fuerte respuesta de IgA en mucosas, mientras que la segunda se ha demostrado que un antígeno fusionado a SseJ es translocado por *Salmonella* a células eucariotas y provoca la generación de anticuerpos específicos en modelos murinos. Cabe mencionar que los prototipos de vacunas basados en *Salmonella* se caracterizan además por inducir fuertes respuestas de anticuerpos sistémicos y de células Th1.

Se evaluaron ambas construcciones, se determinó estabilidad plasmídica, expresión de ARNm y de proteínas de fusión. Se realizaron ensayos de seguridad e inmunogenicidad por dos vías, oral e intravenosa, mostrando inesperadamente una baja respuesta inmune.

Se plantearon hipótesis para explicar estos hallazgos: (i) *Salmonella* podría tener dificultades para expresar los antígenos debido al gran tamaño de las proteínas de fusión resultantes; (ii) en condiciones *in vivo* los plásmidos que codifican los antígenos vacunales son inestables, y (iii) podría haber problemas en el plegamiento tridimensional de las proteínas, lo que podría resultar en epítopes que no son reconocidos por el sistema inmune. En base a esto, se decidió construir y evaluar dos estrategias nuevas, similares a las ensayadas, pero expresando una sola copia del RBD, lo que podría reducir el tamaño de los antígenos, mejorar la estabilidad plasmídica y conformación tridimensional, esto último según análisis *in silico* de biología estructural entre las diferentes estrategias.

Elucidación del mecanismo de acción de compuestos con actividad anti-tripanosomatídea

Chaves Suarez, Mariana^{1,2,3}; Corvo Mautone, Ilena¹; Perez Diaz, Leticia²; Rodriguez Osorio, Nélida³.

¹Laboratorio de I+D de Moléculas Bioactivas, Departamento de Ciencias/Centro Universitario Regional Litoral Norte/Universidad de la República. ²Laboratorio de Interacciones Moleculares/Facultad de Ciencias/Universidad de la República. ³Unidad de Genómica y Bioinformática, Departamento de Ciencias Biológicas/Centro Universitario Regional Litoral Norte /Universidad de la República

Las Enfermedades Tropicales Olvidadas son infecciones que afectan mayoritariamente poblaciones que viven en situación de pobreza, donde las condiciones higiénicas y sanitarias son carenciales. Dentro de los agentes causales de estas enfermedades están los protozoarios parásitos *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania* spp., causantes de la Enfermedad de Chagas y la Leishmaniasis, respectivamente, enfermedades prevalentes en América Latina. Debido a que el tratamiento farmacológico para las infecciones causadas por estos parásitos se ha desarrollado hace muchos años y presenta efectos secundarios y toxicidad es importante continuar desarrollando nuevos fármacos para el tratamiento de dichas enfermedades. En tal sentido, el Laboratorio de I+D de Moléculas Bioactivas del CENUR LN ha sintetizado y evaluado diferentes compuestos con potente actividad contra *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania* spp, con capacidad de matar los parásitos *in vitro* y reducir la carga parasitaria en modelos animales *in vivo*. De los compuestos diseñados actualmente estamos trabajando con dos compuestos que resultaron hits luego de la evaluación de actividad, selectividad, citotoxicidad y mutagenicidad. Dada la cercanía filogenética entre *T. cruzi*, *Leishmania* spp. y *T. brucei* es posible que los compuestos puedan tener actividad antiparasitaria frente a los 3 kinetoplastidos.

Los compuestos ensayados han demostrado mayor actividad que Nfx, Bnz, y Miltefosine en *T. cruzi* y *Leishmania*, así como también presentaron actividad sobre una cepa de *L. infantum* aislada en Uruguay. No obstante, como estos compuestos han sido identificados mediante cribados fenotípicos es importante investigar las posibles vías implicadas en el modo de acción para poder guiar la optimización de estas moléculas. Datos previos permitieron identificar genes involucrados en el mecanismo de acción de los compuestos. Para ello se emplearon librerías de ARN de interferencia de *T. brucei* (RIT-seq) y bibliotecas de cósmidos que sobreexpresan el genoma de *T. brucei* y se pudieron identificar genes asociados al mecanismo de acción de los compuestos. Para continuar con la determinación de las posibles vías implicadas en el mecanismo de acción de los compuestos se continuarán empleando estas herramientas genómicas de silenciamiento y sobreexpresión. Nos planteamos continuar con la validación individual de estos genes identificados previamente y realizar estudios transcriptómicos en *T. cruzi* como otra herramienta para la comprensión del mecanismo por el cual estos compuestos llevan a la muerte de los parásitos.

Con esta investigación se espera apuntamos a lograr identificar el mecanismo de acción de los compuestos hits identificando genes cuyos productos influyan en la acción de los compuestos (ya sea que estén vinculados con el ingreso, transporte y metabolismo de los compuestos, así como redes de proteínas o vías intracelulares que se alteran en presencia del compuesto y/o blancos moleculares que interaccionen directamente con los mismos). Este proyecto permitirá identificar y validar procesos, vías metabólicas o de señalización alteradas en presencia de los compuestos, tanto en *T. brucei* como en *T. cruzi*.

Análisis de la localización subcelular y rol de las diferentes subfamilias de amastinas de *Trypanosoma cruzi* en el proceso de infección

MA, Goyeche¹, F, Castro. L, Pérez Díaz¹

¹Sección de Genómica Funcional. Facultad de Ciencias - UdelaR

Trypanosoma cruzi es un parásito unicelular causante de la enfermedad de Chagas. Durante su ciclo de vida, este parásito alterna entre 2 hospederos, un insecto vector y un hospedero mamífero, atravesando diferentes estadios diferenciados. En el insecto se encuentran las formas epimastigota no infectiva y tripomastigota metacíclico infectiva y en el mamífero se encuentra mayoritariamente en las formas tripomastigota celular y amastigota intracelular.

Las amastinas son una familia de proteínas hidrofóbicas con 4 dominios transmembrana identificadas inicialmente en *T. cruzi* y luego en *Leishmania* donde se describieron 4 subfamilias (α -, β -, γ - y δ -amastinas) según posición genómica, estructura y evolución. En *T. cruzi* solo se encontraron β -, y δ -amastinas. A través de análisis filogenéticos, nuestro grupo identificó un tercer grupo no reportado en *T. cruzi* (ω -amastinas), con origen más ancestral. La ubicación subcelular y función de estas proteínas aún se desconoce. Mediante qRT-PCR se constataron niveles de expresión diferencial estadio específico de β -, δ - y ω -amastinas y amastinas, lo que sugiere que estas subfamilias podrían cumplir funciones diferentes en el parásito y poseer también una ubicación subcelular diferente.

Para estudiar la localización subcelular de cada una de las diferentes subfamilias de amastinas, se generaron en el laboratorio anticuerpos anti β -amastinas, anti δ -amastinas y anti ω -amastinas con las cuales se realizó inmuno localización y microscopia confocal en epimastigotas, amastigotas y tripomastigotas salvajes, obteniendo resultados que muestran una diferente localización de las diferentes subfamilias dependiendo del estadio del parásito en su ciclo de vida.

Por otro lado, para analizar el rol de las diferentes subfamilias de amastinas en la infección y persistencia se está realizando edición genómica mediante el método de CRISPR-Cas9, generándose parásitos carentes de cada uno de los 3 grupos de amastinas para estudiar función en la infección. Se diseñaron los ARNs guía para dirigir el corte por la enzima Cas9 a regiones cercanas al codón de inicio de los genes de las β -, δ - y ω -amastinas y se clonaron en el vector sgRNA/Cas9/pTREX-n. Se generaron también ADN donador, conteniendo el gen de resistencia a hygromicina flanqueado por las regiones 5' y 3' homólogas al gen de interés para cada subfamilia de amastina para sustituir estos genes por el gen de resistencia a hygromicina.

