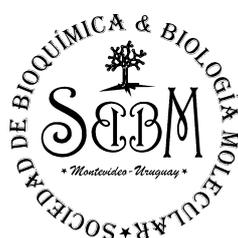


XIII Jornadas de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular

5 Y 6 DE OCTUBRE DEL 2023

Torre de las Telecomunicaciones de ANTEL - Montevideo, Uruguay

LIBRO DE RESÚMENES



AUSPICIAN



ELECO S.A.
líder en alta tecnología

tanirel
BIOTECNOLOGÍA



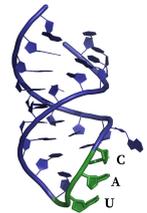
APOYAN



Ministerio
**de Educación
y Cultura**



iibce
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOLÓGICAS CLEMENTE ESTABLE



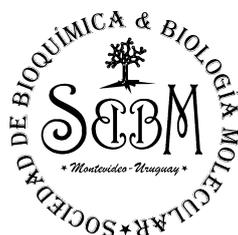
Club del ARN del Uruguay



Programa de
Desarrollo de las
Ciencias Básicas



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



PROGRAMA

JUEVES 5 DE OCTUBRE

Auditorio Mario Benedetti		Sala Idea Vilariño
Mañana		
8:30	Registro	
9:00	Conferencia plenaria de apertura <i>Prof. Sergio Schenkman (Universidad Federal de San Pablo)</i>	
10:00	Pausa para el café	
10:30	(Mesa) Bioquímica y Biología Molecular <i>Andrea Villarino (FCien, UdelaR), María Laura Chiribao (Fmed, UdelaR)</i> Presentación de resúmenes seleccionados	
12:00	Almuerzo	

Auditorio Mario Benedetti		Sala Idea Vilariño
Tarde		
13:00	(Mesa) Bioquímica y estructuras de proteínas <i>Nadia Riera (IP de Montevideo), Karina Alleva (Universidad de Buenos Aires)</i> Presentación de resúmenes seleccionados	(Mesa) Imágenes en Biología Celular y Molecular <i>Daniel Prieto (IIBCE), Eugenia Isasi (Fmed, UdelaR)</i> Presentación de resúmenes seleccionados
14:30	(Mesa) Ómicas y Bioinformática <i>Rosario Durán (IP de Montevideo), Alvaro Martín (Fing, UdelaR)</i> Presentación de resúmenes seleccionados	(Mesa) Edición de genomas <i>Jorge Porfido (IP de Montevideo), Ana Arruabarrena (INIA)</i> Presentación de resúmenes seleccionados
16:00	Pósters + Pausa para el café	
17:30	(Panel) Desafíos en educación en Bioquímica y Biología Molecular <i>Florencia Tomasina (Fmed, UdelaR), Ignacio Idoyaga (CONICET), Mariana Pereira (FCien)</i>	

VIERNES 6 DE OCTUBRE

Auditorio Mario Benedetti		Sala Idea Vilariño
Mañana		
9:00	Conferencia plenaria de apertura <i>Prof. Eric Westhof (Universidad de Estrasburgo)</i>	
10:00	Pausa para el café	
10:30	(Mesa) Biología Celular <i>Mariana Sotelo (IIBCE), Lourdes Echarte (Fmed, UdelaR)</i> Presentación de resúmenes seleccionados	
12:00	Almuerzo	

Auditorio Mario Benedetti		Sala Idea Vilariño
Tarde		
13:00	(Mesa) Biotecnología y Biocatálisis <i>Cecilia Giacomini (FQ, UdelaR), María Inés Siri (FQ, UdelaR)</i> Presentación de resúmenes seleccionados	(Mesa) Metabolismo, regulación y señalización <i>Florencia Irigoien (Fmed, UdelaR)</i> Presentación de resúmenes seleccionados
14:30	(Panel) Articulación entre academia e industria <i>Vicente Verez Bencomo (Instituto Finlay de vacunas, vía zoom)</i> <i>Carlos Batthyány (IP de Montevideo), Ximena Camaño (ANII)</i>	
15:30	Pósters + Pausa para el café	
17:00	Asamblea de socios, premios y cierre de las jornadas	

BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

VALIDACIÓN DE SECUENCIAS DE AMPs EN ADN GENÓMICO DE ACCA SELLOWIANA

MF, Rossi¹. C, Pritsch¹. S, Rodríguez-Decuadro¹

1. Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Agronomía, UDELAR

Los péptidos antimicrobianos (AMP) son pequeños péptidos ricos en cisteína que forman parte del sistema inmune innato de plantas y animales. Su bioprospección en la flora nativa de Uruguay es aún incipiente pese a su valioso potencial para el desarrollo de alternativas de control de infecciones (humanos, animales, plantas), y para la agroindustria, en la preservación de alimentos. Este trabajo parte de secuencias de AMPs putativas que fueron previamente identificadas y caracterizadas a partir de un transcriptoma de novo de flor y hoja, y que codifican para defensinas, esnaquinas y heveínas en el frutal nativo *Acca sellowiana* (Myrtaceae), conocido como guayabo del país. Como objetivo, se propuso la validación de estas secuencias mediante amplificación por PCR de ADN genómico, con el fin de caracterizar las secuencias exón-intrón de cada gen, confirmar algunas isoformas observadas, y analizar la fiabilidad del transcriptoma. Se seleccionaron 5 defensinas candidatas, 3 esnaquinas, y 1 heveína, y se diseñaron primers específicos en las regiones 5' y 3' UTR, de manera que amplifiquen toda la región codificante. Se ajustaron las condiciones de la reacción de PCR (temperatura de annealing, concentración de ADN, agregado de BSA). Los productos de amplificación fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa 2%. La identidad de los productos de PCR se verificó mediante secuenciación.

ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA DE DOS CULTIVARES DE SOJA EN RESPUESTA A LA INFECCIÓN CON DIAPORTHE CAULIVORA

E, Mena¹. G, Reboledo¹. S, Stewart². M, Montesano^{1,3}. I, Ponce de León¹

1. Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay 2. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Programa Nacional de Cultivos de Secano, La Estanzuela, Colonia, Uruguay 3. Laboratorio de Fisiología Vegetal, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

En Uruguay la soja constituye el principal producto de exportación. Una de las enfermedades que afecta este cultivo es el cancro del tallo, causado por *Diaporthe caulivora*. En este estudio se compararon dos cultivares de soja contrastantes, Williams (susceptible) y Génesis 5601 (resistente), en respuesta a la infección con *D. caulivora*. La enfermedad se desarrolla en ambos cultivares, observándose mayor largo de las lesiones y biomasa del patógeno en el cultivar Williams. Mediante análisis transcriptómicos, se observaron diferentes patrones de expresión de genes entre plantas inoculadas respecto a sus controles y también entre cultivares. En condiciones basales Genesis 5601 presenta mayor expresión de genes que codifican receptores involucrados en detectar a los patógenos y genes relacionados con la defensa vegetal. Además, se observó una activación de la respuesta de defensa más rápida en el cultivar resistente, detectándose a tiempos tempranos 1028 genes sobreexpresados en Genesis 5601 y solo 434 genes en Williams. Los patrones de expresión de genes regulados positivamente y el análisis de enriquecimiento de ontología mostraron que en la activación de defensa vegetal juegan un rol importante la percepción del patógeno, la señalización, las vías hormonales, la ruta de los fenilpropanoides y las proteínas relacionadas con la patogenicidad. Los resultados obtenidos constituyen aportes originales sobre este patosistema y brindan información relevante sobre las bases moleculares y la activación de mecanismos de defensa en la interacción soja-*D. caulivora*, los cuales pueden ser utilizados en los programas de mejoramiento de la soja.

EXPRESIÓN DE CD147 SE ASOCIA A UN FENOTIPO AGRESIVO EN CÁNCER DE PRÓSTATA METASTÁSICO

R, Martino¹. L, Pastro¹. S, Fontenla¹. M, Rodriguez-Teja¹

1. Departamento de Genética. Facultad de Medicina - UdeLaR

El cáncer de próstata es uno de los tipos de cáncer de mayor incidencia y mortalidad a nivel global. La letalidad de esta enfermedad se debe principalmente a la progresión hacia la metástasis y la formación de nuevos tumores en pulmón y huesos. La glicoproteína de membrana CD147, también conocida como Basigin o EMMPRIN, ha sido identificada como uno de los factores involucrados en la modulación de la progresión del cáncer hacia la metástasis. CD147 se encuentra comúnmente sobreexpresado en múltiples tipos de cáncer, y su elevada expresión tiende a asociarse con un pronóstico adverso para la enfermedad. Para estudiar el rol de CD147 en la progresión del cáncer de próstata, en este trabajo se generó una línea celular de cáncer de próstata metastásico PC3 CD147 knockdown. En esta línea, se observó una marcada disminución tanto en la transcripción como en la traducción de CD147, acompañada de una reducción en la glicosilación de la proteína y su expresión en la membrana celular. La línea celular mutante exhibe un perfil fenotípico caracterizado por una disminución en la tasa de crecimiento, migración celular y formación de colonias, apoyando la evidencia existente de que la disminución de CD147 se asocia a una menor agresividad tumoral en cáncer de próstata. También se observó un aumento en la expresión de GAPDH en la línea celular mutante, lo que apunta a un posible papel de CD147 en el metabolismo del cáncer. Asimismo, mediante un análisis de expresión diferencial de genes en la base de datos RNA-seq TCGA, se identificó un incremento significativo en genes relacionados a la fosforilación oxidativa en las muestras de cáncer de próstata con alta expresión de CD147 en comparación con las muestras de baja expresión. Esto sugiere una relación potencial entre CD147 y la regulación del metabolismo oxidativo en el cáncer de próstata. Nuestros resultados subrayan la importancia de CD147 en la progresión del cáncer de próstata metastásico y proporcionan evidencia de posibles mecanismos metabólicos involucrados en esta enfermedad.

¿SUERO O PLASMA? EFECTO DE LOS CATIONES DIVALENTES SOBRE LA ESTABILIDAD DE LOS tRNAs NICKEADOS EN BIOFLUIDOS

B, Costa^{1,2}. JP, Tosar^{1,2}

1. Unidad de Bioquímica Analítica. CIN, Facultad de Ciencias - UdelaR, 2. Laboratorio de Genómica Funcional. Institut Pasteur de Montevideo

La secuenciación de ARNs circulantes en sangre humana podría ser utilizada para el diagnóstico temprano de enfermedades. Llamativamente, las mitades de tRNA son extremadamente abundantes en suero humano, y muy poco representadas en secuenciados hechos en plasma. Experimentos llevados a cabo por Dhahbi y colaboradores mostraron que el suero tratado con agentes quelantes como el EDTA, o bien la colección de sangre en tubos con dicho quelante como anticoagulante, disminuye la abundancia de estas mitades, mientras que, si la colección de sangre se realiza en tubos con heparina, se vuelven a observar estas mitades en niveles similares al suero sin tratar. La conclusión de este trabajo fue que el quelado de los iones por el EDTA desestabiliza los complejos ribonucleoprotéicos no vesiculares que transportarían a las mitades 5' de tRNA, exponiéndolas a ribonucleasas (RNasas) que son abundantes en la sangre. Sin embargo, hemos demostrado recientemente que estas mitades de tRNA no circulan en biofluidos como mitades independientes, sino que siguen asociadas a su mitad 3' luego de un primer corte a la altura del anticodón, en forma de un "tRNA nickeado" [1], que podemos secuenciar mediante REJOIN-seq, un método que hemos desarrollado [2]. En base a estos antecedentes, nos planteamos la posibilidad de que el verdadero mecanismo que gobierne la estabilidad de estas mitades tenga que ver con la compactación del tRNA nickeado mediada por cationes divalentes, lo que aumentaría su estabilidad frente a ribonucleasas de secreción. En línea con esta hipótesis, ensayos in vitro mostraron que el magnesio es capaz de estabilizar a los tRNAs nickeados, tanto frente a RNasa 1, como a RNasas presentes en biofluidos. Ensayos in silico mostraron que, en ausencia de magnesio, existe una disminución de las interacciones no covalentes entre el T y D loop, lo que desplaza al D loop hacia una posición más expuesta y accesible para las RNasas. El tratamiento de biofluidos humanos como líquido cefalorraquídeo con agentes quelantes aumentó la degradación de los tRNAs nickeados (medida por Northern blot), mientras que el agregado de magnesio mostró el efecto contrario. Finalmente, mediante la colección de muestras de plasma tratadas con heparina, demostramos la presencia de tRNAs nickeados en dicho biofluido, demostrando que la ausencia de estos en muchos trabajos de secuenciación es un artefacto producido por el método de colección de la muestra.

[1] Costa et al. (2023) PNAS 120(4): e2216330120

[2] Tosar et al. (2023) Nature Protocols (en prensa)

CARACTERIZANDO EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN FPA D DE ASPERGILLUS NIDULANS

J, Dourron¹. M, Sanguinetti¹. C, Scazzocchio^{2,3}. A, Ramón¹

1 Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, Department of Microbiology, Imperial College London, London, United Kingdom, Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC), Gif-sur-Yvette, France

Ante la carencia de fuentes primarias de carbono y/o nitrógeno, los hongos utilizan fuentes alternativas (como los aminoácidos), lo cual requiere de la síntesis de transportadores de membrana y enzimas específicos para su metabolización. La expresión de estos genes está sujeta a un estricto control transcripcional y/o post-transcripcional. El estudio en hongos modelos como *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus nidulans* ha permitido dilucidar varios de estos mecanismos. En *A. nidulans*, la presencia de fuentes preferenciales de nitrógeno reprime la transcripción de los genes que participan en la utilización de diversas fuentes no preferenciales (como otros aminoácidos). En *S. cerevisiae* se da un mecanismo similar de represión transcripcional, aunque no idéntico; y posee además un sistema de inducción general de los genes de varias permeasas de aminoácidos. En *A. nidulans* no existen genes ortólogos a los estudiados en *S. cerevisiae*, por lo que este mecanismo de activación general de genes de permeasas de aminoácidos estaría ausente. Sin embargo, hemos identificado un posible represor general de la transcripción de genes de permeasas, el cual estamos caracterizando.

En estudios previos se encontró un mutante en el locus *fpaD* (*fpaD43*), resistente a D-serina y a p-fluorofenilalanina (análogos tóxicos de la L-Ser y Phe, respectivamente), siendo la mutación semidominante frente al alelo wild type. El mutante *fpaD43* presenta alterada su capacidad de transporte de otros aminoácidos y análogos tóxicos. En FpaD se predicen varios motivos de unión al ADN (un homeodominio y tres dedos de Zn de tipo C2H2) y dos señales de localización nuclear (NLSs). La mutación *fpaD43* introduce un cambio de una Ala por un Asp en uno de los dedos de Zn.

Los resultados obtenidos hasta el momento confirman que *fpaD* participa en la regulación de la transcripción de genes de permeasas de aminoácidos y que la mutación *fpaD43* es responsable del fenotipo observado en la cepa resistente. La cepa que porta la fusión msGFP2-FpaD permitió verificar la localización nuclear de la proteína, lo cual concuerda con su rol como regulador transcripcional.

Dentro de los objetivos del trabajo se plantea realizar CHIP-seq con el fin de identificar los genes blancos de FpaD y, a partir de los datos obtenidos, identificar la secuencia consenso de este factor. Para realizar este ensayo se generaron cepas que codifican para FpaD (wt o mutante) con una etiqueta en su extremo N-terminal (4HA o msGFP2).

INHIBICIÓN DE LA TIORREDOXINA GLUTATIÓN REDUCTASA DE ECHINOCOCCUS GRANULOSUS POR ÁCIDO NITRO-OLEICO

M, Sosa¹. M, Steglich¹. F, Schopfer². L, Turell¹

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

Los nitroalquenos de ácidos grasos son potentes mediadores lipídicos electrofílicos. Se forman endógenamente y pueden administrarse como fármacos. En particular, el ácido nitro-oleico (NO₂OA) tiene efectos citoprotectores y antiinflamatorios. Esto se debe a su capacidad de reaccionar, vía adición-eliminación de Michael, con cisteínas críticas en proteínas reguladoras. Nuestra hipótesis es que el NO₂OA también reacciona con selenocisteínas proteicas. Aquí, examinamos la reacción entre NO₂OA y una forma trunca de la selenoenzima tiorredoxina glutatió reductasa de *Echinococcus granulosus*, que consiste solo en el módulo tiorredoxina reductasa (EgTR). Las enzimas salvaje (EgTRwt) y mutante (EgTRU596C) se produjeron en *E. coli*. La *k*_{cat} aparente de EgTRwt fue ~400 veces mayor que la de EgTRU596C utilizando ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico y NADPH como sustratos, enfatizando la importancia catalítica de la selenocisteína. Para evaluar la reacción entre este residuo y NO₂OA, se redujeron EgTRwt y EgTRU596C, se incubaron con diferentes concentraciones de NO₂OA y se midió la actividad enzimática remanente a diferentes tiempos. Se observó que el NO₂OA inhibe a la EgTRwt de manera bifásica. La primera fase ocurre por interacciones inespecíficas del NO₂OA con la enzima. En cambio, la segunda fase fue más lenta, reversible y ausente tanto en EgTRU596C como en los controles de ácido oleico (OA). Por esto, se asignó a la reacción de Michael con la selenocisteína y se determinaron las constantes de adición y eliminación obteniendo valores de $k_{on} = (1.7 \pm 0.2) \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $k_{off} = (3.0 \pm 1.7) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (pH 7.4, 25 °C). Se intentó sin éxito detectar la selenocisteína modificada mediante espectrometría de masa. Este es el primer reporte de la reacción entre NO₂OA y una selenoenzima.

ROL DEL OXÍGENO COMO MODULADOR DE LA RESPUESTA OXIDATIVA DE MACRÓFAGOS: FORMACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO Y PEROXINITRITO.

J, Pereyra^{1,2}. AC, Casella^{1,2}. C, Prolo^{1,2}. N, Rios^{1,2}. R, Radi^{1,2}. MN, Alvarez^{2,3}

1. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay 2. Centro de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay 3. Departamento de Educación Médica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

La respuesta citotóxica de los macrófagos depende del oxígeno (O₂) como sustrato principal para la producción de especies oxidantes. Este es utilizado por la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la NADPH-oxidasa-2 (NOX-2) para la producción de óxido nítrico (●NO) y superóxido (O₂●-) respectivamente. La reacción entre estos dos radicales genera un potente oxidante biológicamente relevante denominado peroxinitrito (ONOO-), capaz de generar daño a partir de reacciones de oxidación y nitración. Recientemente, se ha vuelto de gran interés el estudio de estos procesos in cellula considerando el microambiente fisiológico. Reportes previos de nuestro grupo han demostrado que la producción de oxidantes en macrófagos depende de la presión parcial de oxígeno (pO₂) en el rango fisiológico. Por ejemplo, la producción de ●NO se reduce un 50% cuando son expuestos por 30 minutos a 5% de pO₂. Sin embargo, cuando los macrófagos son cultivados por 48 horas en distintas pO₂ (1-6%) se ha visto un aumento de la expresión de la iNOS comparado con la observada a 21% pero sin variaciones en la producción de ●NO. La detección de ONOO-, utilizando la sonda fluorescente éster borónico de cumarina (CBE), muestra una tendencia similar a la producción de ●NO en exposiciones cortas. Sin embargo, el uso de CBE está limitado a ciertas metodologías debido a sus propiedades espectroscópicas. Además, otras sondas como la fluoresceína-boronato (FI-B) son sensibles a cambios en el pH intracelular y la pO₂. Por lo tanto, estamos desarrollando una nueva sonda fluorescente (Red-B) derivada de xanteno acoplado a un éster borónico, para la detección de peroxinitrito en diferentes condiciones celulares. El correspondiente fluoróforo (Red-Ox) fue sintetizado y caracterizado por espectroscopia, mostrando propiedades óptimas (λ_{exc} = 511nm; λ_{em} = 538nm, ϵ_{511nm} = 67,000M⁻¹cm⁻¹). Se determinó el pKa \approx 5.5, considerando entonces una baja dependencia con el pH en el rango fisiológico. 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.

ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE LOS RECEPTORES COI EN LA VÍA DE PERCEPCIÓN DE LOS JASMONATOS UTILIZANDO LA BRIOFITA *PHYSCOMITRIUM PATENS*

MJ, Díaz¹. A, Agorio¹. F, Nogue². I, Ponce de León¹

1. Departamento de Biología Molecular. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable-MEC, 2. Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'alimentation et l'environnement. Francia.

En plantas vasculares, el receptor COI1 (Coronatine Insensitive 1) está involucrado en la defensa frente a insectos y patógenos necrotróficos, además de en el desarrollo. Estos receptores reconocen a al ácido jasmónico (JA) conjugado con isoleucina, el cual es la fitohormona, activando la vía de señalización del JA y la expresión de genes específicos.

Si bien las briofitas no producen JA, sí poseen genes que codifican para proteínas COI1-like. Se ha demostrado que en la briofita *Marchantia polymorpha*, este receptor percibe al precursor del JA, el dinor-oxofitodienoico (dn-OPDA). *Physcomitrium patens*, es otra briofita modelo sumamente útil para estudios evolutivos comparativos en plantas. Hemos constatado que a diferencia de *M. polymorpha* y de las plantas vasculares, que poseen un único gen COI1, *P. patens* posee seis genes COI1-like en su genoma. Analizando datos de transcriptomas hemos visto que dos de estos genes aumentan significativamente su expresión ante la infección por el hongo *Botrytis cinerea*. Mediante un análisis filogenético hemos visto que estos dos genes junto con un tercer gen COI-like se agrupan formando un clado (clado I).

Para estudiar el papel biológico de los genes COI1-like en *P. patens*, nos propusimos generar mutantes knock-out mediante edición genómica con el sistema CRISPR-Cas9. Diseñamos seis ARN guías (sgRNAs) específicos para cada uno de los genes COI1-like, con el fin de generar deleciones en estos genes. Obtuvimos 170 clones tras transformar *P. patens* con los seis sgRNA en simultáneo, así como 96 clones al transformar simultáneamente con los tres sgRNA dirigidos contra los genes COI1-like del clado I.

Mediante un análisis morfológico, identificamos varios clones con fenotipo alterado, sugiriendo un rol de los genes COI1-like en el desarrollo. Actualmente estamos estudiando la presencia de mutaciones en los seis genes COI-like mediante PCR y secuenciación de Sanger, habiendo identificado varios mutantes.

Los resultados de este estudio generarán información valiosa sobre el papel de los genes COI en briofitas, aportando un mayor entendimiento sobre los mecanismos de defensa en plantas frente a patógenos.

ESTUDIO DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES NUCLEARES 2DBD DE ECHINOCOCCUS GRANULOSUS S.L.

B, Mozzo¹. E, Castillo². G, Alvite¹

1. Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República- 2. Unidad de Biología Parasitaria, Instituto de Higiene, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

Echinococcus granulosus sensu lato es un complejo multi-especie de platelmintos parásitos de la clase Cestoda, cuya forma larvaria es la causante de la Echinococcosis quística, una zoonosis cosmopolita que genera importantes problemas de salud y pérdidas económicas. A pesar del considerable impacto socio-económico, esta parasitosis sigue siendo una enfermedad zoonótica 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. Los Eg2DBDs son receptores nucleares (NRs) que pertenecen a la subfamilia 2DBD, cuyos miembros contienen dos dominios de unión al ADN y no están presentes en los hospederos del parásito. Dado que los NRs de helmintos parásitos son considerados posibles blanco de drogas antihelmínticas, nos proponemos dilucidar las funciones biológicas de los Eg2DBDs en protoescolices (PE) de *E. granulosus s.l.* (estadio larvario). Recientemente, hemos identificado cuatro 2DBD-NRs en las base de datos: Eg2DBD α , Eg2DBD α .1, Eg2DBD β y Eg2DBD γ ; siendo Eg2DBD α .1 probablemente una isoforma de Eg2DBD α . Hemos avanzado principalmente en la caracterización de Eg2DBD α .1. En este trabajo abordamos el estudio del mecanismo de acción de los Eg2DBDs mediante el análisis de la localización proteica en PE y membrana germinativa de quistes fértiles (bovinos) de *E. granulosus s.l.*, utilizando ensayos de inmunohistofluorescencia in toto. Para esto generamos anticuerpos policlonales en conejo contra péptidos específicos de la región N-terminal de Eg2DBD α /Eg2DBD α .1 y Eg2DBD β , ya que son los Eg2DBDs de mayor expresión en PE. Evaluamos dichos anticuerpos mediante ensayos de Western Blot. Las inmunolocalizaciones muestran que los receptores nucleares Eg2DBD α /Eg2DBD α .1 se localizan de manera uniforme en el parénquima de los PE, siendo la señal mayor en la región subtegumentaria y no se detecta señal en las ventosas ni en el tegumento. A nivel subcelular, estas proteínas se encuentran en los núcleos y en el citosol principalmente en las regiones perinucleares. Por otro lado, estos ensayos indican que Eg2DBD β se localiza diferencialmente en el tegumento y en el pedúnculo, no detectándose señal ni en el parénquima ni en las ventosas. En la membrana germinativa de quistes fértiles se detecta Eg2DBD α /Eg2DBD α .1 y Eg2DBD β , localizados mayormente en las regiones nucleares y perinucleares, respectivamente. En estos últimos ensayos la señal de la proteína Eg2DBD β parece ser mayor que la de Eg2DBD α /Eg2DBD α .1. Estos resultados indican que las proteínas Eg2DBD β y Eg2DBD α /Eg2DBD α .1 tienen patrones diferenciales de expresión, y sugieren que Eg2DBD β podría participar en la comunicación hospedero-parásito que ocurre a nivel de la pared del quiste hidático y/o en el eventual desarrollo de los protoescolices a partir de la membrana germinativa.

