

ACTAS DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

VOLUMEN 2

2^{AS} JORNADAS DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular (SBBM)

Instituto Clemente Estable, Montevideo, 28 de noviembre de 2003

Editor Responsable: Dr. Daniel Rodríguez-Ithurralde

Modelo de la Trans-sialidasa, gentileza del Dr. Pedro Alzari

2^{as} JORNADAS DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Instituto Clemente Estable, Montevideo, 28 de noviembre de 2003

Comité Organizador

Daniel Rodríguez-Ithurralde

Juan Claudio Benech

Carmen Manta

Omar Borsani

Leda Roche

Adriana Maruri

Miriam Barros

Elena Fabiano

Beatriz Garat

Ricardo Ehrlich

Se agradece especialmente el patrocinio a las Jornadas de:

CSIC/Universidad de la República - AMSUD/Pasteur - Pan American Association of
Biochemistry and Molecular Biology (PABMB)

Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular (SBBM)

Seccional de la Sociedad Uruguaya de Biociencias (SUB)

Member Society of the Pan-American Association for Biochemistry and Molecular Biology
(PABMB)

Adhering Body of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB)

COMISIÓN DIRECTIVA

Presidente

Ricardo Ehrlich

Vice-Presidente

Juan Claudio Benech

Secretario

Daniel Rodríguez-Ithurralde

Tesorera

Leda Roche

Vocales

Carmen Manta

Omar Borsani

AUSPICIAN

Instituto Clemente Estable (IIBCE)

Facultad de Ciencias

Facultad de Medicina

Facultad de Química

Facultad de Agronomía

Facultad de Veterinaria

PEDECIBA Química

International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB)



SIMPOSIOS

Simposio 1

Dos historias enlazadas: Lisette Gorfinkiel y las permeasas de purinas de *Aspergillus*

Moderadores: Ricardo Ehrlich y Patricia Esperón

Ricardo Ehrlich - Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias (FC)
"Palabras introductorias"

Patricia Esperón - Biología Molecular, Facultad de Química (FQ)
"Lectura de un mensaje de Claudio Scazzocchio"

Gianna Cecchetto - Microbiología, Unidad Asociada, FC:
"Las permeasas de purinas en *Aspergillus nidulans*. Análisis comparativo"

Laura Harispe - Sección Bioquímica, FC:
"Regulación post-transcripcional del transportador de purinas UapC en *Aspergillus nidulans*"

Ana Ramón - Sección Bioquímica, FC:
"*Aspergillus nidulans*, el transporte de la urea y la expresión de permeasas heterólogas"

LAS PERMEASAS DE PURINAS EN *Aspergillus nidulans*. ANÁLISIS COMPARATIVO.

Cecchetto, G.^{1,4}, Diallinas, Y.², Gorfinkiel, L.³, Scazzocchio, C.⁴, Drevet, C.⁴.

¹ Microbiología, Unidad Asociada Facultad de Ciencias, UdelaR. ² Department of Botany, University of Athens.
³ Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, UdelaR. ⁴ Institut de Génétique et de Microbiologie, Université Paris-Sud (XI).

Aspergillus nidulans, es un hongo filamentoso (Ascomycota) capaz de utilizar las purinas como fuente de nitrógeno. Por lo menos tres permeasas intervienen en el transporte de purinas hacia el interior de la célula. La proteína AzgA es el principal transportador de hipoxantina, adenina y guanina y UapA de ácido úrico y xantina. UapC es una permeasa de amplia especificidad, capaz de transportar todas las purinas naturales si bien su capacidad de transporte es significativamente inferior a las de las anteriores. La alta similitud entre UapA y UapC (62% de identidad) permitió mediante la construcción de proteínas quiméricas identificar un dominio determinante de la capacidad de transporte y la especificidad por el sustrato. AzgA no presenta similitud significativa con ninguna proteína de membrana caracterizada pero varias secuencias homólogas de función desconocida están presentes en hongos, plantas y procariontes. El análisis filogenético indica que AzgA y sus homólogos están en un *cluster* claramente separado de la familia NAT (*Nucleobases-ascorbate transporter family*) a la que pertenecen UapA y UapC. En el micelio, *azgA*, *uapA* y *uapC*, como otros genes del catabolismo de purinas, son inducidos por ácido úrico a través del activador UaY y reprimidos en presencia de amonio debido a la inactivación del factor AreA. La inducción por ácido úrico también se observa durante la germinación de las conidiosporas mientras que la represión por amonio parece ser un mecanismo que no actúa en las primeras etapas de la germinación. Finalmente, los resultados obtenidos permiten postular que en las etapas tempranas de la germinación actúa un mecanismo de inducción en respuesta a la carencia de nitrógeno que es independiente del activador UaY.