Diseño bioinformático de nuevos candidatos vacunales frente al Virus de la Diarrea Viral Bovina

Gonzalo Menafra¹, Mariana Rivera-Patron¹, Leticia Maya², Rodney Colina², María Barrandeguy³, Ingrid Merchioratto³, A. Menchaca³, Sebastián Miles¹, José A. Chabalgoity¹

¹Unidad Académica de Desarrollo Biotecnológico, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República. ²Laboratorio de Virología Molecular, Centro Universitario Regional (CENUR) Litoral Norte, Universidad de la República. ³Plataforma de Investigación en Salud Animal, Estación Experimental La Estanzuela, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Ruta 50, km 11.5, 70006 La Estanzuela.

El Virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDV) es el agente etiológico de la “Diarrea viral bovina” y la “Enfermedad de las mucosas”. Es un patógeno de distribución mundial con gran impacto económico ya que afecta la producción y reproducción de los bovinos. En Uruguay se han detectado cepas de BVDV-1a, BVDV-1i y BVDV-2b, siendo BVDV-1a el subtipo más predominante. Las vacunas contra BVDV de aplicación en Uruguay son a virus inactivado, no se realizan con las cepas de circulación en Uruguay y su eficacia es menor comparado con los países de donde son originarias dichas cepas. La glicoproteína E2 es el antígeno inmunodominante de BVDV y es crucial para el ingreso del virus a la célula. E2 tiene 3 dominios y una región transmembrana, posee 374 aminoácidos, 4 glicosilaciones y 9 enlaces disulfuro. En este trabajo, diseñamos nuevos candidatos vacunales frente a BVDV usando cepas uruguayas para mejorar su efectividad. A partir de genomas de BVDV-1a de aislamientos uruguayos se adquirió la secuencia de E2, y se comparó filogenéticamente con todos los genomas completos disponibles de BVDV-1, tomando a la cepa NADL como referencia. A partir de este estudio se generó una secuencia consenso utilizando el aminoácido más abundante para cada posición aminoacídica. Luego se realizó un estudio inmunoinformático de las E2 uruguayas, NADL y la consenso, donde se analizaron los epítopes T para MHC-I y MHC-II bovinos y murinos, observándose presencia de estos epítopes para todos los MHC-II estudiados, y la mayoría de los MHC-I. También fueron analizados los epítopes B lineales y conformacionales. Aunque se observó una co-localización de las glicosilaciones con varios epítopes B, el dominio I presenta un epítipo conformacional altamente conservado que no presenta glicosilaciones, y dado que E2 se une al receptor celular mediante el dominio II, se evaluó el uso de los primeros dos dominios como candidatos vacunales. A este constructo, correspondiente a la región N-terminal de E2 lo denominamos E2N. En comparación con E2, E2N posee una mayor solubilidad y antigenicidad teórica, y mantiene epítopes T contra los mismos MHC-I y MHC-II. Además, su expresión en *E. coli* podría ser más sencilla, ya que es de menor tamaño y presenta solamente 1 glicosilación y 4 enlaces disulfuro. Actualmente estamos produciendo de forma recombinante tanto las E2 de las cepas uruguayas, la NADL y la secuencia consenso, así como la E2N, para evaluar su potencial uso como candidatos vacunales.

Aspectos bioquímicos de la hemoperoxidasa híbrida de *Trypanosoma cruzi* (APxCcP) durante la infección de células de mamíferos

Matilde Abboud^{1,2}, Vera Skafar^{1,2}, Rafael Radi^{1,2}, Lucía Piacenza^{1,2}

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

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. Para establecer la infección, el parásito debe sobrevivir al ataque nitrooxidativo de los macrófagos en respuesta a la invasión (generación de superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), óxido nítrico ($\cdot NO$) y peroxinitrito ($ONOO^-$)). *T. cruzi* posee un amplio y complejo sistema antioxidante que le permite defenderse del ataque nitrooxidativo 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. En este trabajo mostramos, mediante estudios cinéticos y determinación de productos de reacción, que la APx-CcP de *T. cruzi* reacciona eficientemente con peroxinitrito ($k = 4 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$) mediante un mecanismo de dos electrones generando compuesto tipo I ($Fe^{IV}=O, Trp233^{++}$) y NO_2^- .

A nivel celular, se ha mostrado que los parásitos que sobreexpresan APxCcP aumentan la infectividad tanto *in vitro* (macrófagos) como *in vivo* (modelo murino). Con estos antecedentes, evaluamos y profundizamos en el papel de APxCcP durante la infección de macrófagos inmunoestimulados (que expresan iNOS y por lo tanto generan peroxinitrito), así como estudiamos 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. Evaluamos el efecto de la presencia de ascorbato durante el proceso de infección a macrófagos por tripomastigotas salvajes y sobreexpresantes de APx-CcP. Resultados preliminares muestran que el agregado de ascorbato, como sustrato reductor de la APx-CcP, le conferirle al parásito mayor capacidad de detoxificación de oxidantes, y 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 cualquiera de las condiciones ensayadas, lo que indica que además el parásito podría estar utilizando su propio ascorbato ya que, a diferencia de los macrófagos, tiene capacidad de síntesis.

Investigating the Role of 1-Cys Peroxiredoxins in *Aspergillus fumigatus* Virulence: Biochemical and Structural Aspects

Maria Tereza Oliveira Batista¹; Renata Bannitz Fernandes¹; Gerardo Ferrer Sueta²; Iran Malavazi³; Andrey Fabricio Ziem Nascimento⁴; Luis Eduardo Soares Netto¹

¹Rua do Matão, trav. 14, n. 321, Butantã, CEP: 05508-090, São Paulo/SP - Brazil. Universidade de São Paulo. ²Iguá, 4225, esquina Mataojo, Malvín Norte, C.P: 11400, Montevideo - Uruguay. Universidad de la República. ³Rodovia Washington Luís, Km. 235, Monjolinho, CEP: 13.565-905, São Carlos/SP - Brazil. Universidade Federal de São Carlos. ⁴Rua Giuseppe Máximo Scolfaro, 10000, Bosque das Palmeiras, CEP: 00000-000, Campinas/SP - Brazil. Brazilian Synchrotron Light Laboratory - LNLS/CNPEM.

Invasive pulmonary aspergillosis (IPA) is a severe and often fatal lung infection caused by *Aspergillus fumigatus*, a ubiquitous mycopathogen. Recognized as the primary airborne fungal threat, *A. fumigatus* has been classified as a critical public health concern by the World Health Organization. Infection typically occurs through the inhalation of spores (conidia) into the respiratory tract, followed by the colonization of host tissue. To establish successful infections, this fungus must withstand oxidative stress imposed by the host. AfPrx1 (Afu4g08580) is a 1-Cys Peroxiredoxin (Prx) involved in *A. fumigatus* virulence, probably by reducing hydroperoxides, including H₂O₂. AfPrxC (Afu8g07130) is another 1-Cys Prx from *A. fumigatus*, is located in the mitochondria, while AfPrx1 resides in the cytosol. Our research focuses on the biochemical and structural characterization of recombinant AfPrx1 and AfPrxC, which were expressed in *E. coli* strain BL21 (DE3) at 37 °C and purified using metal affinity chromatography (IMAC) and size exclusion chromatography (SEC). Previous findings revealed the rate constants for the oxidation of AfPrx1 and AfPrxC by various hydroperoxides, which ranged from 10⁴ to 10⁷ M⁻¹ s⁻¹. In this study, we observed that the oxidized forms of AfPrx1 and AfPrxC (sulfenic acid form, Cys-SOH) are reduced by ascorbate, with second-order rate constants in the range of 10³ M⁻¹ s⁻¹, which were measured through a competitive assay with dichlorophenolindophenol (DCPIP). Mutant proteins with reactive Cys residues replaced by Ser were used as negative controls. Additionally, we successfully crystallized recombinant AfPrx1, which may enable the determination of its crystallographic structure. Crystallization trials for recombinant AfPrxC are also underway. Moreover, we are developing a redox western blot technique tailored specifically for 1-Cys proteins, employing 4-(5-methanesulfonyl-[1,2,3,4]tetrazol-1-yl)-phenol (MSTP) for thiol alkylation and 4-Acetamido-4'-maleimidylstilbene 2,2'-disulfonic acid (AMS) for subsequent analysis in cellular systems. These efforts aim to deepen our understanding of how *A. fumigatus* copes with host-induced oxidative stress during infection.