STUDY OF THE MOLECULAR MECHANISMS OF SEXUAL DIFFERENTIATION IN TOXOPLASMA GONDII

F, Sena^{1,2}. ME, Francia^{1,3}

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

Toxoplasmosis is a disease of worldwide distribution caused by the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*, causing high morbidity and mortality in the human population as well as in farm animals relevant to the productive sector. *T. gondii* has a complex life cycle, with asexual and sexual stages, being the last one fundamental for the dissemination of the parasite and the generation of genetic variability. During sexual differentiation, male and female gametes combine to form zygotes that become encysted, resistant to the environment, and infective for long periods of time. *T. gondii* is diploid only during zygote formation, providing the parasite with a window of opportunity for genetic mixing, a crucial step in the generation of genetic diversity. These have particular importance in our continent because there is genetic hypervariability associated with exacerbated virulence phenotypes. Despite its inherent epidemiological importance, the fundamental aspects of the sexual differentiation of *T. gondii* are still unknown. These are mainly because sexual stages occur only in the intestinal epithelium of members of the Felidae family, which includes both domestic and wild cats, and access to them is limited due to the ethical and technical complexities inherent in working with these animal models. However, new technological developments have made it possible to decipher the molecular fingerprints that trigger the process, which can now be modeled *in vitro*. In this context, we propose the study of *T. gondii* gametogenesis capitalizing on the unprecedented opportunity to generate these stages in 2D cell culture in non-felid cells. We have performed an enrichment protocol of pre-sexual and sexual stages of *T. gondii* in 2D cell culture lines from non-felids, where the increase in gene expression and subcellular localization of specific markers of these stages was monitored by qPCR and indirect immunofluorescence, respectively. Ultimately, this project will serve as a kick-off for the rational design of strategies to prevent horizontal transmission of *T. gondii* and its genetic recombination in infected cats, while providing fundamental data for the basic understanding of the biology of the sexual stage, whose molecular and cellular aspects are so far unknown.

UN MÉTODO NOVEDOSO Y RÁPIDO PARA CUANTIFICAR LA EVOLUCIÓN DEL OXÍGENO EN PLANTAS

F, Sena^{1,2}. V, Tarrago¹. A, Berais¹. S, Signorelli¹

1. Grupo de Biología de Alimentos y Plantas, Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. 2. Laboratorio de Biología de Apicomplejos, Instituto Pasteur Montevideo, Uruguay.

La molécula de oxígeno (O₂) tiene un papel dual en el metabolismo de las plantas superiores, por un lado su absorción permite la respiración celular en la matriz mitocondrial y por otro es un subproducto del proceso de fotosíntesis en las membranas tilacoidales de los cloroplastos. La detección de ambos procesos es un valioso indicador para evaluar el status metabólico de las plantas ya sea en condiciones de homeostasis o frente a diversos estreses ambientales. En este trabajo, la evolución del O₂, fue detectada mediante el uso de un electrodo de oxígeno del tipo Clark de manera no invasiva en plántulas de *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*). Mediante la determinación de la evolución de O₂ en condiciones de luz y oscuridad, logramos deducir la respiración y actividad fotosintética de las plantulas. Mediante el uso de inhibidores específicos de la respiración y fotosíntesis demostramos que la evolución de O₂ representa mayoritariamente a estos dos procesos metabólicos. Adicionalmente, la producción de oxígeno asociada al proceso de fotosíntesis presenta una dependencia lineal con de la masa de tejido vegetal y la intensidad lumínica con la que se ilumina, hasta alcanzar saturación. Por último, se detecta que la fotosíntesis-sobre-respiración es un indicador eficiente de la evolución del oxígeno ya sea bajo homeostasis controlada pero también en condiciones de estrés abiótico. La presencia de factores estresantes como 150mM de NaCl en el medio de crecimiento o la etiolación de las plantas afectó la evolución de oxígeno. En suma, este método permite determinar la actividad fotosintética y respiración celular en plántulas de *Arabidopsis* in vivo.

¿POR QUÉ TENDRÁ LA SANGRE TANTAS RNASAS? CONSECUENCIAS INMUNOLÓGICAS Y POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DEL ARN EXTRACELULAR DESNUDO

M, Castellano^{1,2,3}. V, Blanco^{1,2}. ML, Calzi¹. B, Costa^{1,4}. M, Hill^{3,5}. A, Cayota^{1,6}. M, Segovia^{3,5}. JP, Tosar^{1,4}

1. Laboratorio de Genómica Funcional. Institut Pasteur Montevideo, 2. Sección Bioquímica. Facultad de Ciencias – UdelaR, 3. Laboratorio de Inmunorregulación e Inflamación. Institut Pasteur Montevideo, 4. Unidad de Bioquímica Analítica. Facultad de Ciencias – UdelaR, 5. Departamento de Inmunobiología. Facultad de Medicina – UdelaR, 6. Hospital de Clínicas. Departamento Básico Facultad de Medicina - UdelaR.

Este trabajo busca comprender cómo las células, especialmente las del sistema inmune (SI), reconocen ARN extracelulares (exARN) no vesiculares y esclarecer el rol de las ribonucleasas (RNAsas) en este proceso. En el espacio extracelular, el exARN se encuentra encapsulado en vesículas extracelulares (exARN-V) o en la fracción no vesicular (exARN-no-V): asociado a RNPs o como exARN desnudo. Inicialmente, se creía al exARN-no-V irrelevante por su susceptibilidad a ser degradado por RNAsas presentes en biofluidos y en el espacio intercelular. Sin embargo, nuestro grupo observó que la mayoría de los exARN son no vesiculares. Mediante aproximaciones ómicas y bioquímica, demostramos que, al inhibir a las RNAsas extracelulares, las células liberan ARNt, ribosomas, ARNm y ARNs pequeños al espacio extracelular no vesicular. En condiciones normales, las RNAsas degradarían estos ARN, produciendo ARN más cortos y altamente estables. Esta observación nos llevó a preguntarnos si las células del SI podrían internalizar y reconocer estas moléculas, dado que poseen sensores de ARN endosómicos y citoplasmáticos. Nuestra hipótesis es que sí, pero que la biología del exARN-no-V dependerá de la estabilidad de estas moléculas y de la actividad RNAsas en el medio extracelular. Utilizando ARNs proinflamatorios desnudos como modelo de exARN-no-V, observamos que células dendríticas (CDs) son capaces de internalizar, sensar a estos RNAs a través de sus TLRs, gatillar la liberación de citoquinas proinflamatorias e inducir la maduración de CDs (paso esencial para despertar una respuesta inmune adaptativa) únicamente cuando se inhiben las RNAsas extracelulares. Por otra parte, también observamos que al inhibir las RNAsas, CD y líneas celulares epiteliales (MCF-7, THP-1 y U2-OS) puede internalizar y traducir ARNm desnudos. Para comenzar a esclarecer la función de las RNAsas en un contexto in vivo, inoculamos ratones con RNAs inflamatorios desnudos en cavidad peritoneal (un ambiente con baja actividad RNAsa) o por vía intravenosa (un ambiente de muy alta actividad RNAsas) y paralelamente inhibimos la actividad RNAsas en estos entornos. Los RNAs desnudos administrados por vía i.p indujeron un potente reclutamiento de monocitos y la desaparición de macrófagos residentes independientemente de la inhibición de RNAsas extracelulares. Por otra parte, la administración de RNAs desnudos por vía intravenosa en conjunto con la inhibición de las RNAsas en sangre activó células dendríticas convencionales, plasmocitoides, macrófagos y linfocitos B en bazo. Globalmente, estos resultados sugieren que las RNAsas extracelulares podrían existir para evitar el reconocimiento de exARN-no-V propios por células del SI y evitar respuestas inflamatorias exacerbadas que puedan disparar patologías autoinflamatorias y/o autoinmunes. Pero también estas enzimas podrían estar jugando un papel en modular la comunicación intercelular que podría ocurrir por la transferencia de otros RNAs como mRNAs desnudos.

EFFECTOS LETALES Y MUTAGÉNICOS INDUCIDOS POR LUZ ULTRAVIOLETA Y SU MODIFICACIÓN POR INFUSIÓN DE YERBA MATE

A, Ávila¹. D, Olsson¹. V, Sosa¹. L, Blanc¹. N, Bracesco¹

1. Laboratorio de Radiobiología, Unidad Académica biofísica. Facultad de Medicina UdelaR

La yerba mate (Ip) es una planta con origen en la región subtropical de América y su infusión (mate) que es muy consumida en Uruguay, presenta un alto contenido en polifenoles de conocidos efectos antioxidantes. En las últimas décadas ha aumentado el interés en estudiar las propiedades protectoras de los componentes bioactivos de Ip frente a los daños producidos por factores físico o químicos en el ADN.

Entre estos agentes la radiación ultravioleta (UV) genera daños a nivel del ADN que juegan un papel clave en la fase de iniciación del cáncer de piel.

Hipótesis:

Existencia de una disminución diferencial de lesiones inducidas por la radiación ultravioleta (UV) en presencia de Ip expresado como una disminución de la letalidad celular y de la frecuencia mutagénica.

Metodología:

Poblaciones de *Saccharomyces cerevisiae* tipo salvaje (SJR751) y mutante en vías de reparación (BER-NER-SML1) se trataron con radiación ultravioleta a una dosis de exposición de 4KJ/m². La lampara utilizada para la irradiación emite en un amplio rango de longitudes de onda con lo cual la dosis total esta compuesta de UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm) y UVC (200-280 nm) en una proporción de 0,51; 0,34 y 0,15 respectivamente.

Resultados:

Se observó disminución de la tasa de sobrevivencia (S) en las poblaciones tratadas con UV como único agente siendo para la cepa SJR751: $0,31 \pm 0,03$ y para la mutante: $0,22 \pm 0,03$. En muestras tratadas con UV e Ip, tanto en la cepa salvaje como la mutante disminuyó significativamente la letalidad con valor de S: $0,56 \pm 0,03$ y de S: $0,37 \pm 0,03$ respectivamente. La frecuencia mutagénica disminuyó significativamente en presencia de Ip tanto en la cepa salvaje como en la mutante. ($p < 0,05$).

Conclusión:

Las vías de reparación genómica de lesiones inducidas por UV son reguladas y se modulan con disminución de flujos mutagénicos en presencia de componentes de Ip. La disminución de la letalidad celular y de la frecuencia mutagénica en la cepa mutante de las vías de reparación cuando es expuesta concomitantemente a UV e Ip implica mecanismos de protección asociados a una posible disminución de los daños genómicos o a la modulación de vías de reparación diferentes.

ANÁLISIS DE UNA FAMILIA DE PROTEÍNAS CON DOMINIO DUF26 EN SOJA Y SU ROL EN MECANISMOS DE DEFENSA VEGETAL

L, Delgado-Cerrone¹. A, Alvarez². I, Ponce de León¹. M, Montesano²

1. Departamento de Biología Molecular. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. MEC. Montevideo. Uruguay, 2. Laboratorio de Fisiología Vegetal. Centro de Investigaciones Nucleares. Facultad de Ciencias. UDELAR. Montevideo. Uruguay

La familia de proteínas que contienen el dominio de función desconocida 26 (DUF26) en plantas, son proteínas a las cuales se le han asociados diversos roles, estando involucradas tanto en las respuestas de defensa vegetal frente a microorganismos patógenos así como en respuestas frente al estrés ambiental. Las proteínas que contienen DUF26 se pueden dividir en 3 tipos, los receptores tipo quinasas ricos en cisteínas (CRKs), los receptores sin dominio quinasa denominados PDLs (proteínas localizadas en los plasmodesmos) y las proteínas secretorias ricas en cisteínas (CRRSPs). En soja, identificamos 128 miembros, de los cuales 96 son CRKs, 21 son PDLs y 11 CRRSPs. Respecto a los CRKs, se observó que 84 de los 96 miembros tienen dos módulos DUF26 en su ectodominio, mientras que los 12 miembros restantes tienen cuatro módulos de DUF26 en su ectodominio. Cinco de las CRRSPs presentan dominios DUF26 y 6 tienen un solo dominio DUF26, mientras que todas las PDLs exhiben módulos DUF26 en su ectodominio. Estudios de expresión génica obtenidos por RNA-seq muestran que frente a tratamientos con diferentes patógenos así como frente a distintos patrones moleculares asociados a patógenos y/o daño, (PAMPs y/o DAMPs), varios genes que codifican proteínas con DUF26 se indujeron o reprimieron en los distintos tratamientos, sugiriendo que estas proteínas con DUF26 podrían estar involucradas en respuestas de defensa en las plantas. Análisis de secuencias evidenciaron que existen diferencias entre los dominios DUF26- para los distintos tipos de proteínas según su ubicación en el árbol filogenético y el tipo de proteína en cuestión. También se analizó la localización subcelular de una CRK, una PDL y una CRRSP mediante expresión transitoria en hojas de *Nicotiana benthamiana*. Estos análisis demostraron que el receptor GmCRK19 causa muerte celular en hojas de *N. benthamiana*. Se realizaron mutaciones puntuales en algunos aminoácidos del receptor GmCRK19 y mediante expresión transitoria se observó que las mutaciones evitaban la formación de lesiones asociadas a la muerte de las células. Estos estudios aportan conocimiento sobre las proteínas que contienen dominios DUF26 en soja y sus posibles roles en los mecanismos de defensa vegetal frente a patógenos.

ESTRATEGIAS PARA LA OBTENCIÓN DE CEPAS MUTANTES DE MICOBACTERIAS APLICADAS A GENERAR MUTANTES PARA EL GEN DE LA FOSFATASA PTPA, RECONOCIDO FACTOR DE VIRULENCIA DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS.

V, Hergatacorzian¹. G, Betancour¹. M, Forrellad². V, Irving¹. V, Silva-Álvarez³. AM, Ferreira³. M, Margenat¹. G, Gago⁴. F, Bigi². A, Villarino¹.

1 Instituto de Biología. Sección Bioquímica. Facultad de Ciencias- UdelaR, 2 Instituto de Biotecnología. CICVyA-INTA, 3 Instituto de Química Biológica. Unidad de Inmunología. Facultad de Ciencias/Facultad de Química- UdelaR, 4 Laboratorio de Fisiología y Genética de Actinomycetes. Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR-CONICET). Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas- Universidad Nacional de Rosario

La obtención de cepas mutantes de micobacterias en genes de interés no es sencillo debido a las características de la pared celular de las micobacterias, la cual dificulta tanto la entrada de ADN como la de potenciales drogas antituberculosas. Así, existen protocolos específicos para la preparación de las células a ser transformadas que incluyen la debilitación de la pared celular y el uso de altos voltajes durante la electroporación. Aún así, la eficiencia en la obtención de mutantes es muy baja, limitando la generación de mutantes, incluso mutantes en varios genes de interés. La estrategia habitual para la generación de cepas mutantes de micobacterias en genes de interés se basa en el uso de recombinación homóloga. En esta estrategia, inicialmente, se genera una cepa que exprese las recombinasas introducidas mediante una primera etapa de electroporación con un plásmido conteniendo dichas enzimas y resistencia a kanamicina. Una vez obtenida la cepa recombinante, se realiza una segunda electroporación introduciendo el fragmento a recombinar, que generalmente se trata de fragmentos up y down stream del gen de interés a mutar y un cassette que confiere resistencia a higromicina, que permite la selección posterior del mutante deseado. Recientemente se ha aplicado con éxito la estrategia CRISPR/Cas9 interferente en la generación de cepas mutantes de micobacterias. Con este método se puede modular simultáneamente la expresión de más de un gen insertando al genoma bacteriano un único plásmido que contenga dCas9 y diferentes sgRNAs. Esto es una ventaja respecto al uso de la recombinación homóloga donde solo se puede recombinar un gen a la vez. Además, la estrategia CRISPR/Cas9 es reversible, ya que se puede remover el plásmido insertado y volver a la expresión original del gen. En el presente trabajo se avanzó en la caracterización de la cepa mutante para el gen de la proteína PtpA obtenido previamente mediante recombinación homóloga. PtpA es una fosfatasa de tirosina, conocida factor de virulencia micobacteriano, secretado durante la infección de los macrófagos humanos. Dicho mutante se obtuvo en la cepa virulenta de *Mycobacterium tuberculosis* CDC1551 y actualmente se verificó la ausencia de secreción de PtpA al sobrenadante de cultivo, utilizando un anticuerpo anti-PtpA generado por el grupo. Además, se inició el desarrollo de la estrategia de CRISPR/Cas9 interferente para el gen de PtpA. Para ello se amplificaron y purificaron los plásmidos pRL58 y pRL19. Se obtuvieron los cebadores para generar el sgRNA que se ligó al plásmido pRL58, previamente digerido con la enzima BsmBI, y se analizaron por secuenciación los clones recombinantes obtenidos. En paralelo se inició el cultivo de la cepa vacunal no patógena, *Mycobacterium bovis* BCG, dado que el objetivo es aplicar esta estrategia a la obtención de cepas mutantes de PtpA, u otros genes micobacterianos, en cepas que podamos manipular en laboratorios BLS-II de Uruguay, en ensayos de infección.

DESENTRAÑANDO LA ENDOCITOSIS DE UREA, EL TRANSPORTADOR DE UREA DE ASPERGILLUS NIDULANS

J, Martínez¹. S, Amillis². A, Ramón¹. M, Sanguinetti¹.

1 Sección Bioquímica, Departamento de Biología Celular y Molecular, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, 2 Department of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, Greece

Un componente importante del mantenimiento de la homeostasis celular y las respuestas al estrés es la regulación de la composición de los transportadores en la membrana plasmática (MP), responsables de la absorción y extrusión de nutrientes y otras moléculas pequeñas no permeables. Los mecanismos generales que controlan este proceso están altamente conservados entre los organismos eucariotas e implican tanto la regulación transcripcional como la modulación del equilibrio de secreción, reciclaje y degradación de transportadores en respuesta a los cambios en el entorno extracelular. Con respecto a este último, la remoción selectiva de transportadores, mediada por un proceso de endocitosis, es uno de los más importantes mecanismos de regulación, ya que permite una rápida adaptación de las células a cambios en el ambiente. La endocitosis de los transportadores requiere de la ubiquitinación (unión covalente del polipéptido ubiquitina) de residuos específicos de Lys presentes en los mismos, por acción de ubiquitin-ligasas. En los hongos ascomicetes *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus nidulans* se ha determinado que la ubiquitin-ligasa Rsp5/HulA reconoce motivos PY (PPxY o LPxY) presentes en sus proteínas blancas, sin embargo, la mayoría de los transportadores carecen de estos motivos, por lo que su ubiquitinación depende de proteínas adaptadoras, denominadas alfa-arrestinas.

En este trabajo se busca aportar al conocimiento de estos mecanismos de degradación, utilizando como modelo UreA, el transportador de urea *A. nidulans*. Como antecedente de este trabajo se identificaron factores en trans (la ubiquitin-ligasa HulA y la proteína adaptadora ArtA), así como elementos en cis (2 Lys candidatas a ser ubiquitinadas así como un posible motivo de unión de ArtA) como candidatos para participar en el proceso de degradación de UreA. Para verificar si los elementos en cis y factores en trans previamente identificados participan o no en la degradación de UreA, se evaluó la degradación de este transportador en respuesta al estímulo endocítico por Western Blot. Asimismo se determinará si existe una interacción directa entre UreA y la proteína adaptadora ArtA, mediante un ensayo de complementación biomolecular de fluorescencia, BiFC, y ensayos de co-inmunoprecipitación. Por último, aplicando una estrategia de mutagénesis al azar intentaremos identificar otros elementos en cis que participen en la endocitosis de UreA.

CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE SRP EN EL FILO ASCOMYCOTA, CON ENFOQUE EN ASPERGILLUS NIDULANS.

AK, Gómez¹. M, Sanguinetti¹. A, Iriarte². AC, Ramón¹

1. Sección Bioquímica, Departamento de Biología Celular y Molecular, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, UDELAR, 2. Dpto. Desarrollo Biotecnológico, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, UDELAR

Las proteínas integrales de membrana (PIM) participan en una gran variedad de procesos biológicos, como el transporte de solutos (hacia o fuera de la célula) y la transducción de señales. Se caracterizan por poseer uno o más segmentos transmembrana hidrofóbicos, por lo que deben seguir vías especializadas durante su biosíntesis, que impidan que los trechos hidrofóbicos queden expuestos al medio citosólico, y así evitar la formación de agregados tóxicos para la célula.

La ruta de la Signal Recognition Particle (SRP) tiene un rol preponderante durante la síntesis de PIMs. SRP es un complejo ribonucleoproteico que reconoce secuencias señal (SS) presentes en los péptidos nacientes, en etapas tempranas de la traducción de PIMs, y guía a los complejos ribosoma-polipéptido naciente (RNC) a la membrana del retículo endoplásmico (RE), donde se completa su síntesis. A pesar del alto grado de conservación del mecanismo general en el que está implicado, SRP presenta una alta divergencia en composición, variando desde un solo componente proteico en bacterias, hasta seis subunidades en eucariotas. Es por esto que resulta de gran interés comprender su estructura, función y evolución.

Análisis previos de los componentes del complejo en hongos han mostrado diferencias relevantes en algunas especies con respecto a su equivalente en mamíferos, mejor caracterizado. Por ejemplo, se han encontrado diferencias en el largo, estructura y composición del dominio Alu, el cual está a cargo de la interacción con las SSs, y en generar una pausa traduccional mientras los RNCs son guiados hacia el RE. Además, el ARN que compone SRP ha mostrado ser muy variable, y se ha constatado la ausencia de ciertas proteínas constituyentes del complejo (SRP9 y 14) en algunas especies. Nuestro equipo ha realizado una búsqueda preliminar, en varios genomas disponibles de especies del filo Ascomycota, de la presencia/ausencia de las diferentes subunidades proteicas y estudiado su conservación a nivel de secuencia, y del ARN que compone SRP. En este trabajo nos proponemos ampliar y profundizar en el análisis evolutivo y caracterización de los componentes de SRP en el filo, realizando búsquedas en los numerosos genomas disponibles.

Además, a partir de los primeros resultados se ha constatado que la subunidad SRP14 de *Aspergillus nidulans* presenta una delección de 14 aminoácidos, en relación a la secuencia conservada en otros organismos. Dado que SRP14 es componente del dominio Alu, se verificó si existe una relación entre la presencia de una SRP14 divergente en *A. nidulans*, y la necesidad de dos codones lentos en el extremo N-terminal del transportador transmembrana de urea, UreA, para su correcta síntesis.