REGULACIÓN POST-TRANSCRIPCIONAL DE LA PERMEASA DE PURINAS Uap-C EN *Aspergillus nidulans*

Harispe, L., Portela, C., Valdez, J., Rosa, A., Scazzocchio, C. y Gorfinkiel, L.

Sección Bioquímica. Departamento de Biología Celular y Molecular. Facultad de Ciencias

Aspergillus nidulans puede utilizar las purinas naturales como fuente de nitrógeno. El gen *uapC* codifica el transportador general de purinas, UapC. En presencia de amonio en el medio, la transcripción de este gen - mediada por el factor de transcripción de acción positiva AreA - se halla reprimida. Utilizando una fusión génica entre *uapC* y el gen que codifica la Proteína Fluorescente Verde (GFP), se mostró que el amonio provoca cambios dramáticos en la distribución subcelular de la permeasa UapC. En presencia de este compuesto, la permeasa UapC-GFP desaparece de la membrana plasmática y se concentra en estructuras identificadas como vacuolas. Los experimentos aquí realizados permiten postular la existencia de un nuevo mecanismo de control por el cual el amonio regula negativamente la vida media de este transportador. También se caracterizó fenotípica y genéticamente la cepa *apf1*, aislada como un mutante capaz de revertir la criosensibilidad natural del transporte de ácido úrico mediado por la permeasa UapC. Mediante complementación de función se clona el gen identificado en este mutante. El secuenciado de este gen reveló que codifica una proteína Gap, reguladora negativa de la actividad de las proteínas de la familia Ras. Los experimentos realizados permiten proponer que la activación constitutiva de la(s) proteína(s) Ras de *A. nidulans* provoca efectos pleiotrópicos, entre ellos, el aumento en la membrana plasmática del nivel de varios transportadores de este organismo.

***Aspergillus nidulans*, EL TRANSPORTE DE LA UREA Y LA EXPRESIÓN DE PERMEASAS HETERÓLOGAS.**

Abreu, C.* , Bertone, A.[?] , Ramón, A.* , Vidal, S.[?] y Gorfinkiel, L.*

*Sección Bioquímica y [?] Unidad de Biología Molecular Vegetal, Depto. de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias - Iguá 4225, Montevideo, Uruguay

El hongo filamentoso *Aspergillus nidulans* puede ser utilizado como sistema modelo para la expresión heteróloga de transportadores de otros organismos, que pueden entonces ser caracterizados funcionalmente de manera fácil. Es poco lo que se sabe sobre cómo las plantas absorben la urea y cómo ésta se transporta en el interior de las mismas. En un intento por dilucidar estos mecanismos en el arroz, diseñamos una estrategia que involucra la expresión heteróloga de un transportador de urea de arroz (OsDUR3) en un mutante de *A. nidulans* deficiente en el permeasa específica de esta sustancia (UreA). El gen *OsDUR3* fue clonado por PCR utilizando cebadores específicos y ADN genómico como molde. Estamos estudiando la expresión del gen en diferentes condiciones de crecimiento (tiempos y fuentes de nitrógeno) y en los distintos tejidos de la planta, mediante ensayos de Northern blot y por seguimiento de la localización de una proteína de fusión entre OsDUR3 y la GFP. Una vez identificadas las condiciones de expresión, se clonará el ADNc y se expresará en *A. nidulans*, para su caracterización bioquímica. En este contexto, hemos considerado de interés clonar el gen *ureA*, que codifica el transportador de la urea en *A. nidulans*, y caracterizar funcionalmente la proteína que éste codifica. *ureA* ya ha sido clonado y en este momento estamos comenzando el estudio de la expresión del mismo. Resultados preliminares sugieren que este gen está sujeto al control por AreA, el mediador de la represión catabólica por nitrógeno en *A. nidulans*.