Variabilidad genética de virus Dengue tipo 1 en la región sudamericana: evolución, diversificación y su relación con estirpes vacunales.

Rodrigo Sologaistoa y Juan Cristina

Laboratorio de Virología Molecular, CIN, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

El virus Dengue (VDEN) es el agente causal de la fiebre de Dengue y de la fiebre hemorrágica de Dengue. VDEN es un importante patógeno a nivel mundial responsable por 105 millones de infecciones por año. En 2024 las infecciones por VDEN en la región sudamericana han sido aproximadamente 11 millones, así como en Uruguay se registra el mayor número de casos en décadas, contabilizado 702 a junio de 2024. VDEN es transmitido por mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. El genoma de VDEN está constituido por una sola hebra de ARN de polaridad positiva y se clasifica en cuatro serotipos de acuerdo a su antigenicidad en (VDEN1-4) con diversos genotipos en cada serotipo. Actualmente, existe una vacuna licenciada CYD-TDV (Dengvaxia®) y otra en ensayos de fase III (TetraVax-DV-TV003, TV003). La glicoproteína E es el principal componente de la cápside viral y el blanco dominante de la respuesta inmunitaria de anticuerpos contra VDEN. En estos estudios, el análisis filogenético de la proteína E de VDEN que han circulado y circulan en la región sudamericana revelan la presencia significativa de VDEN1 genotipo V desde 2016 al presente y particularmente en 2023 y 2024. Diferentes polimorfismos se observan dentro del genotipo V, con sustituciones de amino ácidos en todos los dominios de la proteína, particularmente en el dominio III responsable de la unión a moléculas receptoras en la membrana de la célula huésped. Asimismo, en este estudio se discuten las relaciones genéticas, antigénicas y estructurales de VDEN1 genotipo V aislados en la región sudamericana con el componente VDEN1 de las vacunas disponibles.

Restablecimiento del fenotipo virulento en la cepa atenuada de *Trypanosoma cruzi* C8C3*lvir* mediante la sobreexpresión de peroxirredoxinas

Damián Estrada¹, Gabriela Specker¹, Jorge González², Rafael Radi¹ y Lucía Piacenza¹

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

²Unidad Parasitología, Departamento Tecnología Médica, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Antofagasta, Chile.

La enfermedad de Chagas, causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*, sigue siendo un importante problema de salud pública. Los macrófagos residentes en la piel y el tejido submucoso, junto con los neutrófilos reclutados al sitio de invasión, forman parte de la primera línea de defensa en la respuesta inmune, cumpliendo un rol fundamental en el control de la proliferación y diseminación parasitaria a través de la fagocitosis, producción de especies reactivas y destrucción del parásito internalizado. *T. cruzi* posee un sistema antioxidante altamente eficiente en la detoxificación de especies reactivas, compuesto por una red de enzimas antioxidantes y tioles de bajo peso molecular, el cual resulta determinante para la propagación y persistencia parasitaria en los tejidos. La cepa de *T. cruzi* C8C3 aislada de humano, se ha mantenido en pasajes por ratón y de forma axénica desde su aislamiento hace más de 30 años. Los cultivos de *T. cruzi* mantenidos de forma axénica perdieron su virulencia (C8C3*lvir*) mientras que los mantenidos por pasajes en ratón presentan una alta virulencia (C8C3*hvir*). Considerando los antecedentes, ratones Balb/c se infectaron con las variantes de alta y baja virulencia. C8C3*hvir* exhibió un aumento en la parasitemia, presentando aproximadamente el doble de parásitos circulantes durante el pico de la misma. Cabe destacar, que la supervivencia de ratones infectados con C8C3*hvir* disminuyó al 20% (11 dpi), mientras que 100% de los ratones infectados con C8C3*lvir* permanecieron vivos hasta el momento de la eutanasia (25 dpi). Se analizó los niveles de enzimas antioxidantes para ambas variantes y se observó un aumento en la variante C8C3*hvir* con respecto a C8C3*lvir*. En particular, las peroxirredoxinas (PRX) citosólica (CPX) y mitocondrial (MPX), destacando el rol de estas enzimas en la virulencia y persistencia parasitaria. Mediante la transfección de epimastigotas C8C3*lvir* con el vector de expresión pTREX conteniendo la secuencia codificante de CPX se obtuvo un incremento en la expresión de 2,2 veces para la enzima de interés. Posteriormente, se infectó la línea celular de macrófagos J774A.1 (parásito: célula, 5:1) estimulados o no con LPS/IFN- γ para la inducción de la expresión de la iNOS y se evaluó la proliferación por conteo de amastigotas intracelulares (DAPI, 24 hpi). La sobreexpresión de CPX determinó un aumento de aproximadamente 2,7 veces en la proliferación tanto en cultivos estimulados como naive. Además, se infectaron cultivos de cardiomiocitos de la línea celular H9c2 y se evaluó la capacidad infectiva (24 hpi) mediante conteo de amastigotas intracelulares para parásitos salvajes (C8C3*hvir* y C8C3*lvir*) y sobreexpresantes CPX. Se observó en parásitos C8C3*lvir* sobreexpresantes de CPX la recuperación del fenotipo virulento, alcanzando niveles de proliferación similares a los observados para C8C3*hvir*. En suma, los niveles de las PRX, en particular CPX, resultan determinantes para el establecimiento de la infección, proliferación y persistencia parasitaria de *T. cruzi*.

La cadena pesada de la miosina no muscular IIA facilita distintos mecanismos de endocitosis viral

Camila Ladra¹, Matías Ponce¹, Natalia Ansin^{1, 2}, Kathia Guardado¹, María Paz García¹, Mercedes Paz^{3, 4}, Irene Ferreiro³, Gonzalo Moratorio³, Nicolás Sarute^{1, 4}

¹Laboratorio de Interacciones Virus-Célula, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay.

²Departamento de Inmunobiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. ³Laboratorio de Evolución Experimental de Virus, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay. ⁴Sección Genética Evolutiva, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Las infecciones virales representan una gran amenaza para la salud pública, con significativos costos sociales y económicos. Comprender cómo los factores celulares intrínsecos influyen en la infección es fundamental para mejorar las estrategias preventivas y terapéuticas. En estudios previos, identificamos que la proteína reguladora de señales alfa (SIRPA), un regulador negativo de la fagocitosis, limita la endocitosis de virus envueltos y que la fosforilación de sus dos motivos de inhibición basados en tirosina (ITIM) de su dominio citoplasmático es esencial para la actividad antiviral. Uno de los blancos celulares principales de la señalización inhibitoria de SIRPA durante la fagocitosis es la cadena pesada de la miosina IIA no muscular (MYH9), la cual contribuye activamente a la ingestión fagocítica y a otros procesos celulares a través de su actividad motora/contráctil.

Aquí, analizamos si MYH9 también favorece la infección viral y cómo su actividad durante la infección es regulada. Nuestros resultados muestran que la expresión de MYH9 aumenta los niveles de infección de virus que explotan distintos mecanismos endocíticos para ingresar a las células pertenecientes a diversas familias virales, incluyendo flavivirus, arenavirus, rhabdovirus, y togavirus, en células humanas y murinas. Además, demostramos que MYH9, una proteína citoplasmática, es activamente translocada a la membrana plasmática durante infecciones virales para facilitar los procesos de internalización viral y fusión virus-célula, y que la fosforilación de dos residuos de tirosina es esencial para su función en la entrada viral. Finalmente, identificamos que miembros de la familia de tirosina quinasas no receptores Src fosforilan MYH9 durante la entrada viral, lo cual podría ser explotado terapéuticamente para limitar infecciones virales en etapas tempranas.