IDENTIFICACIÓN DE MOTIVOS DE SECUENCIA INVOLUCRADOS EN LA REGULACIÓN TRADUCCIONAL DURANTE LA TRANSICIÓN PROLIFERATIVA G1/S EN TRYPANOSOMA CRUZI

S, Chávez^{1,2,3}. MJ, Díaz¹. B, Garat¹. JR, Sotelo-Silveira³. MA, Duhagón^{1,2}

1 Sección Genómica Funcional. Facultad de Ciencias - UdelaR, 2 Departamento de Genética. Facultad de Medicina - UdelaR, 3 Departamento de Genómica. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Trypanosoma cruzi es el agente etiológico de la tripanosomiasis americana, una parasitosis transmitida por vectores muy extendida en regiones tropicales y subtropicales de América Latina. Este protozoario parásito presenta un ciclo de vida complejo que involucra múltiples estadios y alterna entre hospederos mamíferos e insectos. Aún queda mucho por conocer sobre los mecanismos que regulan la proliferación celular en T. cruzi, sin embargo, la evidencia sugiere que estos mecanismos difieren de los observados en las células del hospedador mamífero. Como antecedente, nuestro grupo determinó el transcriptoma del ciclo celular de T. cruzi (Chavez et al, 2017. Plos One), así como el traductoma (Ribo-seq) y el proteoma de las etapas involucradas en la transición proliferativa G1/S (Chavez et al, 2021. mSphere). Observamos una modulación modesta de la abundancia de los ARN mensajeros (99 genes FC>1.5) en la transición G1/S. Sin embargo, logramos identificar 1784 genes con traducción diferencial (FC>2, FDR<0.05) y 653 proteínas con niveles alterados (FC>1.5, FDR<0.05). Esto respalda la relevancia de la regulación post-transcripcional en los tripanosomátidos, incluso en este tipo de procesos que suceden en pocas horas. En busca de identificar regulones de traducción, analizamos el enriquecimiento de motivos de secuencia en las regiones 3'-UTR de genes con expresión diferencial en nuestros datos de Ribo-seq utilizando la suite MEME. Identificamos un motivo de secuencia de 7 nucleótidos (TAGAwkC) enriquecido en las regiones 3'-UTR de un subconjunto de genes con traducción más eficiente en la fase S. Luego investigamos la capacidad del motivo TAGAwkC para dirigir la expresión periódica de un gen reportero. Para esto, insertamos la secuencia 3'-UTR de un gen regulado en el ciclo celular (puf9) en un vector reportero de doble luciferasa y analizamos el patrón de expresión del gen reportero en parásitos de T. cruzi sincronizados que habían sido transfectados con la construcción. Pudimos observar un patrón de expresión del sistema reportero que coincide con los datos ómicos del gen analizado

EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA Y ABUNDANCIA DE FRAGMENTOS DERIVADOS DE VAULT ARNS HUMANOS Y SVTRNA2-1-5P COMO UN POSIBLE PEQUEÑO ARN FUNCIONAL EN CÁNCER DE PRÓSTATA.

E, Coitiño^{#1}. JD, Sheppard^{#2}. B, Garat¹. JR, Sotelo-Silveira^{2,3}. MA, Duhagon^{*1,4}. RS, Fort^{*1,2}.

1 Sección genómica funcional. Facultad de Ciencias - UdelaR; 2 Departamento de Genómica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo 11600; 3 Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo 11400, Uruguay; 4 Departamento de Genética, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo 11800, Uruguay.

Los vault ARNs (vtRNAs) son una clase de ARNs no codificantes de tamaño medio (84-141nts) transcritos por la ARN polimerasa III y forman parte de la partícula vault. En el humano existen 4 vtRNAs, y 3 de ellos (vtRNA1-1, vtRNA1-2 y vtRNA1-3) son componentes integrales de la partícula ubicados en el cromosoma 5q31.3. No obstante, el vtRNA2-1, un homólogo más divergente de los vtRNAs del clúster 1 que no es parte de la partícula vault, se ubica en un segundo locus (5q31.1).

Nuestros antecedentes muestran que líneas celulares humanas derivadas de diferentes tejidos contienen pequeños fragmentos de ARN (aproximadamente de 21nt) derivados de los vtRNAs. En particular, el vtRNA2-1/nc886 presenta un perfil de procesamiento marcado y más preciso que los otros vtRNAs, la abundancia de sus fragmentos derivados es alta (corresponde a la media de los microARNs) y depende de la presencia de DICER. Encontramos además una expresión aumentada de svtRNA2-1-5p/snc886-5p (el fragmento derivado del extremo 5' de vtRNA2-1) en el PrCa y su asociación con parámetros clínicos de la enfermedad. Extendimos el análisis de expresión de svtRNA2-1-5p/snc886-5p y svtRNA2-1-3p/snc886-3p a células tumorales y normales de diversos tejidos. Los resultados sugieren que el procesamiento de vtRNA2-1/nc886 a pequeños ARNs sufre un cambio de preferencia de brazo ("arm switching") durante la carcinogénesis. La evidencia global reportada de expresión y ensayos funcionales en cáncer para svtRNA2-1-5p/snc886-5p lo postulan como oncogén.

El presente trabajo analiza la presencia y abundancia de los fragmentos derivados de vtRNAs en diferentes sets de datos transcriptómicos disponibles en repositorios públicos para evaluar su potencial funcional como microARNs en diferentes células humanas. Para ello analizamos su posible asociación a las proteínas argonautas (AGOs) en transcriptomas públicos de pequeños ARNs no codificantes. Asimismo, extendimos el estudio de presencia de fragmentos derivados de vtRNAs en muestras de tejido, plasma, suero, vesículas extracelulares y/o exosomas de pacientes con PrCa y controles disponibles en repositorios de datos públicos. Además, determinamos la cuantificación de la expresión de svtRNA2-1-5p/snc886-5p mediante qRT-PCR en líneas celulares modelo de cáncer de próstata. Finalmente, evaluamos el efecto funcional de la modulación de svtRNA2-1-5p/snc886-5p en el fenotipo proliferativo en células de próstata, mediante ensayos de viabilidad celular.

ESTUDIO DE LA REACCIÓN DE CITOCROMO C CON SULFURO DE HIDRÓGENO Y SU PARTICIPACIÓN EN REACCIONES DE PERSULFURACIÓN.

M, Pose^{1,2}. M, Scocozza^{3,4}. D, Murgida^{3,4}. S, Carballal^{1,2}. R, Radi^{1,2}

1Centro de investigaciones Biomédicas (CEINBIO), 2 Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República (UdelaR), 3 Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (UBA), 4 Instituto de Química Física de los Materiales, Medio Ambiente y Energía (INQUIMAE), CONICET-Universidad de Buenos Aires (UBA)

El sulfuro de hidrógeno (H₂S) es una molécula gasotransmisora a nivel celular, cuyos mecanismos de transducción de señales se encuentran bajo estudio, siendo una de las vías propuestas su reacción con centros metálicos.

El citocromo c es una hemoproteína mitocondrial central para el metabolismo celular, que juega un papel fundamental en varios procesos que van desde la respiración hasta la apoptosis. Bajo diferentes contextos celulares, el citocromo c es capaz de adoptar una variedad de conformaciones alternativas (proteoformas), ampliamente estudiadas, por lo que resulta particularmente interesante en el contexto de la señalización mediada por H₂S.

Se propone que la reacción redox entre H₂S y citocromo c podría actuar como una forma de transducción de señales, al promover la modificación postraducciona de proteínas por persulfuración. En este trabajo hemos estudiado la reacción del H₂S con citocromo c nativo y con diferentes proteoformas, como el citocromo c mononitrado en Tyr74 y Tyr 97, carboximetilado en Met80 y la mutante Met80Ala. Se realizaron estudios cinéticos así como análisis por espectroscopía Raman Resonante de dichos citocromos expuestos a H₂S y H₂S₂. También se evaluó la influencia del H₂S sobre la actividad peroxidática de citocromo c, actividad que adquieren algunas proteoformas.

Mediante los estudios de cinética estacionaria y cinética rápida realizados, en conjunto con el análisis por espectroscopía Raman Resonante, se logró una mejor comprensión del mecanismo de reacción entre H₂S y las diferentes proteoformas de citocromo c, aportando al entendimiento de la posible interacción entre estos componentes a nivel celular. También se vió que el H₂S es capaz de influir sobre la actividad peroxidática de dicha proteína.

UROLITINA A COMO MODULADOR DE LA NEUROINFLAMACIÓN EN CÉLULAS MICROGLIALES

M, Pérez^{1,2}. S, Garcimartín^{1,2}. A, Aicardo^{1,2,3}. R, Radi^{1,2}. C, Chavarría^{1,2}

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

Debido al rápido envejecimiento de la población mundial, la incidencia de enfermedades neurodegenerativas ha aumentado durante las últimas décadas. Llevar un estilo de vida saludable, incluyendo una alimentación adecuada, constituye una estrategia importante para retrasar la aparición de estas enfermedades y minimizar el deterioro cognitivo relacionado con la edad. Los bioactivos son metabolitos secundarios presentes en cantidades reducidas en los alimentos. Su relevancia va más allá de las funciones nutricionales, ya que tienen la capacidad de brindar beneficios a la salud. La urolitina A (UA) es un derivado del ácido elágico que se obtiene producto del microbioma intestinal. El ácido elágico se encuentra en determinadas frutas, semillas y frutos secos. Se ha demostrado que la UA es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, presentando efectos neuroprotectores tanto in vivo como in vitro.

Utilizando la línea celular de microglía BV-2, estudiamos cómo la UA afecta la producción de citoquinas y la generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Cuando se expone a las células BV-2 a bajas concentraciones de UA (0.5 a 5 μ M), presentan una baja toxicidad, evaluada a través del ensayo MTT. Esto se acompaña de una reducción en los niveles de nitritos.

En este contexto, después de activar las células BV-2 mediante la exposición a diversos estímulos (LPS, ATP y citoquinas), se induce la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible y la producción de citoquinas pro-inflamatorias. La UA modula los niveles de citoquinas pro-inflamatorias. Para evaluar la relación entre células gliales y neuronas, células PC12 diferenciadas se expusieron a medios condicionados obtenidos de microglía activada. La UA mostró una ligera protección contra la muerte de las PC12 inducida por los medios condicionados. Estos resultados podrían determinar el potencial de la UA, como un bioactivo derivado de los alimentos, y su impacto en la neuroprotección.

COMPUESTOS LIBERADORES DE ÓXIDO NÍTRICO CON ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA E INHIBIDORA DE SURVIVINA EN CÉLULAS DE CÁNCER DE VEJIGA

M, López ^{1,2}. M, Varela ^{1,2}. M, Ingold ². V, Perini ¹. K, Perelmuter ³. M, Bollati-Fogolín ³. G, López ^{2,4}. P, Hernández ¹

1 Departamento de Genética, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Avenida Italia 3318, Montevideo 11600, Uruguay. 2 Laboratorio de Biología Vascular y Desarrollo de Fármacos, Institut Pasteur Montevideo, Mataojo 2020, Montevideo 11400, Uruguay. 3 Cell Biology Unit, Institut Pasteur Montevideo, Mataojo 2020, Montevideo 11400, Uruguay. 4 Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República, Avenida General Flores 2124, Montevideo 11800, Uruguay

El cáncer de vejiga es una de las enfermedades genitourinarias predominantes y es uno de los tipos de cáncer más común en hombres. La desregulación de la vía NF-κB juega un rol importante en la progresión del cáncer y la metástasis celular. En las células de cáncer de vejiga la activación de la vía NF-κB induce la expresión de survivina. Esta promueve la resistencia a la apoptosis, la proliferación de células cancerosas y juega un papel importante en la regulación de la reparación de fracturas en el ADN. En este trabajo presentamos el estudio de tres compuestos liberadores de óxido nítrico como posibles terapias frente a esta patología. Para ello, en primer lugar determinamos la capacidad liberadora de óxido nítrico de las moléculas. Luego, evaluamos la capacidad de inhibir la proliferación y migración celular y el efecto genotóxico sobre dos líneas celulares derivadas de cáncer de vejiga. Finalmente, determinamos la inhibición de la vía NF-κB y la inhibición de la expresión de la survivina. Los resultados revelaron que los compuestos liberadores de óxido nítrico 1 y 3 inhiben la proliferación celular de células de cáncer de vejiga con alta selectividad e inducen daño al ADN a través de un mecanismo que implica la liberación de NO y la inhibición de la survivina. Además, el compuesto 3 redujo la migración de las células de cáncer de vejiga. En conclusión, este estudio sugiere que los liberadores de óxido nítrico son moléculas prometedoras para el desarrollo de nuevas terapias dirigidas frente a los mecanismos subyacentes de la tumorigénesis y la progresión del cáncer de vejiga.

PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DE UN COCULTIVO DE LEVADURAS

L, Camesasca¹. S, Batista². C, Lareo¹

1. Departamento de Bioingeniería, Instituto de Ingeniería Química. Facultad de Ingeniería-UdelaR, 2. Laboratorio de Microbiología Molecular. IIBCE

El ácido láctico es un ácido orgánico de gran potencial biotecnológico, pudiendo ser utilizado en la industria alimentaria (acidulante, antimicrobiano), cosmética (peelings, emulsiones hidratantes), así como también en la industria farmacéutica en la formulación de diversos medicamentos. También se destaca su uso para la síntesis de ácido poliláctico (PLA). Este biopolímero ha alcanzado gran auge como alternativa frente a la contaminación provocada por los envases plásticos, ya que su producción es relativamente económica, pudiendo biodegradarse en condiciones de compostaje. La utilización de microorganismos para la síntesis de ácido láctico representa no sólo una alternativa más verde de producción, sino que también brinda la posibilidad de obtener isómeros ópticos puros de este ácido. Esto resulta de gran interés tanto para la industria alimentaria, como para la polimerización del ácido, obteniendo PLA. Por su parte, las levaduras como opción de microorganismo productor se destacan por ser industrialmente robustas, pudiendo tolerar medios de cultivo ácidos sin la necesidad de agregar alcalinizantes al mismo.

En este trabajo se utilizó una cepa modificada de *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 mutada en los genes PDC1 y ADH1, que sobreexpresa el gen que codifica para la L-lactato deshidrogenasa de *Bos taurus*, clonado en un plásmido de alto número de copias (p426GPD). Esta cepa, modificada dentro del marco de este trabajo, produce ácido láctico en concentraciones del orden de g/L, aunque estos niveles son aún muy bajos para un potencial uso industrial. Como alternativa para aumentar los niveles de ácido láctico, se llevó a cabo una estrategia de co-cultivo de esta cepa con otra levadura, *Lachancea thermotolerans*, cedida por el Área Enología y Biotecnología de las Fermentaciones, Departamento de Ciencias y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Química. Esta levadura, productora nativa de ácido láctico, suele ser utilizada en co-cultivo con cepas de *Saccharomyces* en la elaboración de vinos con el objetivo de acidificar y disminuir el contenido de etanol en los mismos. En este caso, en lo que refiere a los niveles de ácido láctico se logró un aumento del 18% en los niveles de producción con respecto a los valores obtenidos para *L. thermotolerans* en cultivo puro y un aumento del 26% en relación al cultivo puro de BY4741 modificada. En lo que refiere al contenido de etanol, se logró una disminución del 13% en relación al contenido alcohólico del cultivo puro de BY4741 modificada. En etapas posteriores se prevé evaluar otras condiciones de co-cultivo que puedan favorecer la producción de ácido láctico, incluyendo distintas temperaturas de crecimiento y composición del medio.

ESTUDIOS DE TRANSCRIPTÓMICA COMPARATIVA EN AMASTIGOTAS AXÉNICOS VERSUS AMASTIGOTAS CELULARES DE TRYPANOSOMA CRUZI

L, Bilbao^{1,2}. B, Garat¹. JR, Sotelo^{3,4}. L, Pérez¹. P, Smircich^{1,2}.

1. Sección Genómica Funcional. Facultad de Ciencias - UdelaR 2. Laboratorio de Bioinformática. Departamento de Genómica-IIBCE 3. Departamento de Genómica-IIBCE 4. Sección Biología Celular. Facultad de Ciencias - UdelaR

Trypanosoma cruzi es el agente causante de la enfermedad de Chagas, un serio problema de salud pública en gran parte de la población de las Américas. Este organismo tiene un ciclo de vida complejo alternando entre formas que viven en el insecto vector y formas que infectan el hospedero mamífero. En particular, la forma epimastigota presente en el aparato digestivo del insecto es el estadio más frecuentemente utilizado como modelo de laboratorio dada la practicidad de su cultivo. Sin embargo, preguntas específicas y relevantes para los modelos de la patología de la enfermedad crónica requieren de las formas intracelulares (amastigotas) y por lo tanto se han desarrollado métodos para su producción tanto in vitro (axénicos) como in vivo (celulares). Aunque los protocolos de amastigogénesis in vitro resultan más prácticos, su validez biológica ha sido cuestionada por la comunidad. En este proyecto se pretende caracterizar desde el punto de vista transcriptómico los amastigotas celulares y los axénicos, distinguiendo perfiles diferenciales que permitan evaluar los últimos como modelo molecular en diferentes tipos de preguntas biológicas. El modelo de amastigota axénico propuesto presentó características similares a los celulares en cuanto a la esperada regulación negativa de proteínas flagelares y glicoproteínas de superficie, mientras que los procesos vinculados a la división celular y proliferación, metabolismo del proteasoma y sobrevivencia del parásito, no fueron recapitulados por este modelo. Interesantemente, algunos de los resultados apuntan a que podrían representar fases iniciales del proceso de diferenciación. Actualmente nos encontramos optimizando el protocolo de amastigogénesis axénica mediante la evaluación de procesos metabólicos característicos de amastigotas celulares haciendo uso de marcadores moleculares definidos a partir de las listas de genes diferenciales obtenidas en los resultados anteriores.

ANÁLISIS DE UNA REGIÓN DEL GEN DBB2 EN CARCINOMA OCULAR DE CÉLULAS ESCAMOSAS EN BOVINOS (BOSCC)

G, Leites¹. L, Solla¹. L, Pacheco¹. M, Montenegro¹. N, Balemian¹

1. Unidad de Genética y Producción Animal, Facultad de Veterinaria- Udelar

Análisis de una región del gen DBB2 en carcinoma ocular de células escamosas en bovinos (BOSCC)

El carcinoma ocular de células escamosas en bovinos (BOSCC) es una neoplasia muy común en bovinos con región ocular y periocular despigmentada que están expuestos a radiación UV. Esta puede originarse en diferentes tejidos como la córnea, los párpados, la unión corneoescleral, entre otros. Esto hace que sea muy frecuente en animales de la raza Hereford ya que estos presentan hipopigmentación facial genéticamente seleccionada por su estándar racial. El gen DDB2 codifica una proteína de reparación de daños producidos por la radiación UV (<https://www.genecards.org>). Estudios realizados en dos razas equinas con este tipo de carcinoma mostraron que existe una mutación sin sentido en el exón 7 de dicho gen que los hace susceptibles al desarrollo de la misma (Knickelbeinetal., 2019). En este trabajo se pretende determinar si dicha mutación presente en equinos se encuentra en la región homóloga del gen DDB2 en bovinos con BOSCC.

Objetivos

Analizar la presencia de una mutación descrita en equinos en el exón 7 del gen DDB2 en la región homóloga en bovinos con carcinoma ocular de células escamosas.

Comparar las secuencias amplificadas a partir de tejido tumoral y de sangre en un mismo individuo y respecto a referencia de la base de datos.

Materiales y métodos.

Se realizó la extracción de ADN a partir de tejido tumoral y de sangre de 7 animales diagnosticados con BOSCC mediante histopatología. Se diseñaron primers mediante el programa primer-BLAST (Ye et al 2012) y se amplificó la región de interés mediante PCR. Los amplicones resultantes se corrieron en gel de agarosa al 1%, se visualizaron en transiluminador y fueron enviados a secuenciar a MACROGEN (Korea). Las secuencias fueron alineadas mediante el programa Bioedit (Hall, 1999).

Resultados

Las regiones amplificadas del exón 7 del gen DBB2 a partir de ADN de tejido tumoral y de sangre fueron alineadas respecto a la secuencia de referencia del gen de la base de datos ensembl (www.ensembl.org). Se analizó la región homóloga del gen bovino donde se encuentra la mutación descrita en equinos. En ninguna de las muestras analizadas se detectó dicha mutación. Al comparar tejido tumoral y sangre en otras regiones del gen de un mismo individuo, se detectaron variantes específicas de dicho tejido en tres posiciones de la secuencia. Los cambios a nivel del tejido tumoral coincidieron en la mayoría de los individuos ya que estos presentaron mutaciones comunes en las mismas posiciones del gen. Para determinar si estas variantes generan cambios a nivel de la proteína codificada se realizó la traducción de la secuencia y se observó que estas variantes generan cambios en la secuencia de aminoácidos y por lo tanto en la proteína. Se realizará un estudio más profundo de estas mutaciones con un mayor número de individuos para poder determinar su posible implicancia en el desarrollo de BOSCC.

ESTUDIO DEL EFECTO DEL vtRNA2-1/nc886 EN LA BIOLOGÍA DEL CÁNCER DE PRÓSTATA MEDIADO POR FACTORES EXTRACELULARES

CL, Colantuono^{1,2}. C, Oliveira-Rizzo^{1,2}. RS, Fort^{2,3}. MA, Duhagon^{1,2}

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

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 ARN no codificantes (ncRNAs) objeto de intensa investigación para esta aplicación. Nuestro grupo investiga el papel de un ncRNA de tipo bóveda llamado vtRNA2-1/nc886 en el PrCa. Este ARN tiene un papel supresor de tumor en el PrCa, aunque en otros tejidos funciona como un oncogén. Si bien se sabe que la actividad reguladora de vtRNA2-1/nc886 requiere fundamentalmente de su interacción directa con proteínas citosólicas (PKR, OAS1, Dicer, Snail, p62), sus mecanismos de acción no se encuentran bien definidos y probablemente varían entre 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 (Fort et al., 2018), y experimentos de pull down de ARN identificaron proteínas de la misma vía (Lee et al., 2011). Esto sugiere que vtRNA2-1/nc886 podría participar en la vía exosomal y permanecer como carga en exosomas o microvesículas. Por otro lado, nuestros datos, junto con otros, indican que este ARN 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, ejerciendo una función de comunicación en el microambiente tumoral. En el presente trabajo, nuestro objetivo es determinar si vtRNA2-1/nc886 induce señales secretadas capaces de modificar el comportamiento celular en el PrCa, modulando atributos neoplásicos básicos. Se generaron transfectantes estables de vtRNA2-1/nc886 o un control (ctrl) en la línea celular LNCaP, y se verificó el efecto antiproliferativo esperado. Se analizó la modulación de un grupo de citocinas y quimiocinas en los transfectantes vtRNA2-1/nc886+ frente a ctrl mediante qRT-PCR y ensayos con genes reporteros. Se llevó a cabo un análisis preliminar de la remodelación del secretoma inducida por vtRNA2-1/nc886. Además, se realizó una primera evaluación de la localización de vtRNA2-1/nc886 en el compartimento extracelular. Nuestros resultados preliminares respaldan el papel de vtRNA2-1/nc886 como mediador de señales paracrin.

LIPOXIGENASAS EN MACRÓFAGOS HUMANOS DE FENOTIPOS M1 Y M2

S, Abramo^{1,2}. M, Mastrogiovanni^{1,2}. H, Rubbo^{1,2}. L, González Perilli^{2,3,4}

1. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República. 2. Centro de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República. 3. Unidad Académica de la Licenciatura en Biología Humana, Universidad de la República. 4. Departamento de Educación Médica, Facultad de Medicina, Universidad de la República.

La plasticidad fenotípica de los macrófagos es determinante en la transición entre la fase inicial del proceso inflamatorio y el restablecimiento de la homeostasis tisular. Estos eventos están orquestados por una variedad de mediadores lipídicos que ejercen funciones proinflamatorias y antiinflamatorias o resolutorias. Estos lípidos bioactivos son sintetizados por enzimas lipoxigenasas (LOX), ciclooxigenasas (COX) y citocromos P450 de macrófagos a partir de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), principalmente ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico y ácido docosahexaenoico. En este trabajo se estudia la expresión y localización subcelular de las isoformas de LOX humana en los fenotipos de macrófagos clásico (M1) y alternativo (M2), así como su perfil de mediadores lipídicos asociados. Para ello, monocitos de la línea celular THP-1 humana y monocitos primarios purificados de sangre venosa se diferenciaron a macrófagos y se polarizaron con lipopolisacárido o interleuquina-4. Los fenotipos M1 y M2 resultantes se verificaron mediante citometría de flujo y ELISA. Se analizó la expresión de los marcadores fenotípicos óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y Arginasa 1, así como la expresión de las isoformas LOX y COX. Mientras que 5-LOX se expresó en ambos fenotipos, 15-LOX1 y 15-LOX2 se observaron solo en macrófagos M2. El análisis de oxilipinas realizado por LC-MS en macrófagos polarizados suplementados con PUFA y estimulados con Zymosan, mostró: i) un aumento de 15-HETE y 15-oxoETE en el fenotipo M2; ii) ausencia de diferencias en la producción de 5-HETE entre fenotipos; iii) un aumento de derivados monohidroxilados de DHA vía 5-LOX en M1. Si bien parte de estos resultados se corresponden con el perfil de expresión de isoformas LOX observado, el último punto no se explicaría por una expresión diferencial de 5-LOX ni por la disponibilidad de sustrato, lo que sugiere que podrían estar involucrados otros mecanismos de regulación. Ensayos en curso de inmunofluorescencia mediante microscopía confocal muestran diferencias en la localización subcelular de las LOX de los fenotipos macrofágicos que podrían dar respuesta a esta interrogante.