Simposio 2

Biología Vegetal y Ambiental

Moderadores: Sabina Vidal y Luis Acerenza

Laura Saavedra - Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, FC:

"Generación y caracterización del mutante *dhnA* por genética reversa en *Physcomitrella patens*"

Inés Ponce de León – Departamento de Biología Molecular, Instituto Clemente Estable (IIBCE):

"Participación de las enzimas α -dioxigenasas en la respuesta de defensa vegetal"

Marco Dalla Rizza - Unidad de Biotecnología y Departamento de Leguminosas Forrajeras, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA):

"Determinación molecular del sistema reproductivo en *Lotononis bainesii* y repercusión taxonómica"

Leonidas Carrasco - Centro de Formación e Investigación en Ciencias Ambientales EULA-CHILE, Universidad de Concepción, Chile.

"Evaluación de los cambios estructurales y funcionales de ecosistemas microbianos edáficos provocados por la forestación de praderas uruguayas"

"GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL MUTANTE *DHNA* POR GENÉTICA REVERSA EN *PHYSCOMITRELLA PATENS*"

Saavedra, L.

Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, Facultad de Ciencias

Las dehidrinas (DHNs) son una familia de proteínas ampliamente distribuidas en el reino vegetal que se acumulan durante los estados tardíos de la embriogénesis en semillas, en respuesta a la aplicación de la hormona ácido abscísico (ABA), o cualquier factor ambiental que conduzca a la deshidratación celular como la sequía, salinidad o bajas temperaturas. Se ha propuesto que estas proteínas cumplen un rol fisiológico en la tolerancia a la deshidratación celular. Sin embargo, no existen evidencias claras que demuestren su función. Recientemente se aisló en la briofita *Physcomitrella patens* un gen que codifica para una dehidrina, denominado *PpDHNA*. *PpDHNA* codifica para una proteína de 59.2 kDa y los análisis primarios de esta proteína revelaron muchas características típicas de las DHNs de plantas superiores. *PpDHNA* es rica en glicina, carece de los aminoácidos (aa) cisteína y triptófano, contiene un elevado número de aa cargados (24%) y dos de los segmentos de aa conservados de las DHNs: los segmentos Y y K. En el presente trabajo se ha realizado el estudio y caracterización de la proteína *PpDHNA* en condiciones de estrés. Análisis de western blot revelaron que *PpDHNA* se acumula por ABA y en condiciones de estrés osmótico. Con la intención de dilucidar el rol fisiológico de las DHNs y utilizando la habilidad para interrumpir genes en *P. patens* debido a la alta frecuencia de recombinación homóloga que presenta esta briofita, se ha obtenido un mutante por knockout para el gen *PpDHNA*. Tratamientos de estrés osmótico con altas concentraciones de NaCl (0.5 M) y manitol (0.8 M y 0.9 M) revelaron un claro fenotipo en el mutante *dhnA*. Este fenotipo se manifiesta a través de una capacidad de recuperación más lenta o nula luego de haber sido sometido a condiciones de estrés osmótico. El mutante *dhnA* constituye la primera evidencia directa del rol fisiológico de las DHNs en plantas como proteínas involucradas en la protección celular durante el estrés que permite la sobrevivencia de la planta al retomar condiciones óptimas de crecimiento.

PARTICIPACIÓN DE LAS ENZIMAS ω -DIOXIGENASAS EN LA RESPUESTA DE DEFENSA VEGETAL

Ponce de León, I.¹, Sanz, A.², Hamberg, M.³ y Castresana, C.².

¹ Departamento de Biología Molecular, IIBCE, Montevideo, Uruguay. ² Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid, España. ³ Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Karolinska Institutet, Estocolmo, Suecia.