Desarrollo de una vacuna de ARNm contra el virus Mayaro

Manuela Cardoso^{1,2,3}, Alicia Costáble^{1,2,3,4}, Mariano Dellarole⁵, 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*, que ha sido detectado principalmente en humanos en regiones tropicales del norte de Sudamérica. Los síntomas de la infección son similares a los de otras arbovirosis, como la producida por el virus chikungunya, incluyendo fiebre, dolor articular y malestar general. Aunque este virus presenta un riesgo significativo, sigue siendo subdiagnosticado y desatendido, lo que lo convierte 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 de casos autóctonos de arbovirus relacionados como el chikungunya en Uruguay, resalta la importancia de desarrollar métodos de detección eficientes y un prototipo de vacuna eficaz.

Las vacunas de ARNm han demostrado ser una tecnología revolucionaria, como se evidenció en la pandemia de COVID-19, pues su capacidad para generar respuestas inmunitarias robustas y su rapidez de producción las hace ideales para abordar amenazas emergentes. Este proyecto se centra en el diseño de una vacuna de ARNm optimizada para el virus de Mayaro. Utilizamos ingeniería genética para mejorar la eficiencia traduccional mediante la optimización del uso de codones en las proteínas antigénicas y la inclusión de regiones no traducidas (UTR) específicas. El ARNm se produce con nucleótidos modificados, un CAP en el extremo 5' y una cola de poliadeninas en el extremo 3', lo que mejora su estabilidad y capacidad de traducción.

En este trabajo diseñamos un plásmido molde para la producción del ARNm mediante una PCR de fusión. Esta PCR integra distintas secuencias clave para la transcripción *in vitro* y la traducción a través de la unión de fragmentos de ADN con regiones solapantes. El diseño del plásmido incluye un promotor para la ARN polimerasa T7, seguida de la secuencia codificante de la proteína viral de interés, junto a las UTRs seleccionadas para maximizar la estabilidad y eficiencia traduccional del ARNm. A partir de este plásmido, realizaremos la producción *in vitro* del ARN y ensayaremos su traducibilidad en cultivos celulares. Estudios previos del laboratorio utilizando estrategias similares han mostrado resultados prometedores.

Comprendiendo el rol de los nicked-tRNAs en la comunicación célula-célula

Valentina Blanco ¹, Marcos Davyt ², Zoya Ignatova ², Juan Pablo Tosar ^{1,3}

¹Laboratorio de Genómica Funcional, Institut Pasteur, Montevideo, Uruguay. ²Institute of Biochemistry and Molecular Biology, University of Hamburg, Hamburg, Germany. ³Unidad de Bioquímica Analítica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Las células liberan diversas moléculas de ARN al entorno extracelular, donde circulan en fluidos biológicos y pueden permanecer estables durante largos períodos de tiempo. El ARN extracelular (exRNA) desempeña un papel crucial en la comunicación intercelular. Inicialmente, se creía que esta comunicación ocurría principalmente a través de su encapsulación en vesículas extracelulares (EVs), que proporcionaban una protección física al ARN. Sin embargo, hemos identificado que la mayor parte del exRNA circulante no está asociado a EVs, lo que plantea grandes interrogantes sobre la estabilidad de estas moléculas en un entorno extracelular repleto de nucleasas. Nuestro equipo ha identificado que la mayoría de los exRNAs no vesiculares (nv-exRNAs) son fragmentos derivados de tRNAs (tDRs). Estos fragmentos presentan una gran estabilidad, debido a su capacidad para formar dímeros o porque, en su mayoría, corresponden a formas melladas del tRNA completo (nicked-tRNA), siendo la liberación de los fragmentos un artefacto de la extracción de ARN en laboratorio. Tanto los dímeros como los nicked-tRNAs circulan como ARN de doble cadena, lo que les confiere protección frente a la degradación por RNAsas extracelulares, otorgándoles así una gran estabilidad en el medio extracelular. En este estudio, demostramos que tanto los tRNAs como sus productos derivados son captados espontáneamente por células epiteliales humanas. Ensayos funcionales revelaron que los tRNA capturados espontáneamente no parecen cumplir su función canónica en la traducción de proteínas. Sin embargo, creemos que estas moléculas podrían estar involucradas en la comunicación celular. En este sentido, a través de análisis transcriptómicos observamos que la captación de nicked-tRNAs provoca cambios significativos en la expresión de proteínas involucradas en los mecanismos de *splicing* en las células receptoras. A partir de estos resultados, y mediante el reanálisis de los datos utilizando algoritmos diseñados para detectar variaciones en la expresión de isoformas, identificamos cambios en la isoforma de *splicing* prevalente de varias proteínas y se observaron varios ARN mensajeros con retención de intrones. Estos hallazgos posicionan a los nicked-tRNAs como mediadores potencialmente relevantes en la comunicación intercelular. Profundizar en el estudio de la comunicación celular mediada por ARNs extracelulares estables abrirá nuevas posibilidades para decodificar los mensajes que portan estas moléculas. Esto nos permitiría utilizarlas como antenas moleculares o biomarcadores en biopsias líquidas, para predecir alteraciones celulares incluso antes de la aparición de síntomas clínicos.

Identificación y Caracterización de lncRNAs en *Trypanosoma cruzi*, enfoque bioinformático para guiar estudios funcionales

Paola Sosa Basso^{1,2}, José Sotelo-Silveira^{3,4}, Beatriz Garat², María Ana Duhagon^{2,5}, Pablo Smircich^{1,2}.

1 Laboratorio de Bioinformática, Departamento de Genómica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Montevideo, Uruguay. 2 Sección Genómica Funcional, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias (UdelaR). Montevideo, Uruguay. 3 Departamento de Genómica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Montevideo, Uruguay. 4 Sección Biología Celular, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias (UdelaR). Montevideo, Uruguay. 5 Departamento de Genética, Facultad de Medicina (UdelaR). Montevideo, Uruguay.

Trypanosoma cruzi, el agente causante 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, el papel de los ARN largos no codificantes (lncRNAs) no es comprendido en *T. cruzi*. 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. Aunque las secuencias de lncRNAs evolucionan más rápidamente que las de proteínas, son más conservadas que otras regiones no codificantes. Además, pueden actuar como esponjas moleculares, interactuando y compitiendo por los factores reguladores del gen de origen. Recientemente, se han identificado lncRNAs en *T. brucei* utilizando métodos bioinformáticos aplicados a datos de secuenciación de segunda y tercera generación. Además, se ha descrito el rol funcional de un lncRNA en la diferenciación de *T. brucei*. Estos descubrimientos subrayan la necesidad de investigar los lncRNAs codificados en el genoma de *T. cruzi* y su posible relevancia funcional. Dada la importancia de los lncRNAs como reguladores de la expresión génica y su relevancia particular en organismos que dependen en gran medida de la regulación post-transcripcional, nuestro objetivo es identificar lncRNAs en *T. cruzi* y evaluar su funcionalidad potencial a través de sus patrones de expresión.

En este trabajo, desarrollamos un pipeline bioinformático para anotar los lncRNAs en *T. cruzi*, identificando cientos de estas moléculas. La mayoría muestra bajos niveles de expresión, aunque muchos alcanzan niveles comparables a los de los ARNm. Nuestro análisis de expresión diferencial reveló que numerosos lncRNAs están regulados durante el desarrollo del parásito. A pesar de la alta tasa de mutación de este tipo de moléculas, encontramos secuencias homólogas de algunos lncRNAs en tripanosomátidos relacionados, lo que sugiere una posible conservación funcional.