CAMBIOS FENOTÍPICOS EN LOS PERICITOS DEL MODELO MURINO DE ELA SOD1G93A

E, Isasi^{1,2}. M, Stancov². V, Lagos¹. L, Martinez-Palma¹. S, Olivera-Bravo². V, Abudara³. P, Cassina¹

1. Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular, Unidad Académica de Histología y Embriología, Facultad de Medicina-UdelaR. 2. Departamento de Neurobiología y Neuropatología, Instituto Clemente Estable- MEC. 3. Laboratorio de Comunicación Celular, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina- UdelaR.

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa progresiva y terminal que se caracteriza por la afectación de motoneuronas que lleva a la parálisis muscular y muerte de los pacientes 3-5 años luego del diagnóstico. En ELA, se ha reportado compromiso de la barrera hemato-encefálica y hemato-medular, reducción del flujo sanguíneo, disminución de la densidad capilar, alteración de pies terminales astrocitarios y disminución de pericitos, tanto en pacientes como en modelos animales. Además, las alteraciones neurovasculares ocurrirían tempranamente y podrían anteceder al daño neuronal en el modelo transgénico SOD1G93A. El presente trabajo propone estudiar a los pericitos aislados e in situ en la médula espinal de ratas portadoras de la mutación SOD1G93A para evaluar diferencias celulares y funcionales que puedan explicar el desarrollo de las anomalías neurovasculares. Nuestros resultados preliminares muestran que los pericitos cultivados de animales SOD1G93A de 3-4 semanas versus no-transgénicas, presentan aumento de la proliferación y de la expresión del receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFRb) sin cambios significativos en el metabolismo mitocondrial. Por otro lado, los pericitos cultivados SOD1G93A mostraron un incremento de la permeabilidad de la membrana plasmática pericitaria, a través de hemicanales, que también se observó en pericitos in situ presentes en rodajas agudas de médula espinal de ratas SOD1G93A de 4 semanas. Por otro lado, en ratas transgénicas con síntomas de ELA (6-7 meses), se observó menor cantidad de pericitos, y mayor número de células, posiblemente de estirpe glial, que presentan canales de gran poro abiertos, rodeando a motoneuronas degenerantes. En suma, nuestros resultados sugieren cambios fenotípicos tempranos en los pericitos SOD1G93A y un aumento de la permeabilidad de membrana plasmática pericitaria mediada por canales de gran poro lo que podría tener implicancias en la comunicación celular con otros componentes de la unidad neurovascular.

EL MICROBIOMA INTESTINAL EN LA RESPUESTA A LA INMUNOTERAPIA: LECCIONES DE UNA COHORTE URUGUAYA

F, Peñalba¹. N, Riera¹. V, Flórez¹. A, Parada¹. N, Elgul¹. A, Pittini². C, Meyer³. ML, Cawen³. A, Ferrari³. E, Laureiro³. MI, Alonso³. S, Malvasio³. N, Berois². E, Osinaga². G, Iraola^{1,4}

1. Laboratorio de Genómica Microbiana, Institut Pasteur de Montevideo 2. Laboratorio de Glicobiología e Inmunología Tumoral, Institut Pasteur de Montevideo 3. Departamento de Oncología, Centro Asistencial del Sindicato Médico del Uruguay 4 Wellcome Sanger Institute

Los anticuerpos monoclonales dirigidos a los puntos de control inmunitarios han revolucionado el tratamiento del cáncer avanzado. Las drogas dirigidas al antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4) y el eje PD-1/PD L1 han mostrado tener resultados favorables. Nuevos estudios apuntan a que el microbioma intestinal tiene un rol de “doble filo” y puede mediar una respuesta exitosa, o por el contrario, generar efectos inmunes adversos. El microbioma intestinal se encuentra significativamente influenciado por factores ambientales, el estilo de vida y la localización geográfica. La identificación de biomarcadores para predecir la respuesta y toxicidad emerge como blanco para mejorar el resultado clínico. Es fundamental profundizar la comprensión del papel de la microbiota a nivel regional, con el objetivo de aplicar este conocimiento de manera efectiva en el ambiente clínico. En este trabajo, realizamos la caracterización del microbioma intestinal de 25 pacientes oncológicos (cáncer de pulmón, melanoma, orofaringe y riñón), antes y después de comenzar el tratamiento con inhibidores de puntos de control inmunitario. Utilizando secuenciación metagenómica y técnicas dependientes de cultivo determinamos la composición microbiana de la cohorte seleccionada. Utilizando una cohorte uruguaya sana como referencia (n=68) comparamos la abundancia relativa de diferentes poblaciones, genes y rutas metabólicas en ambas cohortes. La composición microbiana de la cohorte de los pacientes oncológicos difiere de la cohorte control. Los resultados mostraron una abundancia relativa más alta de *Enterococcus faecium* y *Klebsiella pneumoniae* en el intestino de pacientes oncológicos comparado a los individuos sanos.

Un meta-análisis de estudios previos realizados en distintas regiones del mundo fue utilizado para identificar posibles biomarcadores microbianos asociados con la respuesta a la inmunoterapia. No encontramos ninguna característica microbiana única asociada con la respuesta a la inmunoterapia en los datos públicos ya existentes. Utilizando técnicas dependientes de cultivo, hemos establecido el primer biobanco microbiano uruguayo de muestras pertenecientes al microbioma intestinal. Hasta la fecha, hemos llevado a cabo más de 6000 aislamientos microbianos. Estos resultados podrán ser utilizados en el futuro para impulsar el desarrollo de nuevas intervenciones clínicas.

CARACTERIZACIÓN DE LA MAQUINARIA TRADUCCIONAL DE *TRYPANOSOMA CRUZI* DURANTE LA METACICLOGÉNESIS Y EL CICLO CELULAR

M, Rivara Espasandín^{1,2}. S, Radío³. S, Chávez². MA, Duhagon^{2,4}. P, Smircich^{1,4}. J, Sotelo-Silveira^{1,5}

1. Departamento de Genómica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, MEC; 2. Departamento de Genética, Facultad de Medicina, Universidad de la República; 3. Institute of Evolutionary Biology (CSIC-Universitat Pompeu Fabra), 08003, Barcelona, Spain; 4. Sección 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), el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, regula su expresión génica principalmente a través de mecanismos post-transcripcionales. Nuestro grupo observó que la regulación de la traducción es un mecanismo importante durante la metaciclogénesis así como durante la transición G1/S del ciclo celular. Recientemente, diversos grupos de investigación han observado mediante diferentes aproximaciones y en distintos modelos de estudio, que la composición de los ribosomas puede ser variable a nivel de proteínas, teniendo implicancias en la regulación de la expresión génica. Por lo tanto, nos propusimos realizar una caracterización detallada de la maquinaria traduccional de T. cruzi en los estadios epimastigota y tripomastigota metacíclico, así como en las fases G1 y S del ciclo celular. En primer lugar, revisamos y pulimos la anotación actual de las proteínas ribosomales (PR), analizando el número de copias, la ubicación en el ribosoma, extensiones de proteínas en los extremos terminales, datos de expresión, así como posibles funciones extra-ribosomales. Abordando esta caracterización de forma experimental, observamos mediante la técnica de Ribo-Seq que existe una represión global de la traducción de los ARNm que codifican PR en el estadio tripomastigota metacíclico, pero también observamos que existe variación a nivel individual, encontrando algunos ARNm de PR que resisten esa represión. También aplicamos un enfoque multi-ómico (RNAseq, Ribo-Seq y proteómica) para estudiar poblaciones de parásitos sincronizados en las fases G1 y S del ciclo celular. Observamos variación individual en los cambios de eficiencia traduccional de los mRNAs que codifican PR y también a nivel de estado estacionario de las PR. Estas observaciones podrían estar en línea con la hipótesis de que la composición de la maquinaria de síntesis de proteínas puede ser variable durante estas transiciones. Para explorar esta hipótesis en profundidad, planeamos realizar proteómica cuantitativa en fracciones enriquecidas en ribosomas, tanto en los estadios del ciclo de vida epimastigota y tripomastigota metacíclico como en parásitos sincronizados en las fases G1 y S del ciclo celular.

BIOQUÍMICA Y ESTRUCTURA DE PROTEÍNAS

ESTUDIOS ESTRUCTURALES SOBRE LA ACONITASA MITOCONDRIAL Y SU INTERACCIÓN CON LA FRATAXINA

S, Mansilla^{1,2}. V, Tórtora^{1,3}. S, Sastre^{1,4}. J, Santos⁵. A, Zeida^{1,6}. L, Castro^{1,6}

1 Centro de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Medicina, Udelar, 2 Departamento de Métodos Cuantitativos, Facultad de Medicina, Udelar, 3 Departamento de Educación Médica, Facultad de Medicina, Udelar, 4 Departamento de Biofísica, Facultad de Medicina, Udelar, 5 Instituto de Biociencias, Biotecnología y Biología traslacional, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad de Buenos Aires, 6 Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Udelar

Hemos demostrado previamente que la aconitasa mitocondrial humana (ACO2) es un objetivo excepcionalmente sensible al radical superóxido, peróxinitrito y radical carbonato, al reaccionar con su centro catalítico $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ con constantes de velocidad de segundo orden que varían desde 10^5 hasta $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. La oxidación del centro lleva a la formación de un centro $[3\text{Fe-4S}]^+$ inactivo y la liberación simultánea de un átomo de hierro(II) no unido a cisteínas. Además, hemos presentado evidencia experimental e in silico que respalda que la frataxina (FXN), una proteína que participa en la biosíntesis de centros Fe-S en la mitocondria, es capaz de promover la reactivación de la ACO2 tras su inactivación oxidativa.

En este trabajo se presentan espectros de dicroísmo circular de la $[3\text{Fe-4S}]^+$ -ACO2 sola o después de la adición de Fe^{2+} y DTT, o FXN pre-cargada con Fe^{2+} , y hemos seguido las bandas en el rango de 300 a 800 nm asociadas a la integridad del centro Fe-S. El espectro de CD de la ACO2 reconstituida fue similar a lo reportado previamente para otras proteínas con centros ferrosulfurados, presentando dos picos positivos en 425 y 610 nm de aproximadamente la misma magnitud y un pico negativo 4 veces más grande en los 370 nm. Los cambios en los espectros de CD estuvieron en línea con un cambio menor en el hombro observado en los espectros UV-vis alrededor de 400 y 600 nm, y con la ganancia de actividad catalítica. Después de la incubación en presencia de Fe^{2+} y DTT, se observó un incremento en las señales tanto en los espectros de CD o UV-vis, siendo este efecto potenciado por la adición de FXN, reflejando la mejora en la formación de la $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -ACO2.

Actualmente estamos llevando a cabo estudios in silico para estudiar el efecto de FXN en la dinámica de la $[3\text{Fe-4S}]^+$ -ACO2 y la $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -ACO2. Los modelos iniciales utilizados para este enfoque incluyen aquellos obtenidos a través de AlphaFold2 y el docking realizado con HADDOCK 2.4. El impacto de algunas modificaciones post-traduccionales en la estructura de la ACO2 también se están considerando en estos estudios.

CONSECUENCIAS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE LA NITRACIÓN DE TIROSINAS EN LA CHAPERONA HSP90.

A, Taboada^{1,2,3}. T, Chatterjee⁴. R, Radi^{1,2}. MC, Franco^{5,6}. A, Zeida^{1,2}

1 Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina - UdelaR, 2 Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO). Facultad de Medicina - UdelaR, 3 Departamento de Métodos Cuantitativos. Facultad de Medicina - UdelaR, 4 Department of Biochemistry and Biophysics. College of Science. Oregon State University. USA, 5 Center for Translational Science. Florida International University. Florida. USA, 6 Herbert Wertheim College of Medicine. Florida International University. Florida. USA.

La nitración de tirosinas proteicas, es una modificación postraducciona oxidativa que afecta notablemente las propiedades fisicoquímicas de dicho residuo. Más aún, esta modificación puede tener un impacto importante en la función de las proteínas que la contienen. Un ejemplo paradigmático de cambio de función mediada por la nitración de tirosinas, es el caso de la chaperona Hsp90 (heat shock protein 90KDa). Esta proteína, de central importancia para el mantenimiento de la homeostasis celular y en respuestas a estrés celular en todas las células eucariotas, puede ser blanco de nitración ante estrés oxidativo, en una o dos tirosinas de su dominio catalítico. La nitración de estas tirosinas conlleva cambios importantes de la función proteica, habiéndose asociado con inducción de muerte celular y regulación del metabolismo mitocondrial en motoneuronas, por ejemplo. Sin embargo, los cambios estructurales y dinámicos que surgen a partir de esta modificación química no están caracterizados aún.

En presente trabajo, mediante la combinación de técnicas experimentales y de simulación computacional, buscamos entender las bases moleculares que conectan la nitración proteica con cambios en su estructura y dinámica, que permitan explicar las diferencias observadas en la función de la chaperona. Experimentos de actividad enzimática y ultracentrifugación analítica nos permiten sugerir como la nitración de las tirosinas implicadas modula la función proteica. A su vez, diferentes protocolos de dinámica molecular nos guían a proponer hipótesis estructurales con respecto la nitración en cada una de las tirosinas implicadas: la nitración de la tirosina 56 podría afectar su interacción con la región ATP lid, y así su dinámica; con respecto al rol de la nitración de la tirosina 33, esta modificación podría estar alterando la interacción con una arginina del protómero vecino, importante para la estabilización del ATP y la dinámica de apertura y cierre de la enzima.

En suma, este trabajo constituye un primer avance hacia la comprensión del impacto estructural y dinámico que la nitración específica de tirosinas tiene en la función de esta importante chaperona celular.

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA, ESTRUCTURAL Y MECANÍSTICA DE LA METIONINA SULFOXIDA REDUCTASA A DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

S, Sastre^{1,2,3}. B, Manta⁴. JA, Semelak⁵. DA, Estrin⁵. M, Trujillo^{1,3}. R, Radi^{1,3}. A, Zeida^{1,3}.

1- Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. 2- Departamento de Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. 3- Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. 4- Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay 5- Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física, Instituto de Química Física de los Materiales, Medio Ambiente y Energía (INQUIMAE), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires and CONICET, Buenos Aires, Argentina.

Mycobacterium tuberculosis (Mt) es el patógeno responsable de la enfermedad de la tuberculosis. Como parte de la respuesta antimicrobiana, los macrófagos generan especies reactivas de oxígeno y nitrógeno que provocan daño nitro-oxidativo en las biomoléculas de Mt. Una de las enzimas en Mt encargada de mitigar este daño oxidativo es la metionina sulfoxida reductasa A (MtmsrA), que cataliza la reducción estereoespecífica del sulfóxido S de metionina.

El ciclo catalítico de MtmsrA comprende tres pasos. Inicia con la reducción de Met-S-SO, realizada por una cisteína reactiva que se oxida a ácido sulfénico, liberando la metionina reducida. Existe controversia sobre la naturaleza de los intermediarios de reacción durante este proceso, proponiéndose que la reducción de la sulfoxida ocurre a través de un primer intermediario sulfano, seguido de un segundo intermediario sulfonio, que da lugar al ácido sulfénico. Los pasos segundo y tercero implican la formación de un disulfuro intramolecular entre el ácido sulfénico y la cisteína reactiva, seguido de su reducción mediante el sistema de tiorredoxina.

En este trabajo, empleamos diversas técnicas computacionales y experimentales, incluyendo experimentos de cinética rápida y en estado estacionario, cálculos de estructura electrónica, dinámica molecular (convencional y acelerada) y determinaciones de energía libre con el fin de caracterizar exhaustivamente el mecanismo catalítico de la enzima. Nuestros resultados sugieren que la formación del ácido sulfénico transcurre a través de un intermediario sulfonio y depende en gran medida de catálisis ácido-base llevada a cabo por una histidina conservada. En resumen, este estudio representa una detallada caracterización de una enzima antioxidante de Mt de gran importancia.

PUESTA A PUNTO DE UN ENSAYO DE MULTIMERIZACIÓN IN VITRO DE LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDE DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA

M, Granzella¹. Z, Artía¹. G, Álvarez¹. I, Corvo¹. LM, Randall¹

1. Laboratorio de I+D de Moléculas Bioactivas, Departamento de Ciencias Biológicas, CENUR Litoral Norte, Universidad de la República

Los fármacos clásicos utilizados para el tratamiento del VIH tienen como blanco la retrotranscriptasa viral, la proteasa, la integrasa o inhibidores de la fusión. El año pasado la FDA aprobó por primera vez un inhibidor del ensamblaje de la cápside viral, el lenacapavir que abre las posibilidades para el tratamiento de pacientes que presentan resistencia múltiple a los fármacos. La cápside del VIH está formada por el ensamblaje de una única proteína viral (CA), que desempeña un papel esencial en pasos tempranos y tardíos de la infección. La alta conservación de la secuencia de aminoácidos de CA y su alta sensibilidad a las mutaciones evidencia su papel en el éxito del ciclo viral. El correcto ensamblaje de la cápside es necesario para la infectividad del VIH, siendo las moléculas capaces de interferir con la multimerización de CA posibles fármacos antirretrovirales. En este trabajo se realizó la puesta a punto de un ensayo in vitro que permite estudiar el efecto de diferentes compuestos en la velocidad de ensamblaje de la cápside del VIH. Se expresó y purificó la CA recombinante en *Escherichia coli* BL21(DE3) y se diseñó un ensayo de cribado en placa de 96 pocillos utilizando como volumen final 100 μ L, siguiendo la absorbancia a 340 nm en un lector de placa con modo cinético. Los ensayos de multimerización de CA se realizaron por quintuplicado variando la concentración de CA, la concentración de sales, el tipo de sales, el amortiguador, la temperatura y el pH, así como el factor desencadenante de la multimerización (sales o temperatura). Se encontró que la condición óptima para realizar la multimerización es con una concentración de CA de 150 μ M, a 42°C y amortiguador fosfato de sodio 50 mM, pH 8,2. A partir de estas condiciones se está llevando a cabo la evaluación de moléculas que fueron seleccionadas por su capacidad in silico de interactuar con una región conservada de la interfase entre monómeros de CA, las cuales se espera sean capaces de interferir con el proceso de multimerización in vitro. Los compuestos seleccionados por su capacidad de inhibir o acelerar la velocidad de multimerización de la proteína CA continuarán el proceso de evaluación como potenciales fármacos para el tratamiento del VIH.

Palabras clave: VIH, multimerización proteica, desarrollo de fármacos

MECANISMO DE FUNCIONAMIENTO DEL BIOSENSOR PARA 3-MERCAPTOPYRUVATO LMMST-ROGFP2

J.J, Ríos^{1,2}. D, Benchoam^{1,3}. B, Alvarez^{1,3}. M, Comini⁴. M, Bonilla⁴. E, Cuevasanta^{1,2,3,5}

1. Laboratorio de Enzimología, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias - UdelaR; 2. Laboratorio de Físicoquímica Biológica, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias - UdelaR; 3. Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO) - UdelaR; 4. Laboratorio de Biología Redox de Tripanosomátidos, Institut Pasteur de Montevideo; 5. Unidad de Bioquímica Analítica, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias – UdelaR

La mercaptopyruvato azufretransferasa (MST) es una enzima que participa en el catabolismo de la cisteína y ha despertado interés debido a su rol en la formación de persulfuros (RSSH) y sulfuro de hidrógeno (H₂S), moléculas de relevancia en la transducción de señales. Utiliza como sustrato al 3-mercaptopiruvato (3MP), generado endógenamente por la transaminación de la cisteína. El azufre del 3MP es aceptado por una cisteína del sitio activo de la MST para formar un persulfuro que luego es transferido a distintos aceptores. Entre los principales desafíos para entender estas vías regulatorias está la detección in vivo de las especies involucradas. Estamos desarrollando un biosensor fluorescente, genéticamente codificado, que consiste en una fusión de la MST de *Leishmania major* (LmMST) con roGFP2, una proteína fluorescente sensible al estado redox. Según la literatura, algunas MSTs en su forma persulfuro son capaces de transferir directamente el persulfuro a una de las dos cisteínas de la roGFP2 [1,2]. La reacción del persulfuro en la roGFP2 con la cisteína vecina forma H₂S y un disulfuro interno, induciendo cambios en la absorbancia y espectros de excitación de la proteína. La expresión del biosensor en tripanosomátidos permitió observar los cambios de emisión de fluorescencia inducidos por el agregado de 3MP al medio de cultivo. En este trabajo buscamos caracterizar el biosensor para poder racionalizar su funcionamiento en células y proponer modificaciones que lo mejoren. Se purificó la enzima LmMST y el biosensor LmMST-roGFP2 a partir de un sistema recombinante en *E. coli* para realizar ensayos in vitro. Se confirmó la actividad de la enzima utilizando 3MP como dador de azufre y cianuro como aceptor. Tanto para la fusión como para los módulos separados, se realizaron medidas de emisión de fluorescencia y absorbancia UV-Vis para evaluar la habilidad de la LmMST de transferir los azufres a la roGFP2. Al trabajar con los módulos separados se observó un lag en los primeros minutos de la reacción, el cual desapareció al preincubar LmMST con 3MP antes de agregar roGFP2, sugiriendo una etapa de formación de un intermediario. Utilizando HPLC, se observó que el 3MP es consumido al ser incubado con LmMST en ausencia de aceptores. Los cambios en los espectros de absorbancia en el UV en ausencia de roGFP2 sugieren la formación de polisulfuros. Nuestro trabajo muestra la formación de especies oxidantes a partir de la incubación de 3MP únicamente con LmMST, y sugiere que la oxidación de roGFP2 no ocurre mediante la reacción con el persulfuro de la enzima sino que está mediada por polisulfuros de bajo peso molecular. Los resultados contribuyen a caracterizar el biosensor, y ayudan a entender los mecanismos fisiológicos de persulfuración.

1. Pedre, B. et al. *Nat. Chem. Biol.* 19, 507–517 (2023).
2. Moseler, A. et al. *J. J. Biol. Chem.* 296, (2021).

CIENCIAS ÓMICAS Y BIOINFORMÁTICA

REVELANDO EL PANORAMA FUNCIONAL DE GRUPOS DE GENES CO-EXPRESADOS EN TRYPANOSOMA CRUZI

L, Inchausti^{1,2}. A, Martín³. L, Pérez-Díaz². B, Garat². J, Sotelo-Silveira^{4,5}. P, Smircich^{1,2}

1. Laboratorio de Bioinformática. Departamento de Genómica - IIBCE; 2. Sección Genómica Funcional. Facultad de Ciencias - UdelaR; 3. Instituto de Computación. Facultad de Ingeniería - UdelaR; 4. Sección Biología Celular. Facultad de Ciencias - UdelaR, 5 Departamento de Genómica - IIBCE

Trypanosoma cruzi es un parásito protozoario causante de la tripanosomiasis americana también denominada enfermedad de Chagas, una enfermedad tropical desatendida que afecta a millones de personas y que prolifera en entornos empobrecidos. *T. cruzi* se caracteriza por un ciclo de vida complejo que involucran distintas etapas de diferenciación, tanto en su hospedero triatomino que funciona como vector como en su hospedero mamífero, cada una con características particulares. Los genes de *T. cruzi* se expresan de forma policistronica, siendo los mecanismos post-transcripcionales los principales mecanismos de regulación de la expresión génica.

Los análisis de co-expresión génica son una valiosa herramienta para estudiar cambios en el nivel de expresión de grupos de genes que interactúan funcionalmente entre sí. En este estudio se buscó construir una red de co-expresión génica utilizando datos transcriptómicos de 12 puntos del ciclo de vida de *T. cruzi* abarcando todos los estadios de este organismo, con el fin de caracterizar y analizar funcionalmente grupos de genes co-expresados. A su vez, se buscó identificar posibles mecanismos que expliquen esta regulación conjunta, tales como la presencia de motivos en las secuencias 3'UTRs y el uso diferencial de codones de los genes co-expresados.

Se identificaron 13 módulos de genes co-expresados mediante la construcción de una weighted gene co-expression network. De ellos, se obtuvieron 10 módulos que estaban enriquecidos funcionalmente en roles asociados a metabolismo, patogénesis, regulación de la replicación del ADN, regulación del citoesqueleto y movimiento celular, y más. Por otro lado, se logró correlacionar ciertos módulos enriquecidos funcionalmente con determinados estadios del parásito y las características biológicas que los definen.

Por otro lado, se identificó un uso diferencial de codones entre los módulos de genes co-expresados, y la presencia de motivos a nivel de secuencia en las regiones 3'UTR que podrían explicar esta expresión conjunta de genes.

Por último, se identificaron los genes más conectados de cada módulo (hubgenes), que cumplen roles clave en los procesos subyacentes a los módulos. Dado que muchos de estos hubgenes estaban anotados como proteínas hipotéticas se realizó su inferencia funcional mediante alineamiento estructural y comparación de perfiles HMM-HMM.