Las ω -Dioxigenasas (ω -DOXs) catalizan la conversión del ácido linolénico, y otros ácidos grasos, en su derivado 2(R)-hidroperóxido que posteriormente se modifica de forma no enzimática dando lugar a la formación de tres tipos de compuestos: un derivado aldehídico Cn-1, un ω -hidroxi-ácido y un ácido graso Cn-1. La participación de las proteínas ω -DOXs en la respuesta de defensa vegetal se concluye a partir de los resultados que hemos obtenido en plantas de *Arabidopsis*, en los que se observa que la expresión del gen ω -DOX1, y la actividad enzimática correspondiente, se producen de forma más rápida y alcanzan niveles mayores, en interacciones planta-patógeno incompatibles, en las que se activa una reacción HR de defensa vegetal. Los estudios realizados con objeto de identificar la función de las proteínas ω -DOX1 en la defensa vegetal, nos permiten concluir que su inducción esta asociada a la activación de un proceso de muerte celular y que su función es la de proteger a los tejidos vegetales del daño asociado al estrés oxidativo que ocurre en dicho proceso. Recientemente identificamos un segundo gen ω -dioxigenasa (ω -DOX2) en *Arabidopsis* el cual podría codificar para una proteína involucrada en el desarrollo vegetal.

DETERMINACIÓN MOLECULAR DEL SISTEMA REPRODUCTIVO EN *LOTONONIS BAINESII* Y REPERCUSIÓN TAXONÓMICA

Dalla Rizza M.¹; Real D.¹ y Quesenberry K.H.²

¹Unidad de Biotecnología y Departamento de Leguminosas forrajeras, INIA ²Dep. of Agronomy, Univ. of Florida, Gainesville, FL 32611-0500, USA

La región de basalto comprende el 21% del territorio de Uruguay caracterizándose por poseer suelos profundos y superficiales. El Programa de leguminosas forrajeras de INIA Tacuarembó tiene como objetivo principal el mejoramiento de leguminosas para incorporar en campos con baja productividad en áreas ganaderas del país e incorporar campos marginales (20% del territorio) no mejorados aún. *Lotononis bainesii* Bak. (*L. bainesii*) es una leguminosa forrajera identificada en el Programa para ser integrada en las pasturas nativas. Es originaria de Sudáfrica y su descubrimiento como planta forrajera es relativamente reciente (1952), subtropical y de muy buen crecimiento en verano-otoño. En 1964, en la revista Nature, Byth reportó a esta especie como cleistógama (la polinización ocurre con la flor cerrada), resultando por lo tanto autógama. En los trabajos de mejoramiento genético realizados en nuestro país con más de 500 cruzamientos efectuados, se relevaron evidencias que apoyaban la observación de que es una especie chasmógama. Mediante el desarrollo y empleo de marcadores codominantes (SCAR y CAPS) se identificaron individuos que presentaron alelos homocigotos en la población de análisis, los cuales fueron empleados como plantas 'tester'. Del análisis de la progenie de estas plantas 'tester' en condiciones de campo, fue posible identificar polen proveniente de otras plantas y de esta forma concluir que *L. bainesii* es altamente alógama y por tanto para la producción de semillas es necesario la presencia de polinizadores.

Financiamiento INIA-BIDII Proyecto N° 3 y Conicyt, Fondo Clemente Estable N° 8151.

Real D., Dalla Rizza M., Quesenberry K.H. and Echenique M. (2003) Reproductive and molecular evidence for allogamy in *Lotononis bainesii* Baker. Crop Sci. (in press).

EVALUACIÓN DE LOS CAMBIOS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE ECOSISTEMAS MICROBIANOS EDÁFICOS PROVOCADOS POR LA FORESTACIÓN DE PRADERAS URUGUAYAS.

Carrasco, L.

Centro de Formación e Investigación en Ciencias Ambientales EULA-CHILE, Universidad de Concepción, Chile.