Con base en estos hallazgos, proponemos una lista de lncRNAs biológicamente significativos en *T. cruzi*, que podrían desempeñar roles cruciales en la regulación de la expresión génica y la diferenciación celular del parásito. Estos descubrimientos abren nuevas vías para la investigación del papel de los lncRNAs en la biología de *T. cruzi* y su potencial como objetivos para nuevas estrategias terapéuticas contra la enfermedad de Chagas.

Desarrollo de un sistema para estudiar la formación de G-quadruplex de ARN y su eventual rol en la interacción con la proteína supresora de tumores p53

Fabio Saavedra^{1*}, Catalina Barbot^{1*}, Irene Larghero Valdivia¹, Tamara Fernandez-Calero^{2,3}, Mónica Marín¹, Ricardo Ehrlich⁴, Robin Fåhrens^{5,6,7}, Ignacio López^{1,8}.

¹Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, UdelaR. ² Unidad de Bioinformática, Institut Pasteur de Montevideo. ³Departamento de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Católica del Uruguay. ⁴Institut Pasteur de Montevideo. Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas, Institut Pasteur de Montevideo, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. ⁵INSERM UMR 1131, Institut de Recherche Saint Louis, Université Paris Cité, París, Francia. ⁶Department of Medical Biosciences, Umeå University, Umeå, Suecia. ⁷RECAMO, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno, República Checa. ⁸Unidad de Biología Celular, Institut Pasteur de Montevideo.

*Contribuyeron de igual manera.

La proteína supresora de tumores p53 es esencial en el control de la homeostasis celular y la prevención del cáncer. Su función como factor de transcripción se encuentra ampliamente caracterizada. Posee dominios de unión a ADN y de transactivación que contribuyen con su capacidad de regular genes vinculados a funciones celulares vitales, actividad afectada por muchísimas mutaciones descritas en cáncer. Evidencias más recientes indican que p53 también controla la traducción de ARN mensajeros (ARNm), actividad que parece ser particularmente relevante durante la respuesta a proteínas desplegadas (UPR). La UPR engloba un conjunto de vías de señalización desencadenadas para restaurar la homeostasis del retículo endoplasmático (RE) cuando ocurre una acumulación excesiva de proteínas mal plegadas o agregadas en su lumen. Es una respuesta normal en células que producen grandes cantidades de proteínas y se encuentra alterada en patologías como diabetes, enfermedades neurodegenerativas y cáncer. En el laboratorio, tenemos evidencias que sugieren que p53 podría controlar la traducción de ciertos ARNm, algunos de los cuales tienen secuencias ricas en guaninas en sus regiones 5' no traducidas (5'UTRs). Estas regiones podrían formar G-quadruplex (G4), estructuras no canónicas de ácidos nucleicos implicadas en muchos procesos como transcripción, splicing, ensamblaje de RNPs, localización y traducción de ARNs. Nuestro objetivo es evidenciar interacciones p53-ARNm y estudiar si esas interacciones están mediadas por estructuras de tipo G4. Para eso, estamos desarrollando un modelo celular para identificar ARNm cercanos a p53 y su isoforma p47 durante la UPR junto con un sistema *in vitro* para estudiar la formación de G4 en oligos de ARN. Los ARNs cercanos a p53 y p47 se identificarán por una aproximación de marcaje con la enzima ascorbato peroxidasa APEX2 acoplado a secuenciación masiva. Para ello, construimos plásmidos que codifican p53 y p47 fusionadas en sus extremos C-terminal a APEX2. Hemos validado su patrón de expresión en células H1299 carentes de p53 y su funcionalidad determinando la expresión de algunos de sus blancos principales mediante western blot y RT-PCR en tiempo real. En paralelo, evaluamos si las secuencias ricas en guaninas encontradas en los 5'UTR de ARNm candidatos a ser regulados por p53 podrían formar G4 en contexto celular. El análisis *in silico* de estas regiones nos permitió evidenciar que varias de las secuencias tienen potencial de formar G4. A su vez, verificamos *in vitro* la formación de G4 en algunas de las secuencias analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida utilizando una sonda fluorescente específica.

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

Shaban, Paula^{1,2}; Diaz, María José¹; Garat, Beatriz¹; Sotelo-Silveira, José³; Chavez, Santiago^{1,2}; Duhagon, María Ana^{1,2}.

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

Trypanosoma cruzi es el agente etiológico de la tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas. Esta parasitosis afecta a más de 6 millones de personas a nivel mundial, focalizadas en 21 países de Latinoamérica 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. cruzi* es un protozoo parásito con un ciclo de vida complejo, donde múltiples formas alternan entre su hospedero mamífero y el insecto. Los mecanismos que gobiernan 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*. Seleccionamos grupo de genes co-regulados, para los cuales analizamos el enriquecimiento de motivos de secuencia en las regiones UTR de sus ARNm. Identificamos 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, seleccionamos el gen TcKKT14, el cual codifica para una proteína cinetocórica específica de tripanosomátidos y es el segundo gen de mayor cambio traduccional en la transición S/G1. Usando a TcKKT14 como modelo, 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 ello, 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 también para otra luciferasa que actúa de control (Renilla). Transfectamos por electroporación el vector con la secuencia 3'-UTR de TcKKT14 en cultivos de epimastigotas de *T. cruzi*. Sincronizamos los cultivos empleando hidroxurea para obtener muestras enriquecidas en las diferentes etapas del ciclo celular. Para estas, analizamos el patrón de expresión del gen reportero bajo el control de la 3'-UTR de TcKKT14. Observamos una modulación en las distintas muestras al comparar la expresión de la luciferasa Firefly, contra la luciferasa Renilla control. Nuestros resultados sugieren que la región 3'-UTR puede afectar los patrones de expresión génica durante el ciclo celular de *T. cruzi*.

Explorando el rol de los Vault RNAs en el estrés celular

Peters, Tomas¹; Castellanos, Mauricio²; Tosar, Juan Pablo²; Gimenez, Macarena; Boccaccio, Graciela¹.

¹CONICET-UBA, ²IPoM

Los ARN no codificantes representan una familia diversa de moléculas presentes en la mayoría de los eucariotas, entre los que destacan los Vault RNAs, una subclase altamente conservada. A pesar de haber sido descubiertos hace más de tres décadas, sus funciones moleculares siguen siendo enigmáticas. Inicialmente identificados como componentes de la partícula vault, una organela ribonucleoproteica implicada en el transporte nuclear, la mayoría de los Vault RNAs (~95%) existen de forma independiente, participando en múltiples procesos celulares.

En humanos, cuatro Vault RNAs son codificados en dos loci del mismo cromosoma, bajo el control de promotores tipo 2 de la ARN polimerasa III. Estos ARN son sintetizados con un extremo 5' trifosforilado, que está sujeto a modificaciones por una fosfatasa específica. Además, su corta vida media, de aproximadamente una hora, los convierte en ideales para una respuesta rápida a diversos estímulos celulares.

Estudios recientes han demostrado la implicación de los Vault RNAs en la autofagia y en la respuesta antiviral. Durante infecciones virales por influenza, herpes o Epstein-Barr, se observa un aumento significativo en los niveles de Vault RNAs, y su impacto en la respuesta celular depende de su estado de fosforilación. En nuestro laboratorio, hemos evidenciado un incremento en los niveles de Vault RNAs en respuesta al estrés celular, utilizando células en cultivo tratadas con arsenito de sodio. Para explorar el estado de fosforilación de estos ARN, realizamos ensayos con la enzima Terminator, que degrada ARN con extremos monofosforilados, revelando cambios significativos en la actividad de la fosfatasa que los desfosforila.