RESPUESTA GÉNICA DE EUCALYPTUS GRANDIS FRENTE AL ESTRÉS POR FRÍO, EL ROL DE LOS MICROARNs

J, Farías¹. P, Basile¹. FM, Giorello¹

1 PDU Espacio de Biología Vegetal del Noreste. CENUR Noreste, sede Tacuarembó - UdelaR

Los eucaliptos son los árboles más plantados a nivel mundial debido a su creciente importancia para la producción de fibra y energía. Uno de los factores abióticos que más condiciona el crecimiento de estos árboles son las temperaturas mínimas. Temperaturas mínimas muy bajas generan daños importantes, pudiendo matar parte o la totalidad del árbol en una sola ocurrencia. Si bien en Uruguay no existen temperaturas bajo cero durante períodos prolongados, se registran entre 20 y 35 heladas anuales, siendo en algunos casos muy severas. El estrés por frío limita la distribución y productividad de las plantaciones del género *Eucalyptus*, afectando significativamente la supervivencia y el rendimiento de los plantines. En los últimos años y de manera creciente, se ha apuntado al rol de los microARNs para entender la reprogramación de la expresión génica frente a distintos tipos de estrés, entre ellos el estrés por frío. A pesar del consenso respecto a la relevancia de los microARNs en la regulación de la expresión génica en vegetales y de la gran importancia que poseen los *Eucalyptus* para la industria forestal a nivel mundial, la información que existe sobre los microARNs en *Eucalyptus* continúa siendo muy escasa.

En este trabajo, estudiamos la respuesta de los microARNs y ARNm al estrés por frío en *E. grandis*, una de las especies de eucalipto más plantadas en Uruguay. Dado que los plantines son más susceptibles al daño por frío, sometimos 3 genotipos diferentes de plantines a un shock de frío durante 24 horas, seguido de una fase de recuperación de 12 horas a 25°C, analizando un total de 4 tratamientos (G1: control, G2: 12h a 4°C, G3: 24h a 4°C y G4: 24h a 4°C + 12h a 25°C).

El tratamiento de frío se evaluó midiendo la fuga de electrolitos. Se observó daño de las membranas luego de 12 horas a 4°C, incrementándose el parámetro a las 24 horas. Las membranas se recuperaron parcialmente luego de 12 horas a 25°C. El análisis del transcriptoma mostró un aumento en la expresión de genes pertenecientes a la familia AP2/ERF, incluidos los genes DREB1/CBF, un grupo de genes que controlan la activación de mecanismos de protección bajo estrés por frío. Dentro de los genes regulados negativamente, se enriquecieron los términos GO relacionados con la fotosíntesis. Se identificaron varios microARNs conservados y nuevos, pero sólo una minoría cambió su expresión con el tratamiento con frío, entre ellos, el miR828. Este microARN bajó su expresión luego del tratamiento con frío. Según varios estudios, este microARN induce la expresión de antocianinas, las cuales aumentan en diferentes condiciones, incluido el estrés por frío.

Estos resultados permitieron caracterizar la respuesta génica, mediada por microARNs, de *E. grandis* frente al estrés por frío. Potencialmente, los datos recabados podrían utilizarse en programas de selección y mejora que busquen seleccionar clones más tolerantes al estrés por frío.

LOS LNCRNAS SE EXPRESAN DIFERENCIALMENTE EN KINETOPLÁSTIDOS

P, Sosa Basso^{1,2}. J, Sotelo-Silveira^{3,4}. B, Garat². MA, Duhagon^{2,5}. P, Smircich^{1,2}

1. Laboratorio de Bioinformática, Departamento de Genómica. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable - MEC; 2. Sección Genómica Funcional. Facultad de Ciencias - UdelaR; 3. Departamento de Genómica. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable - MEC; 4. Sección Biología Celular. Facultad de Ciencias - UdelaR, 5 Departamento de Genética. Facultad de Medicina - UdelaR

Los kinetoplastidos son protistas flagelados que incluyen parásitos causantes de enfermedades graves en humanos y animales, como la enfermedad de Chagas, la enfermedad del sueño y la leishmaniasis, causadas por *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* y *Leishmania* spp., respectivamente. Los ARN largos no codificantes (lncARN) son transcritos no codificantes que exceden los 200 nucleótidos y desempeñan diversas funciones en la regulación génica, la diferenciación celular y las interacciones con ADN, ARN, proteínas y cromatina en múltiples organismos. A pesar de su importancia, los lncARN en *Trypanosoma cruzi* y otros kinetoplastidos permanecen en gran parte inexplorados.

En este estudio, presentamos una estrategia bioinformática diseñada para anotar lncARNs en *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* y *Leishmania* major a partir de datos transcriptómicos. Dicha estrategia incluye el cálculo del potencial de codificante, predicción empleando métodos de Random Forest y filtrado mediante la identificación de sitios de procesamiento. Este enfoque condujo a la identificación de varios cientos de lncARNs putativos en todos los tripanosomátidos examinados.

Posteriormente, realizamos un estudio de conservación de estos lncARNs mediante alineación de secuencias y clasificación funcional basada en el contenido de k-mer entre los tres organismos. Nuestro análisis reveló la presencia de lncARNs conservados entre los parásitos, lo que indica una posible relevancia funcional. Además, realizamos un análisis de expresión diferencial de los lncARNs identificados en diferentes etapas del parásito y condiciones biológicas. Este análisis muestra que ciertos lncARNs están diferencialmente expresados bajo diversas condiciones, lo que resalta su potencial importancia en la biología del parásito.

Este trabajo sirve como base para estudios funcionales más profundos de lncARNs en kinetoplastidos y sus posibles roles en la biología, patogénesis y adaptabilidad del parásito a diferentes condiciones ambientales y biológicas.

CONSERVATION OF THE SMALL RNA PATHWAYS IN CHROMOSOME LEVEL GENOMES OF PLATYHELMINTHES

S, Fontenla¹. A, Bilat¹. G, Rinaldi². JF, Tort¹.

1. Dept. de Genética, Fac. de Medicina - UdelaR 2. Dept. Life Sciences, Aberystwyth Univ. Wales, United Kingdom

Single stranded non-coding RNAs of 20 to 30 nucleotides long are key mediators in smallRNA pathways (SRP) that underlie essential biological processes. Previously, we have described the conservation and diversification of mi- and si-RNA pathway genes in all platyhelminthes, and the complete absence of the piRNA pathway in all neodermatans, while present in free-living species. We also reported the expansion of key effector genes like FL-Agos (a highly divergent Argonaute 2 of flatworms), amplified in all parasitic species, and Dicer-2, ancestrally duplicated in food borne trematodes (FBT). Recently, there has been an improvement in the quantity and quality of platyhelminthes genomes with several of them assembled at chromosome level (i.e. 14 of the 46 flatworm species in the last release of Wormbase Parasite, and other flatworm chromosome level assemblies still not deposited in the database).

In the present work, we took advantage of these resources to study the genomic conservation of key SRP differentially amplified genes. We used orthologous predictions and genomic level tBLASTn to reanalyze the small RNA pathway related genes in the new assemblies. We also focused on the expression profiles of these SRP genes analyzing their expression in the most recent single-cell and bulk RNA-seq data available.

Remarkably, the greatest argonaute class gene expansion, with more than 20 copies of FL-Agos is found in the new assembled genomes of *Trichobilharzia* species, a significant difference compared to the one copy found in the previous genome draft. Interestingly, 2 FL-Agos were conserved in Schistosomidae and other trematodes. Additionally, only one FL-Ago is consistently expressed in proliferating cells (neoblasts, stem and germline) along the life cycle of *Schistosoma mansoni* in single-cell data. It could be possible that similar expression preference occurred in other parasitic flatworms however additional single cell data from other species is needed.

Furthermore, a second notable gene expansion with at least 4 copies of dicer-2 class genes, was also found in *Trichobilharzia* spp., a significant improvement compared to what we found in the previous draft. Interestingly, two closely placed copies of dicer-2 are consistently conserved in cestodes, monogenea and food borne trematodes, but only one copy is conserved in all the *Schistosoma* species. These results are showing a remarkably divergent evolutionary path at least for SRP within the blood flukes.

UNA ENORME CANTIDAD DE VARIANTES DE PROCESAMIENTO E ISOFORMAS PROTEICAS SE EXPRESAN DIFERENCIALMENTE DURANTE LA ESPERMATOGÉNESIS

C, Romeo^{1,2}. MF, Trovero². S, Radío¹. P, Smircich¹. R, Rodríguez-Casuriaga². A, Geisinger^{2,3*}. J, Sotelo-Silveira^{1,4*}

1 Departamento de Genómica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), MEC, Uruguay. 2 Laboratorio de Biología Molecular de la Reproducción, Departamento de Biología Molecular, IIBCE, MEC, Uruguay. 3 Sección Bioquímica/Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República (UdelaR), Uruguay. 4 Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, UdelaR, Uruguay.

La espermatogénesis es un proceso esencial para las especies con reproducción sexuada. Su alteración se encuentra en la base de la infertilidad y otras patologías, como el cáncer testicular. El tejido testicular en los mamíferos es altamente complejo y heterogéneo. Esta complejidad, derivada principalmente de las células germinales, se evidencia a nivel de la expresión génica, con una enorme cantidad de genes tejido-específicos y el mayor número de ARNs largos no codificantes (lncRNAs) de entre todos los tejidos estudiados, así como una tasa de splicing alternativo excepcionalmente elevada. Aunque la ocurrencia de patrones adecuados de splicing a lo largo de la espermatogénesis es crítica para el éxito de la misma, muy pocos estudios han explorado detalladamente este aspecto.

En este estudio, empleando poblaciones celulares altamente puras de las distintas etapas de la espermatogénesis del ratón, hemos identificado 33,002 transcritos expresados que no habían sido previamente reportados. Esto abarca variantes de splicing de genes ya conocidos, así como de otros previamente no anotados. Notablemente, empleando un estricto criterio de selección anotamos 13.471 lncRNAs no identificados previamente, lo que refleja que la anotación de estos elementos es aún muy incompleta. Un rasgo particular que encontramos para los lncRNAs, es que tienden a tener un número significativamente menor de variantes de splicing que los genes codificantes para proteína, lo que constituye una nueva evidencia de su menor complejidad estructural. Adicionalmente, hemos encontrado 2.794 transcritos no anotados con alto potencial codificante, incluyendo varios derivados de genes no identificados previamente. Muchos de estos transcritos codificarían proteínas con probables roles específicos en el testículo, pero que habían pasado desapercibidas hasta ahora. Algunas de las variantes codificantes más interesantes fueron validadas mediante RT-PCR.

La mayor contribución de transcritos no anotados proviene de las etapas tempranas de la profase meiótica, estadios que han sido muy raramente incluidos en estudios transcriptómicos. Esto nos lleva a pensar que, al poder aislar las poblaciones celulares, hemos sido capaces de detectar genes específicos hasta el momento no descritos.

Este trabajo representa un avance hacia la comprensión de las bases moleculares de la espermatogénesis, y particularmente de la profase meiótica temprana y los eventos cruciales que ocurren durante la misma (como el apareamiento de cromosomas homólogos), y de los que aún es mucho lo que se desconoce.

LA CURACIÓN MANUAL DE TRANSPOSONES REVELA EXPANSIONES DIFERENCIALES ENTRE ESPECIES DE LA FAMILIA FASCIOLIDAE Y UNA DISTRIBUCIÓN NO ALEATORIA CON RESPECTO A LOS INTRONES

AF, Bilat¹. AV, Protasio². JF, Tort¹

1. Departamento de Genética, Facultad de Medicina, UdelaR. 2. Department of Pathology, Tennis Court Road, Cambridge, CB1 2PQ, UK

Fasciolidae es una familia de helmintos parásitos con impactos globales en el sector productivo y en la salud humana. Los fasciolidos presentan genomas de gran tamaño asociados a una gran cantidad de elementos repetidos. Dentro de la familia, las especies *Fasciola hepatica* y *F. gigantica* (hepáticas) presentan importantes diferencias morfológicas y ecológicas con la especie emparentada *Fasciolopsis buski* (intestinal), que se acompañan a nivel genómico de una importante expansión de repetidos, particularmente, de elementos transponibles (TEs). Esto hace de este grupo de especies un modelo interesante para el estudio de este tipo de repetidos.

Los transposones son repetidos genómicos dispersos, móviles y estructuralmente diversos, capaces de alterar la estructura y funcionamiento del genoma por diversos mecanismos. Se ha postulado incluso que los mismos han tenido un papel relevante en la evolución y adaptación de los organismos eucariotas. Planteamos como hipótesis que la expansión de TEs dentro de la familia Fasciolidae se asocia a las innovaciones adaptativas de las especies hepáticas posiblemente vinculadas a alteraciones en la estructura o función de genes relevantes para el parasitismo.

Se realizó la identificación de novo y curación manual de las familias de TEs en las tres especies de fasciolidos mencionadas, analizando adicionalmente la composición y distribución genómica global de las mismas. Por otra parte, analizamos la dinámica evolutiva de las expansiones identificando precisamente los períodos (en términos relativos) en los cuales las distintas clases de TEs experimentaron su pico de expansión y estimando a su vez la edad relativa de cada una de las familias. De este modo se terminó de comprobar que la composición y perfil evolutivo de las familias de TEs en *Fasciola hepatica* y *Fasciola gigantica* es prácticamente el mismo y resultado de expansiones ancestrales, ya sea luego de la divergencia con *F. buski* o en el ancestro común a las tres especies. Sin embargo, cabe destacar que se encontraron también familias de TEs con aparente expansión reciente, sobre todo en *F. gigantica*. Por último, encontramos evidencias que sugieren que distintas clases de TEs presentan una distribución diferencial con respecto a la localización genómica, particularmente en relación a la posición de los intrones. Este trabajo constituye un avance en la caracterización de repetidos en Fasciolidae, restando aún por investigar los impactos funcionales y evolutivos de los mismos.

PREDICIENDO NUEVOS GENES INVOLUCRADOS EN LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES DE CAENORHABDITIS ELEGANS UTILIZANDO APRENDIZAJE AUTOMÁTICO SUPERVISADO Y NO SUPERVISADO EN UN CONJUNTO DE DATOS DE RNA-SEQ.

S, Zeballos-Gorón^{1,2}. G, Salinas². F, Pazos-Obregón^{1,3}

1 Departamento de Neurofisiología Celular y Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay 2 Laboratorio de Biología de los Gusanos, Institut Pasteur Montevideo, Montevideo, Uruguay 3 Unidad de Bioquímica Analítica y Proteómica, Institut Pasteur Montevideo, Montevideo, Uruguay

La cadena de transporte de electrones (ETC) es un proceso clave en la producción de energía celular y es vital para el funcionamiento adecuado de todos los organismos. En el nematodo *Caenorhabditis elegans*, los genes involucrados en este proceso han sido bien caracterizados, pero aún hay mucho por aprender sobre los genes asociados con este proceso. En este estudio, utilizamos un enfoque de aprendizaje automático supervisado y no supervisado para predecir nuevos genes asociados con la ETC en *C. elegans* utilizando un conjunto de datos de RNA-seq que incluye la expresión de células individuales de las tres primeras divisiones del desarrollo, 502 linajes celulares distintos y 410 tipos celulares terminales, así como transcripciones de todo el animal en cada etapa del ciclo de vida. Descubrimos que nuestro enfoque fue capaz de identificar varios nuevos genes que antes se desconocían como participantes en este proceso. Estos hallazgos tienen importantes implicaciones para nuestra comprensión de la cadena de transporte de electrones.

IDENTIFICACIÓN DE VÍAS SUJETAS A CONTROL TRADUCCIONAL CLAVES EN LA RESPUESTA A DÉFICIT HÍDRICO DE PLANTAS DE SOJA NODULADAS

M, Martínez-Moré¹. CV, Filippi¹. G, Eastman^{2,3}. J, Sotelo-Silveira^{2,4}. O, Borsani¹. MM, Sainz¹.

1 Laboratorio de Bioquímica. Departamento de Biología Vegetal. Facultad de Agronomía. Universidad de la República, 2 Departamento de Genómica. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, 3 Department of Biology. University of Virginia, 4 Departamento de Biología Celular y Molecular. Facultad de Ciencias. Universidad de la República.

El déficit hídrico es una de las mayores limitantes en la producción de soja. Se ha observado que la respuesta al déficit hídrico varía según si la planta está o no nodulada. Esta respuesta podría explicarse por cambios en la expresión génica. Es conocido que la exposición de las plantas a condiciones ambientales adversas causa una inhibición global de la iniciación de la traducción que conlleva una disminución del porcentaje de ARNm asociados a polisomas. Por lo tanto, entender estos mecanismos de regulación es importante para comprender la fisiología de la planta y para aportar en la mejora del cultivo. En este trabajo, realizado en el genotipo Génesis 5601, se identificaron genes diferencialmente expresados (DEGs) en raíces de plantas noduladas (N) y no-noduladas (NN), sometidas a déficit hídrico (E) y a su respectivo control hídrico (C), mediante análisis RNA-seq de transcritos asociados a polisomas. El déficit en un contexto de nodulación (N+E vs N+C) provocó, a nivel traduccional, la inducción de 463 genes y la represión de 209 genes. Por su parte, se observó que la respuesta al déficit de una planta nodulada frente a la de una no-nodulada involucra, a nivel traduccional, la inducción de 52 genes y la represión de 49 genes. Se identificaron 34 módulos de genes con expresión similar mediante análisis de redes de co-expresión génica (WGCNA). En el módulo 4 co-localizaron 984 DEGs, de los cuales el 65% fueron DEGs en N+E vs N+C. Análisis de redes de interacciones proteína-proteína (PPI) asociadas a estos DEGs revelaron el enriquecimiento de procesos como metabolismo de prolina, arginina y galactosa y biosíntesis de fenilpropanoides. Por otra parte, en el módulo 1 co-localizaron 338 DEGs, de los cuales el 70% fueron DEGs con regulación traduccional exclusiva debido al efecto del déficit en contexto de nodulación. Además, 99 de dichos DEGs también se identificaron como genes hub (altamente conectados) del módulo 1. Análisis de redes PPI mostraron el enriquecimiento de procesos biológicos de iniciación de la traducción, fosforilación oxidativa, fagosoma y la vía “nonsense-mediated mRNA decay”. Los genes asociados a estos procesos emergen como potenciales candidatos a ser evaluados en futuros estudios funcionales.

EXPLORACIÓN GENÓMICA EN TOXOPLASMA GONDII Y NEOSPORA CANINUM: UN PIPELINE PARA LA BÚSQUEDA, ANÁLISIS Y VISUALIZACIÓN DE FAMILIAS MULTIGÉNICAS

J, Pereira. L, Berná

Unidad de Genómica Evolutiva. Facultad de Ciencias

El phylum Apicomplexa incluye más de 6,000 especies de parásitos protozoarios, se caracteriza por la presencia de un complejo apical en alguna fase de su ciclo vital. Estos parásitos, como *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum*, pueden afectar gravemente la salud humana y de otros animales. Siendo la infección con *T. gondii* muy prevalente en Uruguay, estimándose que la mitad de los habitantes del país se encuentra crónicamente infectada, mientras que *N. caninum* es considerado el principal causante de aborto en bovinos. Este estudio se centró en analizar las diferencias y similitudes existentes entre las familias multigénicas SRS, ROP, MIC y GRA de estas especies, utilizando un pipeline automatizado diseñado para identificar, clusterizar y visualizar familias multigénicas mediante el uso de sus anotaciones genómicas. A través de dos estrategias de clusterización distintas, se logró analizar eficazmente las familias multigénicas en *T. gondii* y *N. caninum*. Destacándose la estrategia de clusterización conjunta la cual permitió el uso complementario de las anotaciones de ambos parásitos, ayudando a complementar las anotaciones relacionadas con las familias ROP y GRA en *N. caninum*. El estudio se enfocó particularmente en la familia SRS, notoria por su diversidad dentro del phylum. Específicamente, el análisis realizado sobre la familia SRS produjo resultados que concuerdan con los hallazgos de otros autores. Destacándose la expansión de la familia SRS en *N. caninum* respecto a *T. gondii*, la presencia de estos genes en todos los cromosomas de ambos parásitos, estando comúnmente agrupados en tandems; y la mayor similitud entre los genes de un mismo tandem que los pertenecientes a otros. Además, se obtuvo evidencia para incorporar tres genes hipotéticos de *N. caninum* a la familia SRS.

COMPARING METHODS TO DEFINE NEGATIVE EXAMPLES FOR GENE FUNCTION PREDICTION USING DEEP LEARNING AND DROSOPHILA MELANOGASTER

JF, Quiroz¹. P, Yankilevich². F, Pazos Obregon^{1,3}

1. Departamento de Neurofisiología Celular y Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.
2. Plataforma Bioinformática, Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires (IBioBA), CONICET - Partner Institute of the Max Planck Society, Buenos Aires, Argentina. 3. Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas - Instituto Pasteur Montevideo

As the generation and availability of omics data increase, the necessity of suitable computational methods for automatic statistical analysis grows. In machine learning predictive models we need to have data for training our models, for example RNAseq, scRNAseq, proteomic information, or other types of omic data. However, data also needs to be appropriately labeled; otherwise, the model cannot discern its purpose, especially in supervised models. In binary classification models we usually label the data as positive and negative. Selecting positive examples is often based on well-established associations with certain conditions, like being associated with a GO label. However, choosing negative examples presents a more complex challenge. Studies generally do not report the absence of gene function, and lack of association with a function does not necessarily imply its absence. We apply techniques commonly employed in the literature to identify negative labels when only positive examples are available. Leveraging a list of positive examples, we have created various automated datasets for training our deep learning models, utilizing information solely from the GO ontology graph and protein sequences. We evaluate the performance of three simple deep learning architectures that we developed for gene function prediction in *Drosophila melanogaster*. We focus on one specific GO term which was manually selected into positive and negative examples. Then we compare the results obtained by the trained architecture with the manually curated samples and different methods of automatic negative example selection.

ANOTACIÓN FUNCIONAL DE GENES EN KINETOPLÁSTIDOS MEDIANTE BÚSQUEDA DE HOMOLOGÍA REMOTA BASADA EN ESTRUCTURA

J, Trinidad^{1,2,3}. JR, Sotelo^{4,5}. D, Fernandez⁶. P, Smircich^{1,2}.

1. Laboratorio de Bioinformática. Depto. Genómica-IIBCE. 2. Sección Genómica Funcional, Facultad de Ciencias-UdelaR. 3. Laboratorio de Genómica Evolutiva. Facultad de Ciencias-UdelaR. 4. Depto. Genómica-IIBCE. 5. Sección Biología Celular. Facultad de Ciencias-UdelaR 6. Laboratorio de bioinformática estructural-UBA

Los kinetoplástidos son parásitos protozoarios flagelados. Estos organismos afectan a millones de personas en todo el mundo por ser los agentes etiológicos de diversas enfermedades como: enfermedad del sueño (*T. brucei*), enfermedad de Chagas (*T. cruzi*), y leishmaniasis (distintas especies del género *Leishmania*). Los kinetoplástidos comprenden un grupo divergente temprano en el árbol evolutivo eucariótico presentando procesos moleculares distintivos que no están presentes en otros grupos eucariotas. Se estima que en cada especie hay alrededor de 10.000 genes. Mediante búsquedas basadas en homología se pudo asignar una función probable a aproximadamente el 50% de los genes codificantes para proteínas predichos. Esta baja anotación persiste actualmente, habiendo un alto porcentaje de proteínas hipotéticas, lo cual dificulta el estudio de la biología celular y molecular del parásito, y especialmente la interpretación de resultados de experimentos a escala genómica. En este trabajo presentamos un flujo de trabajo bioinformático, que utiliza los recientes avances en la predicción estructural de proteínas para la predicción de función mediante la comparación estructura-estructura.

BIOLOGÍA CELULAR

DILUCIDANDO EL ROL DE LA PROTEÍNA GERMINAL PIWIL1 COMO POSIBLE SELLO DISTINTIVO EN CÁNCER DE COLON.

S, Montenegro¹. A, Cayota¹. MR, Garcia-Silva¹

1. Genómica Funcional, Institut Pasteur de Montevideo

Existe evidencia en numerosos estudios realizados en los últimos años que muestran reactivación de la maquinaria de piARNs en cáncer. Dicha reactivación aparenta estar fuera de su contexto fisiológico canónico, a nivel de células germinales y células madre, donde se las describió originalmente.

En función de reportes de la literatura y resultados preliminares de nuestro grupo, se especula que las proteínas PIWI y especialmente PIWIL1 constituyen una vía no caracterizada previamente en cáncer, capaz de regular el ciclo celular de la célula tumoral y por ende participar de su capacidad proliferativa. Por lo tanto, resulta novedoso e interesante poder determinar cuáles son los mecanismos por los cuales PIWIL1 actúa ya que estos pueden significar la generación de nuevos biomarcadores diagnósticos y/o blancos terapéuticos en el proceso oncogénico.