El Plan Forestal uruguayo, iniciado en 1988, declaró un 20 % de su territorio nacional como suelos de prioridad forestal. El estudio de los cambios provocados por la forestación de praderas uruguayas se plantea como un estudio ambiental relevante por: su extensión, dado que las praderas naturales en Uruguay ocupan un 87% del territorio; la inexistencia de información científica, nacional e internacional, que permita gestionar los impactos ambientales provocados por esta actividad económica; y porque la forestación en Uruguay se ha planteado como una actividad secuestradora de carbono atmosférico, en el marco del Protocolo de Kyoto. Este trabajo realizó un análisis de los cambios ocurridos en los suelos bajo plantaciones de *Eucalyptus sp.* con más de 20 años y bajo praderas naturales uruguayas, para estimar los impactos ambientales potenciales de la forestación en el largo plazo. Para esto se estudiaron los cambios de las propiedades del suelo (físico-químicas; bioquímicas y estructurales de las comunidades microbianas edáficas). Los resultados muestran que los suelos forestados presentan una pérdida en el secuestro de carbono de 16,6 ton C/ha.; una acidificación; descenso de su capacidad de retención de agua; cambios en la función y estructura de las comunidades microbianas edáficas, donde se ha incrementado la representación de hongos. Además, los mecanismos oxidativos del ecosistema microbiano edáfico bajo plantación forestal han elevado su capacidad y afinidad, lo cual explicaría el descenso en el secuestro de carbono y el incremento de la alifaticidad de las sustancias húmicas y un proceso de podzolización.

Simposio 3

Bases moleculares de la lesión celular

Moderadores: Mónica Marín y Daniel Rodríguez-Ithurralde

Deborah Keszenman - Laboratorio de Radiobiología, Departamento de Biofísica, Facultad de Medicina (FM):

"Reparación de daño oxidativo del ADN y su modulación por choque térmico"

Rossana Sapiro - Departamento de Histología y Embriología, FM:

"Papel de Spag6 en el control de la motilidad espermática de ratón. De la esterilidad a la hidrocefalia"

Leticia Britos – Sección Bioquímica, FC:

"La familia génica CRISP en parásitos cestodos: su caracterización en *Mesocestoides corti*"

Florencia Irigoín - Cátedra de Inmunología, FQ/FC/Instituto de Higiene:

"La interfase *Echinococcus granulosus*-hospedador: De la química a la ultraestructura"

Wilner Martínez - Dpto. de Genética Toxicológica y Mutagénesis Experimental, IIBCE:

"Efectos de la decondensación de la cromatina en respuesta al daño inducido por UV-C en una línea celular de Hamster chino homóloga del Síndrome de Cockayne"

REPARACIÓN DE DAÑO OXIDATIVO DEL ADN Y SU MODULACIÓN POR CHOQUE TÉRMICO.

Keszenman, D.

Laboratorio de Radiobiología. Dpto. Biofísica. Facultad de Medicina. UDELAR. Montevideo. Uruguay.

La preservación de la información genética depende de la capacidad de las células para reconocer los cambios del entorno e intracelulares (estrés) y responder adecuadamente. Se ha demostrado la interrelación entre las respuestas celulares a distintos tipos de estrés (térmico, oxidativo, osmótico y la privación de nutrientes), siendo los mecanismos subyacentes objeto de estudio. Se investigó a nivel celular y molecular la modulación por choque térmico (HS) de los efectos inducidos por el agente radiomimético oxidativo Bleomicina (BLM). Células haploides de *Saccharomyces cerevisiae* en fase exponencial fueron expuestas a BLM (BLM: 0-15µg/ml, 30°C, 1.5h) sin y con tratamiento previo de HS (38°C, 1h). Las muestras se analizaron inmediatamente después de los tratamientos y luego de incubación en medio nutriente líquido sin BLM. A nivel celular se estimaron las probabilidades de supervivencia y mutagénesis. A nivel molecular se determinaron las roturas dobles del ADN (DSBs) y su reparación utilizando electroforesis por campos pulsados y análisis por densitometría láser. Los resultados demostraron que el HS induce tolerancia a los efectos letales y mutagénicos de la BLM y a nivel molecular induce reparación significativamente mayor de las DSBs. Utilizando mutantes *rad6* (vía de reparación postreplicativa) se observó importante letalidad y escasa reparación de DSBs por BLM con o sin HS previo. Estos hechos indican la implicancia del gen *RAD6* y sugieren la participación de la reparación recombinacional en el mecanismo de tolerancia a la BLM inducida por HS. En base a estos resultados, se propone que la tolerancia a la BLM inducida por HS depende de una red regulatoria que actúa después de producido el daño en el ADN, la que incluye genes involucrados en la reparación del ADN, en la respuesta de HS y en el metabolismo del ADN.