Este estudio proporciona nuevos conocimientos sobre los Vault RNAs, subrayando su papel en la interconexión entre la respuesta al estrés y la inmunidad innata, y ofrece una perspectiva intrigante sobre su participación en procesos celulares esenciales.

Estudio de genes vinculados a la respuesta terapéutica y toxicidad inducida por glucocorticoides en pacientes con enfermedades hematológicas

Carla Palermo¹, Julio Da Luz², Florencia Laluz³, Ana Soler², Ileana Corvo¹

¹Laboratorio de Moléculas Bioactivas, Departamento de Ciencias Biológicas, CENUR LN, UdelaR. ²Laboratorio de Genética Molecular Humana, Departamento de Ciencias Biológicas, CENUR LN, UdelaR. ³Servicio de Hemato Oncología, Hospital de Paysandú.

Los glucocorticoides (GC) forman parte de los regímenes estándares de tratamiento de muchas patologías, particularmente enfermedades hematológicas y hematooncológicas. Dentro de las enfermedades hematológicas cuyo tratamiento involucra altas dosis y/o administración prolongada de GC, se encuentran la leucemia linfoblástica aguda (LLA), cáncer pediátrico más frecuente en Uruguay, y en adultos el púrpura trombocitopénico inmune (PTI) y la anemia hemolítica autoinmune (AHA) mediada por anticuerpos calientes. El principal mecanismo de acción de los GC es la regulación de la expresión génica, la inducción de la apoptosis y su efecto anti-proliferativo y antiinflamatorio. Como contraparte, provocan efectos adversos de diferente intensidad, condicionando la vida del paciente. La vía metabólica de los GC involucra muchas enzimas, transportadores, receptores, etc., por ende, muchos genes/polimorfismos podrían influir en la ocurrencia de efectos adversos y en la respuesta al tratamiento. Se plantea estudiar variantes alélicas de genes vinculados al metabolismo de la prednisona, metilprednisolona y dexametasona; y establecer relación con la respuesta terapéutica y la toxicidad a los mismos, en pacientes con LLA, PTI y AHA. Se seleccionaron genes con variantes que podrían estar presentes en nuestra población y que participan en diferentes puntos de la vía de acción de los GC: las enzimas de la familia de las GSTs que participan en el metabolismo de los GC (GSTM1, GSTT1 y GSTP1), la enzima que convierte la prednisona en el metabolito activo prednisolona (11 β -HSD1), el receptor de GC (GR), y el factor de transcripción Ikaros (IKZF1), que es un regulador de la diferenciación del linaje linfoide. En este trabajo se presentan resultados preliminares donde se pusieron a punto los protocolos para estudiar las variantes en el número de copias de los genes de GSTT1 y GSTM1 mediante multiplex-PCR, y el SNP r1695 (I105V) de GSTP1 por PCR-RFLP. Se procesaron las primeras muestras de pacientes con LLA del banco de ADN genómico del Laboratorio de Genética Molecular Humana. Se identificaron individuos con deleciones en homocigosis y/o heterocigosis para los genes GSTT1 y GSTM1 y los 3 genotipos del SNP r1695 de GSTP1. Se completará el genotipado del banco de ADN y se ampliará la muestra incluyendo ADN de pacientes con AHA y PTI, para realizar posteriormente los estudios de asociación entre genotipo y respuesta/ efectos adversos. Las herramientas genéticas para predecir la respuesta individual al tratamiento con GC podrían permitir ajustar las dosis para optimizar la respuesta terapéutica y disminuir la incidencia de toxicidad.

Endo180 contribuye al proceso de migración celular en células epiteliales

María Agustina Faulord Sosa^{1*}, Rodrigo Martino Kunsch¹, Mercedes Rodríguez-Teja¹, Lucía Pastro Cardoso¹,

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

El cáncer de próstata ocupa el cuarto lugar dentro de las neoplasias más prevalentes a nivel mundial. En Uruguay, el 87% de los casos de PCa se dan en hombres mayores de 60 años, (tasa ajustada por edad a la población mundial estándar expresada en casos x100000, datos publicados en junio de 2024 que comprenden el período 2016-2020). El principal factor de riesgo para padecerlo es la edad. La membrana basal (MB) del tejido epitelial brinda soporte mecánico, abastece de factores de crecimiento, hidratación y regula la proliferación celular, la migración y la estructura del citoesqueleto. La célula interactúa con los componentes proteicos de la MB mediante mecano-receptores, entre ellos, Endo180 (CD280, MRC2, uPARAP), es un mecano-receptor que interactúa con el colágeno tipo IV, enviando señales regulatorias a la célula. La formación de AGEs (del inglés, Advanced Glycation End products) es producto de una reacción no enzimática entre un grupo amino y un azúcar reductor y su acumulación (por consumo en la dieta y por producción endógena del metabolismo), genera un incremento en la rigidez de la MB, modificando las fuerzas tensionales que ejerce sobre la célula epitelial, promoviendo un fenotipo migratorio y proliferativo. Utilizando una línea celular *knock-out* (KO) para Endo180 generada en nuestro laboratorio realizamos un análisis de migración. Se diseñaron e imprimieron en 3D, *stoppers* que al apoyarse en el fondo del pocillo de la placa de cultivo generan área donde las células no pueden adherirse. Con los *stoppers* se sembraron células RWPE-1 Endo180 KO, control y células *wild-type* (WT) a confluencia. Después de 24 horas, se retiraron los *stoppers* y se tomaron fotos de los pocillos en campo claro, registrándose ese momento como tiempo cero. Luego se tomaron fotos a las 24 horas, 48 horas y 120 horas. Las imágenes se analizaron utilizando el software libre Fiji/ImageJ, donde se midió el área de la circunferencia en cada una de las tomas. Las células Endo 180 KO migraron menos que las células WT y control. Este resultado contribuye a los esfuerzos realizados para determinar a Endo180 como marcador de peor pronóstico en cáncer de próstata.

Análisis de los niveles de inmunoglobulina A en saliva de mujeres durante el puerperio: Relación con el estrés y la realización de clases preparativas para el nacimiento.

Pablo Lores¹, **Sofía Balbuena**¹, Juan Oliva¹ y Ma. Florencia Festari¹

¹Unidad Académica de Inmunobiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República

El estrés psicológico afecta el sistema inmunológico, particularmente la concentración de inmunoglobulina A secretada (s-IgA) salival. Mientras que factores estresantes agudos pueden aumentar los niveles de s-IgA, el estrés crónico, como el experimentado durante el embarazo, suprime su producción, lo que aumenta la susceptibilidad a infecciones. En el posparto, altos niveles de depresión y ansiedad, también incrementan el riesgo de tener problemas de salud. La asistencia a clases preparativas para el nacimiento (CPPN) aumenta la autoconfianza durante la gestación, el parto y el puerperio, reduciendo la ansiedad y el dolor, lo que podría tener efectos beneficiosos en la inmunidad materna.

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el estrés materno durante el puerperio, su repercusión en el sistema inmune y su variabilidad en base a la participación de las madres en CPPN. Se seleccionó una muestra de 88 pacientes púerperas, en las primeras 48 horas postparto, del Centro de Maternidad CASMU 3. Dichas pacientes fueron inicialmente separadas en dos grupos según su participación en las CPPN pero fueron evaluadas en conjunto para la determinación de correlación de las variables principales del estudio. Se realizaron cuestionarios sociodemográficos y de escalas de estrés percibido (PSS) a las participantes, se realizó una toma de muestra de saliva para cuantificar los niveles de s-IgA mediante la técnica de ELISA sandwich y se efectuó la revisión del SIP (Sistema Informático Perinatal).