El objetivo es aproximarse a la caracterización del rol de PIWIL1 mediante su clonado taggeada tanto a eGFP y mRuby para su sobre-expresión en dos líneas celulares: la línea celular modelo de cáncer de colon humano Caco-2 y su contraparte normal CCD841CoN. De esta manera, se plantea seguir su distribución subcelular a lo largo del ciclo celular, lo que permitiría una aproximación al rol que cumple PIWIL1 en el contexto del proceso oncogénico.

Dado el vínculo entre las proteínas PIWI y su sobre-expresión en el contexto oncogénico, mediante la dilucidación de la localización subcelular de PIWIL1, a lo largo del ciclo celular, planteamos responder la hipótesis del rol que desempeñan estas proteínas en las células tumorales. Teniendo en cuenta que una estimulación aberrante de la división celular es una de las principales características del cáncer, sospechamos que este estudio puede arrojar nuevas dianas terapéuticas en el futuro, estudiando una familia de proteínas responsables de controlar la integridad del genoma, y el ciclo celular. Se podría pensar en la maquinaria piRNAs/PIWI como potenciales biomarcadores en el proceso oncológico.

IDENTIFICACIÓN DE LAS REDES DE REGULACIÓN GÉNICA ASOCIADAS A LAS RESPUESTAS DE TOLERANCIA/SENSIBILIDAD DEL MERISTEMO DE RAÍZ AL ESTRÉS OSMÓTICO.

S, Píriz Pezzutto¹. M, Sainz¹. O, Borsani¹. M, Sotelo-Silveira¹

1. Laboratorio de Bioquímica. Depto Biología Vegetal. FAGRO.UdelaR

El meristemo radicular debe enfrentar uno de los ambientes más complejos en la tierra: el suelo, cuyas propiedades fisicoquímicas pueden variar dramáticamente en la escala de micras exponiendo a las raíces a distintos tipos de estrés como el osmótico. El estrés osmótico limita la habilidad de las células de absorber agua provocando un retraso o detención del crecimiento. Nuestro grupo viene trabajando con el mutante de *Arabidopsis* *ttl1*, hipersensible al estrés osmótico. Resultados previos mostraron que *ttl1* presenta paredes celulares más elásticas en la zona de elongación de la raíz, lo que podría estar explicando parte del fenotipo observado en condiciones de shock osmótico. En este trabajo desarrollamos un método que busca simular condiciones de retención de agua similares a las de un suelo en condición de déficit hídrico. Utilizando un gradientómetro establecimos un gradiente osmótico con concentraciones crecientes de manitol (0 a 400 mM) que genera potenciales osmóticos decrecientes (0 a -1.2 MPa) en placas de petri. Este sistema permitió cuantificar el crecimiento de la raíz primaria de Col-0, *ttl1* en condiciones de disponibilidades decrecientes de agua. La tasa de crecimiento de las raíces de Col-0 pasó de 0,26 cm/día en el rango de concentraciones de 200 a 300 mM manitol a 0,22 cm/día en el rango de 300 a 400 mM de manitol. Luego de 17 días en el gradiente osmótico las raíces alcanzaron la zona con -1.2 MPa de potencial osmótico y el número de células en el MP se redujo en un 25%, en contraposición a lo observado con el shock osmótico en el cual Col-0 reduce el número de células en el MP un 30% luego de 7 días en el mismo y *ttl1* un 42%. Además, la respuesta de ambos genotipos luego de atravesar todo el gradiente osmótico (de 0 a -1.2 MPa) y permanecer creciendo 11 días a -1.2 MPa fue menos severa que cuando se crecieron durante 7 días en un shock osmótico de -1.2 MPa.

Analizamos la respuesta transcripcional de genes relacionados a síntesis de pared celular en el mutante *ttl1* en raíces crecidas en condiciones control vs aquellas crecidas durante 7 días en 400 mM de manitol. Se observó que el mutante *ttl1* expresa significativamente menos CESA1, CESA3, CESA6 y de CSLA9 que Col-0 en condiciones de crecimiento control. Sin embargo, luego de 7 días bajo shock osmótico (-1.2 MPa) la expresión de CESA3, CESA6 y CSLA9 aumentó con respecto al mutante en condiciones de crecimiento control. También se están analizando por qRT-PCR la expresión de estos genes en plantas crecidas en el gradiente osmótico. El sistema en gradiente, hasta donde sabemos, no ha sido muy utilizado y abre nuevas oportunidades para realizar diversos estudios moleculares en condiciones que simulan mejor el crecimiento en suelos sometidos a déficit hídrico.

ESTUDIO DEL EFECTO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DE LECHE MATERNA SOBRE LA CAPACIDAD INMUNOMODULADORA Y LA PROLIFERACIÓN DE ORGANOIDES INTESTINALES MURINOS NEONATALES Y ADULTOS

F, Giribaldi¹. P, Céspedes¹. E, Méndez². M, Bollati¹. R. Pagotto¹

1. Unidad de Biología Celular, Institut Pasteur de Montevideo, 2. Laboratorio de Biomateriales, Facultad de Ciencias, UdelaR

La leche materna reduce el riesgo de enterocolitis necrotizante en recién nacidos prematuros de muy bajo peso al nacer. Sin embargo se desconoce cuál es el componente bioactivo responsable de este efecto. Tampoco está claro si podría proteger de enfermedades inflamatorias intestinales a individuos adultos. Un componente abundante de la leche materna son las vesículas extracelulares (VEs); éstas desempeñarían un rol en la comunicación celular, por lo que podrían mediar respuestas biológicas sobre el epitelio intestinal.

El objetivo de este trabajo consistió en evaluar el efecto de VEs de leche materna sobre la proliferación y la capacidad inmunomoduladora del epitelio intestinal utilizando organoides intestinales murinos neonatales y adultos.

Para explorar la capacidad inmunomoduladora, se emplearon organoides murinos reporteros para NF- κ B, un factor de transcripción clave en la inflamación intestinal. Los organoides fueron expuestos a TNF- α como estímulo proinflamatorio. Para evaluar el efecto de las VEs sobre la proliferación de organoides, se realizaron ensayos de formación de colonias (EFC). En todos los casos, las VEs fueron empleadas a la misma concentración que se encuentra en la leche materna y dos veces más concentradas.

Las VEs fueron aisladas por ultracentrifugación y cromatografía de exclusión de tamaño. Los tamaños de partícula estimados fueron de 200 nm por citometría de flujo (CF) y 270 nm por dispersión dinámica de luz. Por microscopía electrónica de transmisión se confirmó la presencia de vesículas pequeñas, con morfología en forma de copa. Se corroboró la expresión de tetraspaninas CD63, CD9 y CD81 por CF, así como de CD9 y TSG101 por Western Blot. En cuanto al efecto inmunomodulador, la incubación con VEs no modificó significativamente la activación de NF- κ B (expresada como cambio de veces con respecto al control no estimulado) inducida por TNF α en neonatos (VEs+TNF: 4,84+/-0.66; TNF: 4,13+/-0.62) ni adultos (VEs+TNF: 8,44+/-2.67; TNF: 9,27+/-1.74). Respecto a la proliferación, resultados preliminares mostraron que la incubación con VEs aumentó la cantidad de organoides obtenidos a partir de la siembra de 1×10^3 células en el modelo neonatal (46.25+/-5.37 neonatal vs 29.25+/-10.05 control), sin afectar al adulto.

Conclusión: las VEs de leche materna no modularían la vía NF- κ B en el epitelio intestinal, pero favorecerían la proliferación de organoides neonatales. Estudios en curso buscan evaluar la expresión de marcadores asociados a proliferación (Ki67 y LGR5) y explorar el efecto sobre la integridad de la barrera transepitelial.

LOCALIZACIÓN SUB-CELULAR DE ARNS NO CODIFICANTES LARGOS, CANDIDATOS A CUMPLIR FUNCIONES ESTRUCTURALES Y/O REGULATORIAS DURANTE LA ESPERMATOGÉNESIS

M, François ^{1,2}. MF, Trovero ^{1,3}. R, Rodríguez-Casuriaga ¹. A, Geisinger ^{1,2}

1 Laboratorio de Biología Molecular de la Reproducción (Departamento de Biología Molecular) -Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable; 2 Sección Bioquímica. Facultad de Ciencias – UdelaR, 3 Dirección actual: Boston Children's Hospital - Harvard Medical School

La espermatogénesis es el proceso por el cual las células de la línea germinal experimentan importantes cambios morfológicos y genéticos que llevan a la formación de un espermatozoide maduro. Durante la espermatogénesis, las células están sujetas a una importante regulación postranscripcional, en la cual los ARNs no codificantes largos (lncRNAs), han comenzado a destacar por su potencial rol como reguladores de distintos procesos biológicos. Dado que el testículo es el tejido que presenta mayor expresión y diversidad de este tipo de transcritos, y que los mismos presentan patrones de expresión muy restringidos en el tiempo y tipo celular, se sugiere que por lo menos una parte de estos transcritos debería tener un rol importante durante el desarrollo testicular y la espermatogénesis.

Con el objetivo de aportar nuevos conocimientos sobre las bases moleculares de la reproducción masculina, en lo relativo al potencial rol de ARNs no codificantes, a partir de estudios de RNAseq de nuestro grupo se seleccionaron tres lncRNAs diferenciales de la línea germinal masculina del ratón, para el estudio de su localización sub-celular. Como resultados, obtuvimos que:

- Los tres lncRNAs seleccionados (Rbakdn, 1110020A21Rik y Kcnmb4os1) se localizan sobre el cuerpo cromatoide (CC) de las espermátidas redondas, que son células precursoras de los espermatozoides. El CC es un organelo sin membrana específico de estas células, para el cual se propone un importante rol en la regulación postranscripcional durante la espermatogénesis.

- Adicionalmente, el lncRNA antisentido Kcnmb4os1 se localiza en el CC junto con su respectivo mRNA sentido, codificante para un canal iónico del espermatozoide, con el cual solapa. Dado que ambos transcritos poseen regiones complementarias, cabe la posibilidad de que Kcnmb4os1 secuestre al ARNm y lo redirija al CC, lo que podría sugerir un novedoso mecanismo de regulación postranscripcional.

- El lncRNA Kcnmb4os1 también mostró una señal puntual dentro del núcleo de las células meióticas, asociado a uno de los extremos de un cromosoma de tamaño mediano. Evidencias sugieren que podría estar acumulando sobre su propio locus. Algo similar únicamente se ha reportado para lncRNAs meióticos de las levaduras, donde esos lncRNAs median el apareamiento de cromosomas homólogos durante la meiosis. De ser así, estaríamos ante un descubrimiento de enorme relevancia sobre las bases moleculares de estos procesos en mamíferos.

- Por último, Kcnmb4os1 parece ser un lncRNA “moonlighting” (es decir, con más de una función), característica que se ha reportado mayoritariamente para proteínas, y no así para ARNs.

Aún quedan muchos interrogantes por responder, para los cuales nos proponemos ensayos funcionales mediante silenciamiento génico in vivo y chromosome painting, que logren ampliar nuestro conocimiento sobre los lncRNAs.

CAMBIOS EN NIVEL GLOBAL DE METILACIÓN DEL ADN EN CÉLULAS PROSTÁTICAS POR ACUMULACIÓN DE AGES EN MATRIZ EXTRACELULAR Y ROL DE ENDO180

MP, Frade¹. L, Pastro¹. L, Sauer². M, Cappetta¹. M, Rodríguez-Teja¹.

1. Departamento de Genética Facultad de Medicina, UdelaR, Uruguay, 2. Brandenburg University of Technology Cottbus-Senftenberg, Alemania

El cáncer de próstata es una de las neoplasias con mayor morbimortalidad a nivel nacional, y el envejecimiento es su principal factor de riesgo. Durante el mismo se acumulan productos finales de glicación avanzada (AGEs) en la membrana basal (MB) que rodea a los acinos prostáticos, produciendo el entrecruzamiento de los componentes de la matriz extracelular (MEC). Esto genera aumento de rigidez y pérdida de elasticidad en el tejido prostático, lo cual es censado por mecanorreceptores en la superficie de las células epiteliales prostáticas, entre ellos Endo180, y desencadena cambios en la expresión génica y fenotipo celular pro-invasivo. Endo180 es un mecanorreceptor previamente estudiado por nuestro equipo y cumple su función a partir del reconocimiento del colágeno IV glicado. La epigenética, en particular la metilación del ADN, presenta variaciones tanto con la edad como durante la carcinogénesis, y regula los perfiles de expresión génica característicos en cada caso. En el desarrollo del cáncer de próstata, la epigenética cumple un rol clave y temprano, con una primera etapa de hipermetilación de genes relacionados con el ciclo celular y proliferación, y una posterior con hipometilación global. Con el objetivo de determinar si la acumulación de AGEs en la MEC del acino prostático modula cambios en la metilación global del ADN, se realizaron cultivos en 3D de acinos prostáticos wild type (WT) sobre MB rígida (rica en AGEs) o nativa, y en 2D, y se estudió el nivel global de metilación del ADN genómico en cada caso mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Asimismo se analizaron los cambios en la expresión génica de genes de las vías de metilación en cultivos 3D sobre MB rígida versus nativa, a partir de datos de ARNseq. Los resultados preliminares evidencian un aumento en el nivel global de metilación del ADN en acinos prostáticos sobre MB rica en AGEs (rígida) comparado con el de MB nativa, el cual se asemeja al de cultivos en 2D, considerada la condición con el máximo nivel de rigidez. Asimismo, este aumento se ve acompañado de cambios significativos en la expresión de genes relacionados con la regulación de la metilación del ADN. Actualmente, se está analizando el nivel de metilación global del ADN en cultivos 2D de líneas WT, control y KO para Endo180 de acinos prostáticos para investigar el rol de este mecanorreceptor en los cambios descritos. Este estudio contribuye al conocimiento de las bases fisiopatogénicas por las cuales los AGEs influyen la transformación maligna del tejido prostático envejecido.

Palabras clave: Cáncer de Próstata, AGEs, Epigenética, metilación.

LA ONDA FUGAZ DE CALCIO INDUCE LA DISMINUCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE NOX1 DURANTE LA CICATRIZACIÓN DE CÉLULAS DE ENDOTELIO EN CULTIVO

M, Souto¹. C, Justet¹

1. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina - UdelaR

En nuestro laboratorio se ha estudiado exhaustivamente la onda fugaz de calcio (FCW, Fast Calcium Wave). Esta onda se produce en todas las células en cultivo y tejidos en los que se ha estudiado y se ha observado que estimula la migración y proliferación. Nuestros resultados previamente publicados muestran que en células de córnea de bovino (BCEC) en cultivo estimula la proliferación e inhibe la apoptosis. Asimismo, nuestros resultados más recientes sugieren que estimula la formación de superóxido a partir de NADPH oxidasas (NOX y DUOX) y a nivel de la mitocondria.

En el presente trabajo estudiamos el rol de la FCW sobre la expresión de la NOX1 durante la cicatrización de BCEC en cultivo.

Para estudiar la expresión de la NOX1 utilizamos la técnica de In-cell Western mediante la cual se realizan inmunofluorescencias específicas en placa y se escanea la fluorescencia específica en un equipo apropiado. Como control de carga utilizamos el marcador nuclear Syto60. Asimismo, comparamos los resultados en monocapas indemnes con ensayos de herida por desgarro o modelos de herida con stoppers. Nuestros resultados sugieren que la expresión de la NOX1 disminuye durante las primeras 24 horas de cicatrización. Por otra parte, estudiamos el efecto de la inhibición de la FCW sobre los cambios de expresión de NOX1. Para esto incubamos las células en medio sin calcio extracelular durante la realización de la herida, de modo de evitar la entrada de calcio extracelular. En simultáneo inhibimos la fosfolipasa C con U73122, que media la inducción de liberación de calcio a partir del retículo endoplásmico. Nuestros hallazgos sugieren que la inhibición de la FCW utilizando ambas estrategias en simultáneo inducen el aumento de la expresión de NOX1 hasta niveles comparables a la monocapa celular indemne o incluso mayores.

En conjunto nuestros resultados sugieren que, en BCEC en cultivo la FCW induce un incremento de la expresión de la NOX1 durante las primeras 24hs de cicatrización.

LA ONDA FUGAZ DE CALCIO INDUCE LA FORMACIÓN DE SUPERÓXIDO DURANTE LOS PRIMEROS MINUTOS DE REALIZADA UNA HERIDA EN CÉLULAS DE CórNEA EN CULTIVO

M, Schaffner¹. F, Castro¹. C, Justet¹.

1. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina - UdelaR

En nuestro laboratorio se ha estudiado extensamente el rol de la onda fugaz de calcio (FCW, Fast Calcium Wave) en células de endotelio de córnea de bovino (BCEC) en cultivo. Los trabajos previos muestran que la FCW inhibe la apoptosis y estimula la proliferación durante la cicatrización. Por otra parte, otros investigadores han obtenido resultados que sugieren que la FCW induce la activación de NADPH oxidasas (NOX y DUOX) que forman H₂O₂ a nivel extracelular estimulando la migración y proliferación celular.

En el presente trabajo estudiamos el rol de la FCW sobre la formación de H₂O₂ durante la cicatrización de BCEC en cultivo y su efecto sobre la migración.

Para evaluar la formación de superóxido a partir de las NOX (que posteriormente puede ser dismutado en H₂O₂) utilizamos la sonda dihidro-etidio (DHE) y la monitoreamos bajo el microscopio de epifluorescencia en BCEC en cultivo. Encontramos que la señal de DHE aumenta en el borde de la herida de forma inmediata a la realización de la lesión y durante los primeros 10 minutos de cicatrización. Este incremento puede ser bloqueado por la pre-incubación con ML171 (inhibidor específico de la NOX1) en conjunto con FCCP (desacoplante mitocondrial). Asimismo, la inhibición de la FCW bloquea por completo el incremento de la señal de DHE. Finalmente, hemos determinado que la inhibición de la NOX1 con ML171, la inhibición de las NOX en general utilizando apocinina, o la incubación con H₂O₂ no afectan la velocidad de migración durante la cicatrización en BCEC.

En su conjunto, nuestros resultados sugieren que durante la cicatrización de BCEC en cultivo se produce de forma inmediata a la lesión una onda de incremento de superóxido proveniente tanto de la NOX1 como de la mitocondria. Los resultados sugieren que dicho incremento es inducido por la FCW. Asimismo, en concordancia con nuestros resultados previos que muestran que la FCW no afecta la migración, la inhibición de esta onda de superóxido o la estimulación con H₂O₂ no inducen cambios en la velocidad de cicatrización.

IMÁGENES EN BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

EVALUACIÓN DEL DAÑO AL ADN Y DEL ESTRÉS OXIDATIVO PRODUCIDO EN QUERATINOCITOS HUMANOS TRANSDUCIDOS CON LOS ONCOGENES VIRALES VPH-18 E5, E6, E7 EN UN MODELO IN VITRO DE MICROAMBIENTE TUMORAL

M, Millán¹. J, Hochmann^{1,2}. P, Hernández³. L, Lafon-Hughes^{3,4}. N, D'Aiuto^{1,5}. V, Pereira-Prado². J, Sotelo-Silveira^{1,6}. R, Bologna-Molina². M, Arocena^{1,5}

1. Departamento de Genómica - IIBCE; 2 Departamento de Diagnóstico en Patología y Medicina Bucal, Facultad de Odontología - UdelaR; 3. Departamento de Genética - IIBCE; 4. Grupo de Biofísicoquímica, Departamento de Ciencias Biológicas, Centro Universitario Regional Litoral Norte - sede Salto, UdelaR (CENUR LN, UdelaR); 5. Departamento de Biología Odontológica, Facultad de Odontología - UdelaR; 6. Sección Biología Celular, Facultad de Ciencias - UdelaR

La infección persistente con virus del papiloma humano de alto riesgo (VPH) es el principal factor de riesgo asociado con el desarrollo de cánceres cervicales y otros cánceres genitales. El potencial de transformación maligna se debe a la presencia de tres oncoproteínas de los VPH (E6, E7, E5), y entre los cofactores que promueven la transformación maligna se encuentran la inflamación crónica y el estrés oxidativo (OS). En cuanto a OS, tanto la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS), como la cantidad de Óxido Nítrico (NO) son importantes promotores de la carcinogénesis. En este estudio, hemos utilizado queratinocitos humanos transducidos con oncogenes de VPH para evaluar los niveles de estrés oxidativo y daño en el ADN en un modelo in vitro del microambiente tumoral hipóxico temprano. Por otra parte, el daño genético puede causar profundas alteraciones en la arquitectura nuclear. Asimismo, utilizamos microscopía de fase cuantitativa para evaluar la distribución de la masa seca nuclear como una forma indirecta de evaluar los cambios en la arquitectura nuclear causados por la hipoxia y los oncogenes del VPH. Nuestros resultados indican que la combinación de oncogenes de VPH e hipoxia promueve el daño del ADN, según lo medido por el ensayo del cometa y los niveles de γ H2AX nuclear. Observamos niveles de ROS intracelulares significativamente más altos en las células HaCaT que contenían los oncogenes HPV-18 en comparación con las células HaCaT. En cuanto al contenido de NO, fue significativamente mayor en HaCaT E5/E6/E7-HPV18 cultivadas en hipoxia en comparación con las células HaCaT en hipoxia. Además, las células HaCaT E5/E6/E7-HPV18 presentaron mayor daño genotóxico medido por la intensidad de fluorescencia de γ H2Ax y por el ensayo del cometa, en hipoxia en comparación con normoxia. En relación con los cambios a nivel nuclear, nuestros resultados indican que la densidad de masa seca nuclear aumenta significativamente con la hipoxia, mientras que el volumen nuclear tiende a disminuir. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la interacción entre oncogenes del VPH y el microambiente hipóxico genera condiciones que promueven el daño del ADN, el estrés oxidativo, así como una arquitectura nuclear alterada, lo cual impulsa el proceso de transformación maligna.

VISUALIZANDO EL ESCAPE ENDOSOMAL DEL ARN

M, Li Calzi¹. V, Blanco^{1,2}. A, Cayota^{1,3}. JP, Tosar^{1,4}.

1. Laboratorio de Genómica Funcional, Institut Pasteur de Montevideo 2. Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República 3. Hospital de Clínicas, Universidad de la República 4. Unidad de Bioquímica Analítica, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

Se sabe que la comunicación intercelular puede estar mediada por diferentes macromoléculas, como los ARNs, y que pueden viajar encapsulados en vesículas extracelulares (EVs). Sin embargo, los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la internalización y escape de ARNs encapsulados en EVs aún no se comprenden del todo. Para profundizar en estos aspectos, se estudió mediante microscopía confocal y Lattice Light Sheet (LLSM) en células vivas la dinámica de la internalización de EVs marcadas con una tinción lipídica y purificadas por métodos cromatográficos, pudiendo así realizar un seguimiento en tiempo real del camino desde el medio extracelular hacia el interior de la célula. Además, se construyó líneas celulares que expresaran proteínas lisosomales fluorescentes establemente, de modo tal de poder estudiar las interacciones EV-(endo)lisosoma en 4D mediante live-cell imaging por LLSM. Nuestros resultados son consistentes con una captación de EVs mediante macropinocitosis, al menos en las líneas celulares estudiadas. Inhibidores de la endocitosis afectaron la internalización de las EVs, pero no su interacción con la membrana plasmática. Por otra parte, se marcó el ARN extracelular (tanto vesicular como no vesicular) con un fluorocromo para poder visualizar el escape endosomal tanto del ARN captado en vesículas como del ARN captado espontáneamente, presente desnudo en el medio extracelular. Se identificaron, además, proteínas cuya ablación genética provoca la acumulación del ARN en endosomas, inhibiendo de este modo el escape endosomal. En suma, nuestro trabajo se centra en la visualización de lo que sucede con el ARN extracelular en su viaje hacia el interior de la célula, en donde creemos que escapa de su burbuja endosomal hacia el citoplasma fruto de interacciones transientes con lisosomas que, consistentemente, acidifican su lumen y así permiten que esta macromolécula escape. Cabe mencionar que el fenómeno del escape endosomal se considera actualmente el cuello de botella en las terapias con ARN, por lo que el estudio de este proceso reviste una particular importancia.

Palabras clave: exosomas, fragmentos de tRNA, microscopía de fluorescencia, Lattice Light sheet, internalización vesicular

ESTUDIO DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR ESTADÍO-ESPECÍFICA DE LA PROTEÍNA TcALBA30 DE TRYPANOSOMA CRUZI EN FUNCIÓN DE SU ESTADO DE ACETILACIÓN.