Ninguna de las variables sociodemográficas analizadas posee una correlación significativa con el estrés percibido, con los niveles de s-IgA salival, ni con el *outcome* neonatal. Sin embargo, las CPPN poseen una influencia significativa en la edad gestacional de los recién nacidos. Por otro lado, la asistencia a las CPPN no demostró tener ningún impacto en el valor de la PSS ni en la concentración o tasa de secreción de la s-IgA salival. A pesar de esto, se pudo encontrar, en concordancia con lo reportado en otros trabajos, que existe una correlación negativa entre el estrés percibido y la concentración de s-IgA salival. Este resultado evidenciaría que el estrés percibido durante el puerperio es la continuación de un estrés crónico probablemente asociado al transcurso del embarazo y, por tanto, consideramos como principal perspectiva la realización de un estudio longitudinal que permita analizar el estrés vivenciado a lo largo del embarazo y su relación con la concentración de s-IgA salival.

Eficacia de la terapia con *Salmonella* en la prevención de metástasis en un modelo de melanoma

Plata, María Clara¹; Mónaco, Amy¹; Chabalgoity, José Alejandro¹; Moreno, María¹

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

El melanoma es responsable de la gran mayoría de las muertes por cáncer de piel. Las opciones terapéuticas disponibles son limitadas, costosas y tienen un éxito restringido. En este contexto, el uso de bacterias como agentes antitumorales ha ganado interés debido a su potencial. En particular, la *Salmonella* ha demostrado ser una candidata prometedora: tiene un efecto antitumoral directo al inducir la muerte de células tumorales, y un efecto indirecto al fomentar una respuesta inmune proinflamatoria robusta.

En nuestro grupo investigamos el potencial de la *Salmonella* Typhimurium LVR01, una cepa atenuada en aroC, como inmunoterapia para el tratamiento del cáncer, mostrando que puede ser una alternativa interesante, especialmente contra el melanoma. El tratamiento de tumores primarios con LVR01 retrasa el crecimiento tumoral y prolonga la supervivencia, aunque su efecto es transitorio y limitado, sin alcanzar una remisión completa. Sin embargo, cuando se utiliza como terapia neoadyuvante en ratones sometidos a cirugía, del melanoma primario, LVR01 reduce la diseminación de la enfermedad y permite alcanzar una remisión completa en más del 40% de los animales tratados. Este fenómeno puede explicarse por dos hipótesis: LVR01 previene la metástasis de las células tumorales y/o la respuesta inmune anti-tumoral inducida por *Salmonella* elimina células tumorales residuales.

Por ello, nos planteamos estudiar los mecanismos inmunológicos inducidos por *Salmonella* que subyacen al control de la ocurrencia de metástasis, evaluando si la respuesta antitumoral inducida es dependiente y específica del tumor y/o del tratamiento con LVR01, y si previene la aparición de metástasis pulmonares. Desafiamos con B16F1 o un tumor no relacionado (3LL, carcinoma pulmonar de Lewis) a ratones que fueron sometidos a cirugía posterior al tratamiento con LVR01, lo que resultó en un crecimiento tumoral retardado y una supervivencia prolongada, únicamente en el melanoma. También realizamos ensayos de Winn, que permitieron determinar que los esplenocitos de ratones tratados tienen un mayor potencial para retrasar la aparición del tumor y extender la supervivencia en el melanoma B16F1, pero no en el carcinoma 3LL. Asimismo, efectuamos ensayos de desafío con células tumorales B16F10 a ratones tratados con *Salmonella* y sometidos a remoción del tumor primario donde se evaluaron las metástasis a nivel pulmonar, observando que LVR01 disminuiría el desarrollo de metástasis pulmonares en ensayos de desafío.

Generación de un modelo biológico para evaluar nuevos radiotrazadores para FAP1

Camila Ladra¹, Juan Trinidad¹, Ma. Emilia Tejería², Carolina Oliveira¹, Ana Rey², María Ana Duhagon^{1,3}.

¹Sección genómica funcional. Facultad de Ciencias; ²Área Radioquímica, Facultad de Química; ³Departamento de Genética, Facultad de Medicina. Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; #filiación actual: ⁴Laboratorio de Genómica Evolutiva, Sección Biomatemática, Facultad de Ciencias, UdelaR; ⁵Laboratorio de Bioinformática, Departamento de Genómica, IIBCE, MEC.

El cáncer continúa siendo uno de los principales desafíos en salud, impulsando la búsqueda de nuevas alternativas diagnósticas y terapéuticas. La Medicina Nuclear desarrolla radiotrazadores específicos para tumores. La proteína activadora de fibroblastos (FAP) es una proteasa ubicua que desempeña un papel fundamental en la regulación y activación de los fibroblastos, facilitando la digestión de la matriz extracelular y la invasión tumoral, convirtiéndose en un objetivo valioso para el desarrollo de agentes diagnósticos y terapéuticos.

Este trabajo buscó generar un modelo celular para la evaluación *in vitro* de nuevos complejos de ^{99m}Tc derivados de la linagliptina, un inhibidor de la proteína activadora de fibroblastos (FAP), con potencialidad como radiofármacos oncológicos. Con este propósito se realizaron dos aproximaciones. Por un lado, se buscó generar líneas celulares con expresión estable de la proteína FAP1 obtenidas por transfección de un plásmido pLenti-GIIICMV que dirige la expresión del gen para FAP1 humana y de un gen de resistencia a la puomicina controlados por promotor CMV y SV40 respectivamente. Se transfectaron dos líneas celulares de cáncer de próstata, PC3 y DU145, que no expresan FAP1. Luego se aislaron clonas resistentes a la puomicina; sin embargo, no se observó la marcación de FAP1 en la membrana plasmática. Esta ausencia de expresión en las células seleccionadas podría indicar una selección negativa de las células que sobreexpresan FAP1.

Por otro lado, se eligieron dos líneas celulares metastásicas de melanoma, IGR39 y SKMEL28, que presentan expresión endógena de FAP1 alta y baja respectivamente. La expresión se determinó primeramente a partir de datos ómicos del CellLine Encyclopedia del Broad Institute y luego se confirmó por RT-qPCR. La presencia de la proteína FAP1 en estas líneas se analizó usando un anticuerpo específico por técnicas de citometría de flujo, dot blot e inmunocitoquímica. Si bien el nivel de expresión de FAP1 a nivel proteico correlaciona con la abundancia del ARNm en cada línea, la localización de la proteína muestra ser fundamentalmente intracelular. Esto coincide con la falta de afinidad de estas células a los radiotrazadores desarrollados en ensayos *in vitro*, incluyendo el radiofármaco ⁶⁸Ga-FAP104 gold estándar para imagenología de la FAP, a pesar de probar diversas condiciones.

Si bien FAP1 tiene un dominio de anclaje en la membrana plasmática, se ha caracterizado poco su localización subcelular en la literatura. Nuestro trabajo sugiere que la misma no es constitutiva y plantea limitaciones para la elección de modelos biológicos de evaluación de fármacos.

Impacto de la urolitina A sobre un modelo celular de neuroinflamación

Mauro Pérez^{1,2}; Adrián Aicardo^{1,2,3}; Rafael Radi^{1,2}; Cecilia Chavarría^{1,2}

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay. ²Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay. ³Departamento de Nutrición Clínica, Escuela de Nutrición, Universidad de la República, Uruguay.

La alimentación saludable constituye un factor protector frente a la aparición de diversas enfermedades. La dieta juega un papel crucial en el envejecimiento saludable y la prevención de enfermedades relacionadas con la edad. Se ha demostrado que individuos que se adhieren a dietas saludables presentan menor riesgo a desarrollar deterioro cognitivo y demencia. Los bioactivos provenientes de alimentos son metabolitos secundarios con funciones más allá de las nutricionales, que aportan importantes beneficios a la salud.

Este trabajo se propone evaluar los efectos neuroprotectores de compuestos bioactivos presentes en los alimentos, con énfasis en las urolitinas. Las urolitinas son postbióticos que se generan por parte de la microbiota intestinal, tras el consumo de alimentos ricos en ácido elágico. El ácido elágico está presente en diversas frutas (granada, frutillas, frutos rojos, uvas de la variedad Muscadine), semillas, nueces y almendras.