F, Castro¹. L, Pérez-Díaz¹

1. Sección Genómica Funcional. Facultad de Ciencias

El dominio ALBA (Acetylation Lowers Binding Affinity) es un dominio de unión a ácidos nucleicos identificado inicialmente en proteínas de archeas y luego en eucariotas. Estas proteínas participan en diferentes procesos celulares como regulación de la traducción, mantenimiento de la estabilidad del genoma y compactación de la cromatina, regulación de la transcripción y procesamiento del ARN, entre otros. Dado que las proteínas ALBA pueden unirse tanto a ADN como a ARN, se espera encontrarlas en el núcleo y en el citoplasma. Esta localización dual ya ha sido reportada en otros parásitos tripanosomatídeos, como *T. brucei* y *L. infantum* en los que se evidenció un patrón de localización subcelular dinámico dependiente de estadio y una implicancia en la regulación postranscripcional de la expresión génica, y en *T. gondii* y *P. falciparum* donde la localización estadio específica depende del estado de acetilación de la proteína. Nuestro grupo ha identificado 4 proteínas con dominio ALBA en *T. cruzi* cuya función aún no ha sido caracterizada, entre ellas la proteína TcAlba30. Ensayos de inmunoprecipitación de ARN revelaron que la proteína cMyc-TcAlba30 es capaz de unirse a ARNm codificantes para proteínas de superficie y proteínas reguladoras de la traducción.

Para estudiar la localización de TcAlba30 en función de su estado de acetilación se generaron parásitos transfectantes sobreexpresando TcAlba30 fusionada a GFP y una versión mutante no-acetilable de la misma fusionada a RFP, donde se sustituyeron las lisinas acetilables por argininas. A través de infección de células de mamífero en cultivo con parásitos expresando estas proteínas fusionadas a fluoróforos, se obtuvieron las formas infectivas del parásito tripomastigota celular y amastigota para estudiar la localización de las versiones acetilable y no acetilable de esta proteína en los distintos estadios del ciclo de vida mediante microscopía confocal y microscopía de expansión de ultraestructura.

En los estadios del ciclo de vida analizados, ambas proteínas presentan una localización mayormente citoplasmática enriquecida en la región perinuclear presentando además señales puntuales en el interior del núcleo donde parece localizarse el nucleolo. En epimastigotas, la forma no infectiva del parásito, la proteína acetilable presenta una localización difusa a lo largo del citoplasma mientras que la variante no-acetilable se aglomera en gránulos discretos. En amastigotas la localización nuclear de la proteína es más evidente tanto para la proteína salvaje como para la versión mutante no acetilable.

Los resultados obtenidos contribuyen al esclarecimiento de la posible función dual de una proteína con dominio ALBA en *T. cruzi* en función de su estado de acetilación.

ESTUDIO DE CARACTERÍSTICAS BIOFÍSICAS DE LA CILIA RELACIONADAS A LA REGULACIÓN DEL TRANSPORTE DE PROTEÍNAS AL ORGANELO

M, Cortabarría². P, Lepanto². B, Torrado³. A, Vallmitjana³. J, Reiter⁴. JL, Badano². L, Malacrida^{1,2}. F, Irigoín^{1,2}

1. Facultad de Medicina, UdelaR, Uruguay, 2. Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay, 3. University of California Irvine, USA, 4. University of California, San Francisco, USA

La cilia primaria es un organelo celular que se extiende desde la superficie celular y tiene un rol fundamental en la comunicación de la célula con su entorno ya que, en su membrana, contiene receptores de importantes vías de señalización. A pesar de su importancia biológica, todavía no se conocen con exactitud los mecanismos por los cuales se clasifican y transportan las proteínas a la cilia. En la base de la cilia se encuentra una región denominada zona de transición (ZT) que cumple una función de barrera entre el interior de la cilia y el citosol, así como también entre la membrana ciliar y la membrana plasmática. Nuestro objetivo es estudiar características biofísicas de la cilia y de la ZT, tales como la fluidez de la membrana y el hacinamiento molecular, que podrían contribuir en la función de barrera. Una membrana menos fluida dificultaría la difusión de proteínas de membrana, y un mayor hacinamiento molecular, podría dificultar la difusión de proteínas solubles.

Para analizar estas características biofísicas utilizamos las sondas LAURDAN y ACDAN. Estas sondas tienen la capacidad de cambiar su espectro de emisión según las características del microambiente en el que se encuentren. Trabajamos con células NIH/3T3 que expresan de forma estable proteínas de la cilia y ZT marcadas con etiquetas (Sstr3-Snap y B9D1-Halo, respectivamente) que permiten localizar ambas regiones en microscopía de fluorescencia. Mediante el uso de microscopía hiperespectral y el análisis de las imágenes usando gráficos de fasores, evaluamos los cambios en los espectros de emisión de LAURDAN y ACDAN. Logramos demostrar que en la ZT la fluidez de la membrana es menor que en el cuerpo de la cilia y el hacinamiento molecular es mayor.

Además, buscaremos relacionar estas características biofísicas con la funcionalidad de la ZT y la composición de fosfoinosítidos de la membrana ciliar. Para ello utilizaremos células que tienen estas características alteradas: MEFs ko para una proteína de la ZT (Tmem231) o para la fosfatasa ciliar que convierte el PtdIns(4,5)P₂ en PtdIns(4)P en la cilia.

NEURONAS Y PROTEÍNAS RIBOSOMALES: ABORDAJE A SÚPER RESOLUCIÓN CON TRANSCRIPTÓMICA Y MICROSCOPIA

J, Garat¹. A, Di Paolo². P, Smircich^{1,3}. JR, Sotelo-Silveira^{1,4}

1. Departamento de Genómica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Ministerio de Educación y Cultura, 2. Plataforma de Microscopía Confocal y Epifluorescencia, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Ministerio de Educación y Cultura, 3. Sección Genómica Funcional, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. 4. Departamento de Biología Celular y Molecular, Sección Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

Estudios recientes han desafiado la visión clásica del ribosoma, revelando la existencia de ribosomas heterogéneos con roles regulatorios de la traducción. Dado que las neuronas son células altamente diversas y extremadamente polarizadas, comprender los mecanismos de traducción local y cómo están compuestos los ribosomas en diferentes subtipos neuronales y compartimentos subcelulares como el axón y el soma resulta importante para analizar posibles funciones en la regulación de la traducción neuronal. En este contexto, nos planteamos estudiar la expresión de genes codificantes para proteínas ribosomales (RP) y su distribución en somas y axones de diferentes subtipos neuronales. Mediante el reanálisis de datos de transcriptómica de célula única (publicados por el Allen Institute), detectamos expresión diferencial de varios genes codificantes para RPs entre somas de 13 subtipos neuronales del corteza cerebral de ratón. Interesantemente, un subgrupo de RPs mostró una variabilidad significativamente mayor en su expresión entre esos subtipos neuronales. Ejemplo de ello son Rpl21 y Rps27, cuyos ARNm se detectaron sobreexpresados en neuronas GABAérgicas Lamp5 y Vip respectivamente, en comparación con todos los subtipos de neuronas glutamatérgicas. Además, resultados preliminares sugieren que podría haber conservación de la sobreexpresión del gen Rps27 en neuronas GABAérgicas Vip en diferentes especies, incluyendo monos tití, macacos rhesus y humanos. En paralelo, examinamos la localización de ARNm codificantes para RP y RP en axones utilizando diversas técnicas basadas en microscopía confocal y en microscopía de súper resolución de molécula única. En primer lugar, evidenciamos la presencia de ARNm codificantes para RPs en axones en diferentes etapas del desarrollo, y detectamos neosíntesis de RPs en axones. Luego, encontramos evidencia de ribosomas asociados con ARNs en axoplasmas (obtenidos por microdissección) de nervios periféricos de rata, y estudiamos la organización de los ribosomas en axones mielinizados maduros con microscopía STED y con DNA-PAINT fluorogénico. Para los experimentos de DNA-PAINT, utilizamos un microscopio estocástico de superresolución recientemente instalado en colaboración con la plataforma de microscopía del IIBCE que permite resolver al menos 40nm. En suma, estos hallazgos resaltan la variabilidad en la expresión de genes codificantes de RPs entre los somas de subtipos neuronales en corteza cerebral de ratón y contribuyen a nuestra comprensión del proceso de síntesis local en axones. Estos resultados dejan planteadas preguntas sobre la funcionalidad de esta regulación y su posible reflejo en las diferencias de abundancia de proteínas, que deberán ser abordadas con otras metodologías que permitan cuantificar proteínas o evaluar composición de los ribosomas.

METABOLISMO, REGULACIÓN Y SEÑALIZACIÓN

EFFECTO DE LA PIEL UVA TANNAT PROVENIENTE DEL ORUJO COMO INHIBIDOR NATURAL DE AGES EN CULTIVOS DE 3 DIMENSIONES DE ACINOS MAMARIOS

MA, Faulord Sosa¹. MP, Frade¹. M, Rodríguez-Teja¹. L, Pastro Cardoso¹. A, Fernández-Fernández²

1. Laboratorio de Interacciones Célula-Ambiente, Departamento de Genética, Facultad de Medicina, Universidad de la República. 2. Laboratorio de Bioactividad y Nanotecnología de Alimentos, Área Química de Alimentos, Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Química, Universidad de la República.

En Uruguay, el cáncer de mama es la neoplasia con mayor incidencia en mujeres y la de mayor mortalidad, siendo la edad el factor de riesgo más importante. Durante el envejecimiento tisular, la membrana basal del tejido epitelial acumula productos finales de glicación avanzada (AGEs) que entrecruzan sus componentes, provocando su rigidez, lo que se traduce en mecano-señales que alteran el fenotipo acinar normal de la célula. Los AGEs son moléculas derivadas de una reacción de pardeamiento no enzimático entre un azúcar reductor y un grupo amino libre. La piel de uva Tannat proveniente del orujo (principal residuo/subproducto de la elaboración del vino) presenta propiedades bioactivas por su perfil en compuestos fenólicos, por lo que podría inhibir la formación de los AGEs o revertir el fenotipo. En este trabajo se propuso estudiar el efecto de la piel de uva tannat proveniente del orujo como inhibidor natural de AGEs en cultivos de 3D de acinos mamarios. Los AGEs fueron generados *in vitro* mediante seroalbúmina bovina (BSA) y glucosa a 50 °C por 4 días y se utilizó la línea celular MCF10A de células epiteliales de mama. Se realizó un extracto hidro-alcohólico-ácido de piel de uva Tannat. El extracto mostró una inhibición del 53% de los AGEs formados *in vitro* para una concentración de 0,3 mg/mL. En cultivos 2D, las células MCF10A no mostraron citotoxicidad a una concentración máxima de 0,06 mg/mL de extracto pudiendo determinar la dosis máxima para los ensayos celulares posteriores. A futuro, se pondrá a punto la técnica para realizar este mismo ensayo en cultivo 3D donde se analizará el fenotipo acinar y la expresión de los genes de la cadena de transportes de electrones, que se encuentran aumentados en condiciones de rigidez.

NANOBURBUJAS DE HIDROGENO COMO MECANISMO DE CARDIOPROTECCIÓN

V, Guizzo¹. A, Santander¹. L, Chavarría¹. M, Benitez-Verdier¹. R, Cardozo¹. N, Mujica¹. L, Dominguez¹. F, Savio¹. G, Ferreira¹.

1. 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 en su interior, que pueden durar muchas horas en dicho estado y que tienen generalmente entre 70 a 120 nm de tamaño, formando redes de interconexión que pueden estar sujetas a movimiento browniano. Las nanoburbujas están compuestas de hidrógeno molecular pero en su generación y junto a ellas se observan radicales de hidrógeno en equilibrio, con fuerte tendencia a donar su electrón no apareado provocando reducción del medio. Esta es una biotecnología nueva de no más de 10 años. Decidimos probar si las nanoburbujas de H₂ (nH₂), son capaces de provocar cambios en la función de corazones aislados de cobayo, teniendo en cuenta la alta dependencia de los cardiomiocitos del metabolismo oxidativo en condiciones normales y patológicas. Cuando se sometieron los corazones aislados a concentraciones crecientes de nH₂ en partes por billón (ppb), observamos en condiciones basales, un aumento transitorio de la bradicardia y reserva cardíacas, con aumento menos marcado del inotropismo cardíaco que se produjo generalmente minutos después de la bradicardia. Al realizar los experimentos con un marcapasos externo para medir la reserva de función cardíaca, observamos que las nH₂ aumentan dicha reserva entre un 30 y un 60%, consistentemente con los efectos bradicardicos. En corazones sometidos a injuria por isquemia/reperfusión, las nH₂ prolongaron la respuesta cardíaca contráctil ante la isquemia y también mejoraron la recuperación de la función cardíaca ante la reperfusión en comparación con la perfusión sin nH₂. Los resultados sugieren que las nH₂ en virtud de su alta estabilidad y capacidad de difusión, pueden ser un tratamiento coadyuvante eficaz en las patologías donde el estrés oxidativo cardíaco juega un rol preponderante. Investigaciones en curso ayudarán a establecer posibles mecanismos de acción y extensión de esta acción.

Agradecemos a CSIC y Laboratorio Microsules

ROL DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN PI3K Y SRC DURANTE LA FORMACIÓN DE QUISTES RENALES Y SU VINCULACIÓN CON EL PROCESO DE CILIOGÉNESIS

G, Otero¹. N, Rego². L, Spangenberg^{2,3}. P, Lepanto¹. F, Irigoín^{1,4}. JL, Badano¹. IA, Drummond⁵. M, Cardenas-Rodriguez¹

1. Laboratorio de Genética Molecular Humana, Institut Pasteur de Montevideo; 2. Unidad de Bioinformática, Institut Pasteur de Montevideo; 3. Departamento Básico de Medicina, Hospital de Clínicas-Facultad de Medicina, Universidad de la República; 4. Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de la República; 5. Mount Desert Island Biological Laboratory

Las células epiteliales de los túbulos renales están constantemente sometidas a fuerzas mecánicas debido al líquido que fluye dentro de los mismos. Estas fuerzas modulan procesos celulares a través de efectos sobre las cilias que se encuentran expuestas a la luz de los túbulos. Defectos en las cilias exacerbaban el desarrollo de quistes renales, sugiriendo que las cilias juegan un papel central en la fisiología renal. Se ha demostrado que el factor de transcripción *foxj1a*, regulador central del proceso de ciliogénesis, se induce en respuesta al estiramiento epitelial y la formación de quistes renales. En este proyecto proponemos estudiar si en el epitelio renal las fuerzas mecánicas activan factores de transcripción de genes ciliares, como parte de un proceso de retroalimentación normal que regula la homeostasis renal y cumple una función regenerativa. Para esto, nos propusimos combinar estrategias genéticas, análisis moleculares y herramientas bioinformáticas con el objetivo de contribuir al entendimiento de la etiología, la progresión de la enfermedad quística renal.

Por un lado, utilizando una línea mutante de pez cebra y una biblioteca de inhibidores de quinasas, identificamos que las vías de señalización PI3K y Src son necesarias para la inducción de los factores de transcripción prociliogénicos *foxj1a* y *rfx2*. La inhibición de estas vías bloquea la inducción de estos factores de transcripción en respuesta al estiramiento epitelial durante la formación de quistes renales. Actualmente nos encontramos desarrollando líneas transgénicas de pez cebra que nos permitan alterar la función de las quinasas PI3K y Src y explorar in vivo su rol en el desarrollo de quistes renales.

Por otro lado, a partir de un ensayo de transcriptómica de túbulos renales aislados analizamos que vías de señalización, factores de transcripción y quinasas se encuentran inducidos en las condiciones de quistes renales. A partir del análisis de expresión diferencial observamos un enriquecimiento en términos vinculados a la cilia y a partir de un análisis de enriquecimiento de factores de transcripción identificamos a los factores HAND1, RFX1, MIF1. Como siguiente paso, analizaremos el rol que cumplen estos factores de transcripción, su relación con las vías PI3K y Src y con la formación de nuevas cilias en el desarrollo de quistes renales. A partir del ensayo de transcriptómica nos proponemos identificar elementos génicos reguladores que responden a las vías PI3K y Src y que son esenciales para la expresión génica activada por el estiramiento a nivel renal.

EXPLORANDO EL PAPEL DE LA FOSFATASA MICOBACTERIANA PTPA EN LA MODULACIÓN DEL METABOLISMO LIPÍDICO DEL MACRÓFAGO DURANTE LA INFECCIÓN CON MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS.

G, Betancour¹. M, Forrellad². M, Margenat¹. A, Costáble¹. MM, Portela³. F, Savoretti⁴. M, Maio⁵. J, Barros⁵. AM, Ferreira⁶. L, Balboa⁵. G, Gago⁴. F, Bigi². A, Villarino¹

1. Instituto de Biología, Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, 2. Instituto de Biotecnología, CICVyA-INTA, Buenos Aires, Argentina, 3. Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas, Institut Pasteur de Montevideo, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay, 4. Laboratorio de Fisiología y Genética de Actinomycetes, Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR CONICET), Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina, 5. Instituto de Medicina Experimental (IMEX), CONICET, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina, 6. Instituto de Química Biológica, Unidad de Inmunología, Facultad de Ciencias/Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

La fosfatasa de tirosina de *Mycobacterium tuberculosis*, PtpA, es un factor de virulencia que la bacteria introduce en el citosol de los macrófagos durante la infección. PtpA afecta la actividad de proteínas eucariotas implicadas en la respuesta inmune innata, la apoptosis y potencialmente en el metabolismo de los lípidos. Nuestro grupo aisló previamente, como potencial sustrato de PtpA, a la subunidad alfa de la proteína trifuncional humana (hTFP α), una enzima clave de la β -oxidación mitocondrial de ácidos grasos de cadena larga. Además, demostró que la interacción entre ambas proteínas se da a través del sitio activo de PtpA, identificando in silico a la Tyr271 de hTFP α como su potencial blanco. En el presente trabajo, utilizando las formas recombinantes de PtpA y hTFP α se demostró que dicha Tyr271 es efectivamente el blanco de PtpA. Esta Tyr271 se ubica en la hélice-10, relevante para la actividad y anclaje de la hTFP α a la membrana interna mitocondrial, lo que hace suponer que su estado de fosforilación podría estar modulando su actividad y/o localización sub-celular en las células humanas. Además, un análisis filogenético de la conservación de la Tyr271 y la hélice-10, muestra que ambas están ausentes en bacterias y se encuentran conservadas sólo en eucariotas complejos. En este contexto, nuestra hipótesis es que la fosfatasa micobacteriana PtpA una vez en el citosol del macrófago interfiere con la actividad y/o localización sub-celular de la hTFP. Esto explicaría resultados publicados que muestran que hTFP α ya no se detecta en las mitocondrias de los macrófagos infectados con la cepa virulenta de *Mtb* H37Rv. Observación que nuestro equipo busca verificar, por lo que realizó ensayos de infección de macrófagos con una cepa aún más virulenta, *Mtb* CDC1551 y la cepa mutante *Mtb* CDC1551- Δ PtpA. En estos ensayos se busca evaluar en especial los efectos de PtpA a nivel del metabolismo de los lípidos. Al momento, nos encontramos analizando el contenido de lípidos de las muestras provenientes del modelo de infección de cultivos primarios de macrófagos humanos y del modelo de infección de macrófagos derivados de monocitos THP1. Los resultados preliminares muestran diferencias entre ambos modelos y sugieren que la ausencia de PtpA se correlaciona con una disminución en la acumulación de lípidos en el modelo de infección de cultivos primarios de macrófagos. Esto va en acuerdo con nuestra hipótesis de que la fosfatasa micobacteriana PtpA afecta la actividad y/o localización sub-celular de la hTFP α , causando una disminución de la oxidación de los ácidos grasos de cadena larga en la mitocondria y por ende su acumulación en el citosol de los macrófagos, donde estarán disponibles para contribuir con la persistencia de la bacteria.

METABOLITOS PLASMÁTICOS Y EXPRESIÓN GÉNICA HEPÁTICA DE GENES RELACIONADOS A LA VÍA PENTOSAS FOSFATO, CICLO DE LA UREA Y SÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS EN VACAS LECHERAS EN PASTOREO

M. García-Roche^{1,2}, G. Cañibe¹, A. Astessiano¹, D. Talmón¹, A. Mendoza³, A. Cassina², C. Quijano² and M. Carriquiry¹

1. Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Uruguay. 2. Centro de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay. 3. Programa Nacional de Producción de Leche, INIA "La Estanzuela" Uruguay

Se utilizaron vacas lecheras multíparas Holstein en pastoreo (563 ± 29 kg de peso vivo, 3.1 ± 0.1 condición corporal y parto en otoño) para estudiar el efecto de distintos niveles de pastoreo en metabolitos plasmáticos y expresión hepática de genes relacionados a la vía pentosas fosfato, el ciclo de la urea y la síntesis de ácidos grasos. Dieciséis vacas fueron asignadas al parto a una estrategia de alimentación en la que pastoreaban *Medicago sativa* y *Dactylis glomerata* en una ($9,1$ kg MS/vaca/d, FixP, $N = 8$) o dos sesiones ($16,4$ kg MS/d, MaxP, $N = 8$) y además se suplementaron con una dieta totalmente mezclada ($15,3$ kg MS/vaca/d, 50:50-forraje concentrado base seca, FixP) o concentrado energético-proteico ($7,4$ MS/vaca/d, MaxP) durante el ordeño. Se tomaron muestras de plasma y biopsias de hígado a los 176 ± 21 días en leche. Se estudiaron los niveles de urea, glucosa, creatinina, albúmina y proteína total en plasma utilizando kits comerciales. Además, se estudió la abundancia de ARNm de genes clave de la vía de las pentosas fosfato: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), ribosa 5-fosfato isomerasa A (RPIA) y fosfogluconato deshidrogenasa (PGD), el ciclo de la urea: argininosuccinato sintetasa (ASS1), carbamilfosfato sintetasa (CPS1), ornitina transcarbamilasa (OTC) y N-acetilglutamato sintetasa (NAGS) y la síntesis de ácidos grasos: ácido graso sintasa (FAS) y acetil-CoA carboxilasa (ACACA) mediante qPCR en tiempo real en biopsias de hígado. Los datos se analizaron mediante un modelo que incluyó la estrategia de alimentación como efecto fijo. La producción de leche corregida por energía tendió a ser mayor, mientras que el contenido de proteína fue menor para MaxP que para FixP ($28,3$ vs. $25,5 \pm 1,0$ kg/d, media \pm ESM, $P = 0,06$ y $3,46$ vs. $3,23 \pm 0,06$ %, $P < 0,05$) y no se encontraron diferencias en el contenido de grasa en leche ($4,34$ vs. $4,00 \pm 0,17$ %, $P = 0,18$ para FixP y MaxP respectivamente). Los niveles plasmáticos de urea fueron mayores para MaxP que para FixP ($6,6$ vs. $5,0 \pm 0,81$, $P < 0,01$), no se encontraron diferencias en los niveles de creatinina, glucosa, albúmina o proteína total. La expresión de RPIA y ACACA fue mayor para FixP que para MaxP ($1,2$ vs. $0,6 \pm 0,2$, $P < 0,05$ y $1,6$ vs. $0,9 \pm 0,2$, $P < 0,05$) y la expresión de G6PD y FAS tendió a ser mayor para FixP que para MaxP ($1,5$ vs. $0,9 \pm 0,1$, $P = 0,07$ y $1,3$ vs. $0,8 \pm 0,2$, $P = 0,09$). La expresión de PGD y de los genes relacionados al ciclo de la urea no se vio afectada por la estrategia de alimentación. Nuestros resultados muestran que vacas lecheras con menor nivel de pastoreo en su dieta mostraron menores niveles de urea en plasma, aunque esto no se tradujo en una menor expresión de ARNm de genes relacionados al ciclo de la urea. Por otra parte, estas vacas mostraron una mayor abundancia de ARNm de genes relacionados a la vía de las pentosas fosfato y la síntesis de ácidos grasos, probablemente relacionado a los procesos de biosíntesis de lactancia media-tardía.

ROL ACTIVO DEL HÍGADO Y TEJIDO ADIPOSO EN LA TERMOGÉNESIS DEPENDIENTE DE CREATINA: IMPORTANCIA DEL METABOLISMO DE UN CARBONO

C, Espasandín^{1,2}. K, Cal^{1,3}. A, Leyva^{4,5}. J, Rodríguez-Duarte^{1,4}. L, Santos¹. A, López⁶. G, Moyna⁶. GV, López^{4,7}. C, Batthyány⁴. C, Escande¹

1 Laboratorio Patologías del Metabolismo y el Envejecimiento. Institut Pasteur de Montevideo, 2 Unidad de Bioquímica. Facultad de Veterinaria – UdelaR, 3 Unidad Biofísica. Facultad de Veterinaria – UdelaR, 4 Laboratorio de Biología Vascular y Desarrollo de Fármacos. Institut Pasteur de Montevideo, 5 Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas. Institut Pasteur de Montevideo, IIBCE, 6 Laboratorio de Físicoquímica Orgánica, Departamento de Química del Litoral. CENUR Litoral Norte – UdelaR, 7 Departamento de Química Orgánica. Facultad de Química - UdelaR.