Se ha demostrado que la urolitina A logra atravesar la barrera hematoencefálica, por lo cual nos planteamos estudiar su impacto a nivel de la neuroprotección. Empleamos como modelo una línea celular de microglia murina, células BV-2 expuestas a diferentes estímulos (LPS, LPS e INF- γ). Se demostró que la urolitina A logra modular el fenotipo inflamatorio de estas células, reduciendo la expresión de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1B, IL-6) y los niveles de nitrito determinados por Griess.

Por otra parte, la urolitina A a bajas concentraciones (entre 0.5 - 5 μ M) presenta un impacto sobre la viabilidad celular. Se determinó, empleando diversas técnicas (ensayo MTT, recuento de células teñidas con trypan blue y citometría con la sonda fluorescente diacetato de carboxifluoresceína) que la urolitina A tiene un impacto sobre la viabilidad celular. Este efecto sobre la viabilidad se acompaña de una reducción de los niveles de nitrito en los cultivos BV-2. Estos resultados fueron obtenidos en la línea BV-2 así como en macrófagos de la línea J-774. Asimismo, se analizó el efecto de la urolitina A sobre la proliferación celular de las células BV-2 empleando el análogo de timidina BrdU.

En conclusión, los resultados obtenidos muestran que la urolitina A podría tener impacto sobre la neuroprotección, modulando la respuesta inflamatoria de células BV-2 activadas y además, a bajas concentraciones, presenta un efecto sobre la viabilidad celular. Estos resultados requieren ser explorados en profundidad para determinar los mecanismos moleculares subyacentes.

Actividad antitumoral de la phen y otras diiminas: ¿es necesaria la coordinación a Cu para su actividad?

Victoria Collazo¹, Marcos V. Palmeira-Mello², Carlos Y. Fernández¹, Bruno Rosa¹, Natalia Alvarez¹, Javier Ellena³, Antonio J. Costa-Filho⁴, Alzir A. Batista², Julia Torres¹ and Gianella Facchin^{1*}.

¹Química Inorgánica, Departamento Estrella Campos, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. ²Departamento de Química, Federal University of São Carlos, São Carlos, Brazil. ³São Carlos Institute of Physics, University of São Paulo, São Carlos, Brazil. ⁴Ribeirão Preto School of Philosophy, Science and Literature, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.

Las diiminas, como la fenantrolina (phen) y sus derivados, se utilizan ampliamente en química inorgánica medicinal en el desarrollo de nuevos metalo-compuesto con actividad antitumoral. Uno de los problemas centrales a dilucidar en esta área, especialmente para complejos de metales lábiles como el Cu, es diferenciar si los efectos biológicos son propios de los ligandos libres o es necesaria la formación del complejo para la actividad. Si la actividad citotóxica de los compuestos de coordinación de la phen y sus derivados es el resultado del complejo intacto, del ligando en sí, si el metal transfiere el ligando a la célula, o si la coordinación se pierde antes de llegar a la célula, es un tema en debate. Nuestro grupo de investigación se dedica a encontrar nuevos compuestos de coordinación con actividad antitumoral, especialmente de Cu(II). Como parte de ello, estamos dirigiendo nuestros esfuerzos a dilucidar el papel de las diferentes especies de sistemas Cu-diimina y Cu-diimina-coligando en la actividad biológica. En este trabajo se presentan los resultados obtenidos para el sistema Cu-diimina (diimina: fenantrolina, neocuproína y tetrametilphen), cuyos complejos de cobre son potentes agentes citotóxicos en varias líneas celulares tumorales.

Se determinaron las constantes de equilibrio por potenciometría a 25 °C en KCl 0,10 M, incluyendo la protonación del ligando y la hidrólisis de la formación de Cu(II), Cu-diimina. Las especies Cu-diimina son estables incluso a concentración micromolar, correspondiente a las condiciones de los estudios celulares. También se estudió la interacción de las especies binarias con la albúmina sérica bovina, mediante espectroscopía UV-Vis y EPR, encontrando que la diimina permanece coordinada en presencia de albúmina. Finalmente, se determinó la citotoxicidad del ligando (determinando IC50) y complejos en células de cáncer de ovario humano A2780 para analizar la relevancia de la coordinación, evidenciando el papel central del complejo Cu-diimina para la actividad de la propia diimina y de las diferentes especies.

Evaluación de la espermatogénesis en ratones *Trj*, modelo de Charcot-Marie-Tooth 1A, y estudio de la proteína PMP22 en las células nodrizas de Sertoli

Pedro Alvarez Chalar¹, Alejandra Kun^{2,3}, Adriana Geisinger^{1,3}, Rosana Rodríguez Casuriaga¹

¹Laboratorio de Biología Molecular de la Reproducción, Departamento de Biología Molecular, Instituto de investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE). ²Laboratorio de Biología Celular del Sistema Nervioso Periférico, Departamento de Proteínas y Ácidos Nucleicos, IIBCE. ³Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República (UdelaR)

El modelo murino *Trj* (*Trj*) es portador de una micromutación en el gen *Pmp22*, igual a la observada en familias humanas portadoras de la afección Charcot-Marie-Tooth de tipo 1E (CMT1E). Sólo los heterocigotas son viables (efecto de dosis génica).

Dadas las dificultades para mantener la línea de ratones *Trj* debido al bajo éxito reproductivo de los machos, decidimos investigar su fertilidad. Los mutantes presentaron espermatogénesis completa, mostrando todos los tipos celulares de línea germinal. Mostramos en este trabajo la caracterización de la expresión de PMP22 en los túbulos seminíferos a nivel celular y subcelular, en machos de genotipo salvaje (*wt*) y *Trj*. La presencia de proteína medida en señal de intensidad de fluorescencia es el doble en *Trj* respecto del *wt*. La distribución de la inmunoseñal de PMP22 está asociada a las células de Sertoli (CS), donde esta proteína forma grandes agregosomas, en forma de esferas similares a adiposomas con un patrón definido y consistente en CS de ratones *Trj*; además, parecen estar acompañadas de otros desechos de origen lipídico y proteico. La dinámica de estos acúmulos es aún incierta, aunque sabemos que se asocian a organelos como retículo endoplásmico y núcleo. También parecen asociarse a filamentos de actina, lo que podría vincularse a fenómenos de transporte entre compartimientos subcelulares a través de miosinas. Los microfilamentos se disponen en forma de cesta, envolviendo los agregosomas. Hipotetizamos que la función de esta estructura periagregosomal pueda ser aislar estas moléculas tóxicas, evitando un comportamiento de propagación tipo “priónico”, como se observa en otras proteinopatías.

Aunque desconocemos el rol testicular de PMP22, sabemos que en sistema nervioso normalmente está fuertemente expresada en células de Schwann (CSch).

Estas células gliales son nodrizas, es decir, se asocian a otras células para ayudarlas en su desarrollo y supervivencia. Existe una interesante analogía como células nodrizas entre CSch y CS, con sus células comensales siendo neuronas y células germinales respectivamente; en ambos casos existe un intenso “cross-talk” mediante señales moleculares que las vinculan, y una interdependencia vital. Además, ambos tipos celulares proporcionan soporte y nutrición, regulan el crecimiento y mantienen la homeostasis del nicho, teniendo ambos en estado adulto, su ciclo celular detenido en G0. Más aún, ambos tipos celulares establecen contacto directo con sus huéspedes. Tanto CSch como CS presentan abundantes proteínas de unión, en las primeras, para anclar sus propias membranas en la espiral miélica alrededor del axón, y en la segunda, con otras CS para constituir la barrera hemato-testicular. Una de estas proteínas, al menos para las CSsh, es PMP22. Resulta interesante, por ende, investigar el rol de esta proteína en las CS, y su aumento de expresión en los ratones *Trj*.