La obesidad es un trastorno metabólico crónico, y factor predisponente para el desarrollo del síndrome metabólico, diabetes tipo II y enfermedades cardiovasculares. El desarrollo de herramientas farmacológicas que aumenten el gasto energético por medio de la activación de la termogénesis actualmente ha cobrado gran interés para el tratamiento de la obesidad y sus patologías asociadas. La termogénesis es una respuesta activa fisiológica, presente en organismos homeotermos, mediada por estimulación beta-adrenérgica, en respuesta a la temperatura ambiental. Una vía termogénica que ha sido descrita recientemente es aquella impulsada por creatina, en el tejido adiposo marrón y beige. El hígado es el principal productor de creatina endógena, y para su síntesis se requiere de tres aminoácidos: glicina, arginina y metionina. La metionina (aminoácido esencial), quien cede su grupo metilo para la síntesis de creatina, debe reciclarse. El ciclo de reciclaje de metionina forma parte del metabolismo de un carbono. Para mantener los niveles de creatina en el tejido adiposo, se ha visto que tanto la síntesis local como el transporte transmembrana de creatina proveniente del hígado, parecerían tener un rol importante. Sumado a esto, ha sido propuesta la existencia de un cross-talk entre el hígado y el tejido adiposo, en contextos pro-termogénicos. Sin embargo, se desconoce de qué manera el hígado se adapta a las necesidades de creatina durante la termogénesis. El objetivo de este trabajo fue analizar la respuesta del hígado y tejido adiposo sobre la síntesis de creatina y el reciclaje de metionina durante la termogénesis inducida por frío. Realizamos experimentos de tipo cold-challenge, que consistieron en exponer a ratones C57Bl/6 a 4°C durante 48 horas, y medimos metabolitos y expresión de mRNAs de varias enzimas implicadas en estas vías, tanto a nivel hepático como en tejido adiposo. Logramos evidenciar el rol activo de estos tejidos en la producción de creatina y el reciclaje de metionina durante la respuesta termogénica. También observamos un aumento significativo en los niveles de creatina en plasma. Se necesitan otros tipos de ensayos para corroborar que exista un flujo de creatina desde el hígado al tejido adiposo en el marco de la hipótesis de nuestra línea de investigación, en la cual proponemos que el hígado es esencial para hacer frente al aumento de las demandas de creatina por parte del tejido adiposo, aumentando de manera activa su síntesis y exportación.

BIOTECNOLOGÍA Y BIOCATÁLISIS

APITOXINA TIENE COMPONENTES QUE MEJORAN LA RECUPERACIÓN DEL MIOCARDIO ANTE INJURIA POR ISQUEMIA/REPERFUSIÓN Y ESTABILIZAN EL RITMO CARDÍACO

V, Guizzo¹. A, Santander¹. M, Benitez-Verdier¹. R, Cardozo¹. L, Chavarria¹. L, Dominguez¹. N, Mujica¹. S, Sastre^{1,2}. G, Ferreira¹

1 Laboratorio de Canales Iónicos, Membranas Biológicas y Señalización Celular. Unidad Académica de Biofísica. 2 CelnBio. Facultad de Medicina. Universidad de la República. Montevideo. Uruguay. .

La función del corazón es críticamente dependiente de canales iónicos, de la circulación de calcio adecuada y del metabolismo mitocondrial. Las poliaminas son moduladores importantes de las funciones de canales iónicos. También tienen un rol antioxidante importante vinculado a su acción mitocondrial. Al respecto nos preguntamos si el veneno de abejas uruguayas (apitoxina), que contiene productos con poliaminas (algunas con efecto inhibidor en calmodulina, como por ejemplo la melitina), pueden ser usadas para terapia preventiva y/o terapéutica en corazones aislados en condiciones basales y ante situaciones patológicas muy frecuentes como ser la injuria por isquemia/reperfusión que se da en los infartos de miocardio. Corazones aislados de cobayo se sometieron a apitoxina ultrasonificada obteniéndose curvas Dosis Respuesta (DR) de función cardiaca en situación basal. La exposición a apitoxina produjo efectos levemente inotrópicos negativos con mayor variabilidad en frecuencia y ritmo cardíacos. En injuria por isquemia/reperfusión se observaron efectos variables transitorios de dicha composición, observándose en ocasiones contracciones sostenidas por tiempos más prolongados durante la isquemia y mejor recuperación de la actividad contráctil con menos arritmias en la reperfusión. Al realizar los experimentos con Melitina purificada, observamos mejor el inotropismo negativo, pero a diferencia de la mezcla de apitoxina, los corazones mantuvieron ritmos muy regulares con bradicardia sostenida, presumiblemente debido a la ausencia de otras poliaminas en la mezcla. En injuria por isquemia/reperfusión, la melitina fue claramente beneficiosa en relación con los controles, manteniendo la contracción y evitando arritmias. Los estudios sugieren que en la mezcla de apitoxina hay compuestos que pueden tener aplicación a nivel cardiovascular destacándose entre ellos la melitina, quien presumiblemente por su acción en calmodulina, repercute en varios canales iónicos y en la circulación de calcio cardiaca, provocando una estabilización de la misma.

Agradecemos a CSIC y a Laboratorio Microsules.

EFFECTOS DE EXTRACTOS DE BACTERIAS ANTÁRTICAS SOBRE UN MODELO IN VITRO DE CICATRIZACIÓN

H, Pazos¹. ME, Vila². D, Davyt³. JJ, Marizcurrena⁴. S, Castro-Sowinski⁴. D, Alem¹. L, Canclini¹

1. Departamento de Genética-Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. 2. Departamento de Bioingeniería, Instituto de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería-UdelaR. 3. Departamento de Química Farmacéutica, Facultad de Química-UdelaR. 4. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias-UdelaR.

La cicatrización cutánea es un proceso fisiológico que incide sobre la salud física, estética y psicológica del individuo. En la medicina actual, mediante la aplicación de diversas terapias se puede propiciar su adecuada evolución. Sin embargo, la efectividad que alcanzan estos tratamientos aún es moderada y los sistemas de salud a nivel mundial están enfrentando desafíos crecientes para el manejo y tratamiento de heridas crónicas. Por tanto, es fundamental la búsqueda de nuevos candidatos para la modulación del proceso cicatricial. Actualmente, el empleo de metabolitos de bacterias extremófilas antárticas en la investigación médica e industrial es un campo emergente y se muestra como una alternativa biotecnológica en la mejora del proceso cicatricial. Se pretende analizar si extractos de bacterias antárticas contribuyen al cierre de heridas en un modelo epitelial humano in vitro: línea celular HaCaT. Se seleccionó un total de doce bacterias pertenecientes a cinco géneros diferentes de la colección UV de la Sección Bioquímica de Facultad de Ciencias (UdelaR) para la preparación de extractos en DMSO y extractos acuosos. Mediante ensayos de cierre de herida se realizó un cribado de los veinticuatro extractos generados (dos por cada bacteria) y se identificaron diez extractos que propiciaron un cierre de herida estadísticamente mayor que el generado por el control. De ellos, el mayor cierre se observó con el extracto en DMSO de *Sphingomonas* sp. UV9 (ExUV9) que posibilitó un cierre casi total de la herida, por lo que se seleccionó como candidato para continuar con estudios de genotoxicidad y viabilidad celular. Los ensayos tandem de Resazurina y Sulforodamina B no mostraron toxicidad en cultivos de HaCaT tratados con ExUV9; incluso, se observó que las mayores concentraciones del extracto podrían estar promoviendo la proliferación celular. Mediante ensayos de micronúcleos con bloqueo de citocinesis se evidenció que el tratamiento con ExUV9 no genera genotoxicidad en cultivos de HaCaT. Además, se comprobó que, tanto tratamientos de corta duración como tratamientos prolongados con ExUV9 en HaCaT disminuyen la marcación de γ H2Ax a valores estadísticamente menores que el control por lo que pudiera estar confiriendo a las células una mayor capacidad reparadora del ADN. En conclusión, estas evidencias sugieren que ExUV9 contribuye al cierre de herida y no genera citotoxicidad ni genotoxicidad en HaCaT por lo que apunta a ser un candidato prometedor para ser empleado como agente terapéutico cicatrizante.

BIOPROSPECCIÓN DE ENZIMAS XILANOLÍTICAS EN MICROORGANISMOS ANTÁRTICOS

F, Risso¹, P, Rodríguez², M, Guigou¹

1. Departamento de Bioingeniería, Instituto de Ingeniería Química. Facultad de Ingeniería - UdelaR, 2. Laboratorio de Biocatálisis y Biotransformaciones, Departamento de Biociencias, Departamento de Química Orgánica. Facultad de Química - UdelaR

Las xilanasas son enzimas de gran interés en los procesos industriales ya que se emplean como agentes de blanqueamiento en las industrias de pulpa y papel, hidrolizan el xilano permitiendo obtener productos de alto valor comercial como azúcares de bajo aporte calórico y prebióticos en la industria alimenticia, y aumentan la efectividad de los detergentes, entre otros. En los últimos años, el creciente interés por estas enzimas radica en que participan en procesos de sacarificación de la biomasa lignocelulósica al hidrolizar la hemicelulosa, un heteropolímero ramificado de composición variable, cuya cadena principal está compuesta por xilano. Las xilanasas actúan en sinergia para hidrolizar los xilanos debido a su heterogeneidad y complejidad, estas enzimas incluyen a las: endoxilanasas, exoxilanasas y β -xilosidasas. La mayoría de las xilanasas comerciales tienen su mayor actividad a temperaturas altas. En este trabajo se estudiaron 39 microorganismos antárticos, incluyendo bacterias y levaduras, recolectados en distintos puntos de la Isla Rey Jorge. Estos microorganismos, psicrófilos y psicrotolerantes, tienen procesos metabólicos y fisiológicos que les permite crecer a bajas temperaturas, entre ellas la producción de enzimas y pigmentos, que les confiere cierta ventaja adaptativa frente a sus homólogos mesófilos y termófilos si se busca aplicaciones a escala industrial, ya que se reduce el gasto energético y, por lo tanto, el costo de producción. Para seleccionar las cepas productoras de enzimas extracelulares con actividad xilanolítica, se realizó un screening cualitativo de la actividad enzimática, mediante la presencia de halos de degradación alrededor de las colonias formados en medio sólido. Se seleccionaron 4 microorganismos (3 bacterias y una levadura) con mayor actividad xilanolítica. Éstas se crecieron en medio líquido conteniendo xilano como única fuente de carbono en condiciones aerobias a 20°C, con agitación orbital a 150 rpm, durante 144 h. Se hizo seguimiento del cultivo cada 24 h, determinando la concentración de biomasa y la actividad enzimática. Los productos de hidrólisis se detectaron por reacción de los azúcares reductores con ácido dinitrosalicílico (DNS) y por HPLC. La levadura fue el microorganismo que presentó mayor actividad (3.9 ± 0.3 UI/mL) en las condiciones estudiadas.

PUESTA A PUNTO DE LA PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE PARTÍCULAS SIMILARES A VIRUS DEL CIRCOVIRUS PORCINO TIPO 2 COMO PROTOTIPO VACUNAL

F, Fadel¹. N, Olivero-Deibe³. C, Ortega²

1. Universidad ORT, Montevideo, Uruguay 2. Programa de Tecnología Molecular, Celular y Animal (ProTeMCA), Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay 3. Laboratorio de Inmunovirología, Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay

Antecedentes: El Circovirus Porcino tipo 2 (PCV2) es un patógeno que afecta a la población porcina, ocasionando signos clínicos tales como diarrea, abortos, dyspnea, que se conocen en su conjunto como el Síndrome de Desmedro Multisistémico Post-Destete (PMWS). La infección por PCV2 ha generado pérdidas económicas significativas en la industria a nivel mundial. La alta tasa de mutación que presenta este virus contribuye a la aparición de nuevos genotipos y a variaciones en su prevalencia a lo largo del tiempo, lo que hace que las vacunas actualmente disponibles no estén actualizadas desde el punto de vista antigénico.

Las Partículas Similares al Virus (VLPs), imitan la estructura de los virus pero carecen de material genético, por lo que no pueden infectar a las células huésped. A su vez, se ha demostrado que son capaces de activar tanto el sistema inmune a nivel humoral y celular. Estas características las vuelven una alternativa atractiva y biosegura para su uso como plataforma de vacunal.

Estrategia experimental: La producción de VLPs de PCV2 se realizó mediante la transfección transitoria de la línea celular de mamífero Expi293F, utilizando el método de polietilimina (PEI). Se optimizó el proceso mediante evaluación del rendimiento incluyendo, tiempos de transfección, concentración de ADN utilizada y puesta a punto de diferentes métodos de purificación. Mediante estudios bioquímicos y biofísicos se realizó la caracterización de la proteína de la Cápside (Cap) de PCV2 y de las VLPs purificadas. También se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta y una evaluación mediante ELISA de la antigenicidad de sueros porcinos infectados.

Resultados: Se logró optimizar la producción de VLPs a escala laboratorio, poniendo a punto distintas condiciones de transfección para la obtención de un mayor rendimiento de VLPs. Se evaluaron parámetros de viabilidad celular y consumo de glucosa para una mejora en los cultivos de producción. Además se evaluaron dos métodos diferentes de purificación, por gradiente discontinuo de CsCl y cromatografía de intercambio iónico. En conjunto, todos estos resultados preliminares podrían ayudar a una mejora en la cadena del bioproceso para una futura aplicación de VLPs de PCV2 como prototipo vacunal.

PRODUCCIÓN DE QUIMOSINA BOVINA RECOMBINANTE EN ASPERGILLUS NIDULANS

A, Benítez Rey¹. JJ, Marizcurrena¹. M, Sanguinetti¹

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

La quimosina bovina (EC 3.4.23.4) es una aspartil proteasa de 323 aminoácidos (aa) que es secretada en el cuarto estomago de rumiantes recién nacidos. Es utilizada en la industria láctea para la producción de quesos, específicamente para el cuajado de la leche a través de la hidrólisis de la caseína. Se han utilizado diferentes sistemas (procariotas y eucariotas) para la expresión recombinante de esta enzima con alto valor comercial. El grupo en dónde se desarrolla este proyecto busca contribuir a la mejora de la expresión de quimosina recombinante a través de la optimización de su expresión en el organismo modelo eucariota *A. nidulans*. Éste es un hongo filamentoso multicelular que posee un ciclo de vida corto y una rápida tasa de crecimiento, lo que permite obtener grandes cantidades de biomasa, a su vez los requerimientos nutricionales son mínimos y simples. Su genoma se encuentra secuenciado, y es relativamente fácil de manipular, lo que facilita la introducción de modificaciones genéticas.

Para expresar la pro-quimosina en *A. nidulans* se generaron dos construcciones, una que permite la expresión constitutiva, y otra que permite una expresión inducible de la misma. La expresión constitutiva, se realizó mediante el uso del promotor del gen *gpdA* (el cual codifica para la enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa en *A. nidulans*). Para la expresión inducible se utilizó el promotor del gen *alcA* (el cual codifica para la alcohol deshidrogenasa en *A. nidulans*). La expresión a través de este promotor es inducible mediante la adición de etanol/metiletilcetona al medio de cultivo. Para lograr que la proteína se secrete al medio extracelular, ésta se fusionó a una versión trunca de la glucoamilasa de *Aspergillus niger* (proteína secretada, codificada por el gen *ANglaA1-514*, que se utiliza como proteína carrier). A diferencia de intentos anteriores de expresión en *A. nidulans*, la secuencia que codifica para la proquimosina fue optimizada para su expresión en este organismo. También se adicionó una cola de 6 histidinas para su posterior detección por Western blot.

Las construcciones se generaron mediante fusion-PCR, y se clonaron en un plásmido comercial para su secuenciación. Posteriormente se subclonaron en un plásmido que porta el marcador auxotrófico *argB* y se transformaron en una cepa de *A. nidulans* portadora de la mutación *argB2* (la cual genera auxotrofia por la arginina). De forma de verificar la expresión de la quimosina en los transformantes obtenidos, se realizará un Western blot con anticuerpo anti-His.

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD TIPO TROMBINA DE LOS VENENOS DE LOS OFIDIOS BOTHROPS ALTERNATUS Y BOTHROPS PUBESCENS

M, Cúparo^{1,2}. V, Morais¹

1. Laboratorio de Desarrollo Biotecnológico, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, UdelaR, 2. Laboratorio de Herpetología, Facultad de Ciencias, UdelaR

Bothrops alternatus y *Bothrops pubescens* conocidas comúnmente como Crucera y Yará respectivamente, son dos ofidios de importancia médica en Uruguay. Prácticamente la totalidad de los accidentes ofídicos se deben a estas dos especies. Sus venenos se caracterizan por causar graves alteraciones de la hemostasis debido a la acción de varios componentes. Entre ellos, se encuentran las enzimas tipo trombina así como enzimas activadoras de trombina y de otros factores de coagulación. Tradicionalmente, esta actividad se medía mediante ensayos de coagulación sanguínea, sin embargo, estos ensayos no son específicos en determinar la actividad de este tipo de componentes. En este trabajo se desarrolló y realizó la puesta a punto de un ensayo que permite medir la actividad tipo trombina. Se utilizó como reactivo un péptido conteniendo la secuencia de corte de la trombina, unido a un cromóforo (4-nitroanilina) que es liberado al producirse el clivaje (Chromozym TH; Roche). Al liberarse el cromóforo, se obtiene una coloración que puede ser cuantificada mediante cambios en la absorbancia midiendo a 405 nm, rango de absorción de la 4-nitroanilina. Este reactivo, es empleado comúnmente como sustrato de trombina y no se encontraba previamente caracterizado su uso y funcionamiento con componentes que mimetizan su acción, como aquellos presentes en los venenos. Se incubaron en placas muestras de venenos de ambas especies en buffer fosfato salino con reactivo y en diferentes condiciones; únicamente veneno o plasma normal de oveja y veneno, posteriormente se tomaron las correspondientes medidas de absorbancia, cada diez minutos hasta la saturación. Se corroboró la presencia de actividad de tipo trombina en los venenos de ambas especies de *Bothrops* con este método. De acuerdo a este ensayo, la actividad específica de ambos venenos es comparable, no detectándose diferencias significativas entre las especies. Al agregar plasma sanguíneo al ensayo, la actividad aumenta debido a la activación también de la trombina del plasma. A su vez, la actividad se incrementó al realizar el ensayo a una temperatura de 37 °C. Se pudo determinar por otro lado, la capacidad de neutralización del suero antiofídico específico (BIOL, Argentina) de este tipo de componentes. Se realizó la preincubación de los venenos con el suero antiofídico antes de realizar el ensayo, resultando en la pérdida de la actividad. Este resultado indica también que este ensayo puede ser empleado para el estudio de inhibidores de la actividad tipo trombina del veneno, ya sean anticuerpos neutralizantes o compuestos inhibidores naturales.

EDICIÓN DE GENOMAS

PUESTA A PUNTO DE UN MÉTODO DE EDICIÓN GÉNICA EN EL RIZOBIO NATIVO CUPRIAVIDUS SP. UYMMA02A

I, Eastman¹. V, Ferreira¹. L, Sandes¹. C, Rodríguez¹. F, Battistoni¹. R, Platero¹

1. Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Ministerio de Educación y Cultura

La edición genética ha revolucionado la microbiología y la ciencia en general, al proporcionar diferentes herramientas versátiles para la modificación de genomas. Esto no solo impulsa la investigación básica, sino que también tiene un impacto directo en aplicaciones prácticas en biotecnología, medicina y conservación ambiental. La continua evolución de las técnicas de edición genética promete seguir impulsando la microbiología y la ciencia en el futuro, abriendo nuevas oportunidades de investigación y aplicaciones en diversas áreas del conocimiento.

A pesar de los avances realizados para la edición génica en bacterias modelo como *E. coli* o *B. subtilis*, existen escasas herramientas adaptadas para el estudio de otras bacterias de interés. Por lo tanto, es crucial el desarrollo de herramientas adecuadas para otros modelos bacterianos con la finalidad de para ampliar nuestro conocimiento y aprovechar todo el potencial de la edición genética en la microbiología.

En este contexto, el objetivo de nuestro trabajo fue el desarrollado y la puesta a punto de una técnica de edición genómica para la delección de genes en la cepa ambiental *Cupriavidus sp. UYMMA02A*, una cepa de rizobio nativo aislado de nódulos de *Mimosa magentea* en Uruguay.

Para lograr nuestro objetivo partimos del protocolo reportado por Martínez-García y colaboradores, el cual se basa en la actividad de la meganucleasa I-SceI (Martínez-García, E & de Lorenzo, 2012). El método consiste en eliminar íntegramente el marco de lectura abierto correspondiente al gen de interés, haciendo uso de los mecanismos de recombinación homóloga de la bacteria, la actividad de la nucleasa I-SceI y la posterior reparación del ADN. Mediante esta metodología es posible generar delecciones en el ADN sin dejar secuencias foráneas o marcas en el mismo.

El primer paso fue la optimización de la concentración de inductor necesaria para inducir la expresión de la nucleasa. Para esto construimos un vector reportero en el cual fusionamos el promotor pm (promotor meta) al gen de la *gfp* y evaluamos la cinética de la inducción. En segundo lugar, optimizamos el tiempo de inducción necesario para que ocurra la resolución de los co-integrados.

Aplicando el método optimizado logramos obtener mutaciones en el genoma de nuestra bacteria modelo. Sin embargo no se alcanzaron los niveles de eficiencia reportados para otras bacterias ambientales. De todas maneras, podemos concluir que, a pesar de los desafíos y limitaciones, la técnica pudo adaptarse de manera efectiva para realizar las modificaciones genéticas deseadas en nuestra bacteria de interés.

ANÁLISIS DEL ROL DE LAS DIFERENTES SUBFAMILIAS DE AMASTINAS DE TRYPANOSOMA CRUZI EN EL PROCESO DE INFECCIÓN

MA, Goyeche¹. L, Pérez Díaz¹

1. Sección 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. 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.

El objetivo del trabajo es analizar el rol de las diferentes subfamilias de amastinas en la infección y persistencia. Mediante edición genómica se generará 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 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.

Se estudiará rol de las amastinas en la infección y persistencia de la misma usando los parásitos knock out obtenidos cuantificando número de células infectadas, amastigotas intracelulares y tripomastigotas celulares emergentes a distintos tiempos.

FSTL1A PROMUEVE LA DIFERENCIACIÓN DE ADIPOCITOS EN EL TEJIDO ADIPOSO DE PEZ CEBRA.

L, Guggeri¹. I, Sosa¹. M, Cárdenas-Rodríguez¹. V, Prieto-Echagüe¹. P, Lepanto^{*1}. JL, Badano^{*1}

1. Laboratorio de Genética Molecular Humana, Institut Pasteur de Montevideo

Fstl1 es una glicoproteína secretada que se ha relacionado con la diferenciación de adipocitos, miocitos y en el desarrollo de inflamación. Resultados previos de nuestro laboratorio indican que existe un eje BBS4-Fstl1-cilia que participa en la regulación de la diferenciación de adipocitos in vitro. Fstl1 es un gen esencial en mamíferos por lo que proponemos el uso de pez cebra para evidenciar la relevancia in vivo de esta vía. Nuestros resultados previos indican que fstl1a en mayor medida que fstl1b regula la formación de la cilia primaria. Por lo tanto, generamos una línea de peces con una mutación puntual en Fstl1a por medio de Crispr-Cas9. En larvas de esta línea, que mostraron una reducción del 80% del nivel de ARNm de fstl1a, evaluamos la capacidad de desarrollar tejido adiposo tanto en dieta normal como en dieta rica en grasas. Encontramos que las larvas fstl1a KO desarrollaron menos tejido adiposo que las larvas salvajes tanto en dieta estándar como en dieta rica en grasas. El análisis de diferentes marcadores moleculares sugiere que el proceso afectado se trata de la diferenciación de nuevos adipocitos. Finalmente, la observación del proceso de diferenciación de células individuales in vivo, indica que el inicio de la acumulación de lípidos es rápido tanto en larvas Fstl1a KO como en controles, por lo que sugerimos que el punto de control es al inicio del proceso de diferenciación. Estos datos sugieren que Fstl1a regula positivamente el desarrollo del tejido adiposo favoreciendo la diferenciación de adipocitos en estadios iniciales.