"PAPEL DE SPAG6 EN EL CONTROL DE LA MOTILIDAD ESPERMÁTICA DE RATÓN. DE LA ESTERILIDAD A LA HIDROCEFALIA"

Sapiro, R.

Center for Research on Reproduction and Women's Health University of Pennsylvania Medical Center

Para lograr la fertilización *in vivo*, los espermatozoides deben poseer una fuerza de propulsión lo suficientemente poderosa que los conduzca a los ovocitos. El flagelo espermático es responsable de la motilidad del gameto. Los componentes de cilias y flagelos se hallan notablemente conservados en las diferentes especies, incluyendo nueve dobletes de microtúbulos y proyecciones radiales que rodean un par de microtúbulos centrales denominado aparato central. Las proteínas que constituyen el aparato central podrían jugar papel clave en el control de la función flagelar. Nosotros hemos clonado y caracterizado una proteína del aparato central denominada Spag6 (Sperm Associated Antigen 6). Spag6 es el homólogo en ratones de PF16 de *Chlamydomonas*, un alga utilizada como modelo de movimiento y estructura flagelar. Spag6 se expresa selectivamente en la cola de los espermatozoides. Utilizando técnicas de delección dirigida, hemos eliminado el gen *Spag6* comprobando que los machos que carecen de Spag6 son estériles debido a alteraciones en la estructura y motilidad de los espermatozoides. Un porcentaje de los ratones *Spag6*^{-/-} son de menor tamaño que sus pares salvajes y mueren prematuramente. En los ratones *Spag6*^{-/-} existe hidrocefalia, posiblemente debido a fallas en la circulación del líquido cefalorraquídeo como consecuencia de alteraciones del movimiento ciliar de las células ependimarias. Postulamos que Spag6 actúa como andamiaje molecular mediante la interacción con otras proteínas y esto conduce a la estabilidad del flagelo necesaria para el movimiento. Estos conocimientos podrían conducir a la identificación de más genes involucrados en la espermatogénesis y/o funcionalidad espermática.

LA FAMILIA GÉNICA CRISP EN PARÁSITOS CESTODOS: SU CARACTERIZACIÓN EN *MESOCESTOIDES CORTI*

Britos, L.

Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, Montevideo.

Con el objetivo de caracterizar en términos moleculares los procesos vinculados al desarrollo y la relación hospedero-parásito en cestodos, se emprendió el estudio de una familia de genes codificantes para proteínas secretadas ricas en cisteína (CRISP), ampliamente distribuidas en la escala filogenética y que constituyen el principal producto de excreción-secreción (ES), activamente liberado por parásitos nemátodos en el momento de la infección. El análisis que se presenta se centra en uno de los cuatro genes de la familia CRISP en el ciclofilideo *Mesocestoides corti* – denominado *Mc Crisp2*. Mediante RT-PCR y PCR en tiempo real, se ha determinado una mayor expresión en los gusanos segmentados –obtenidos del cultivo *in vitro*- respecto a las larvas (tetratiridios). Los territorios de expresión se analizaron mediante *hibridación in situ -in toto* y sobre cortes. La expresión de *Mc Crisp2* en el estadio larvario se circunscribe a una región apical central delimitada por las ventosas. En los gusanos segmentados, el mensajero correspondiente se ubica en el límite más apical del escólex. Esta localización sugiere un posible rol del producto de este gen en la interacción con el hospedero. Cabe anotar que solo se registra señal en una parte de la población, tanto en larvas como en gusanos segmentados. Empleando sueros reactivos contra proteínas CRISPs heterólogas en ensayos de Western-blot, se detecta en extractos proteicos de tetratiridios, una proteína mayoritaria de 47 kDa.

LA INTERFASE *ECHINOCOCCUS GRANULOSUS*-HOSPEDADOR: DE LA QUÍMICA A LA ULTRAESTRUCTURA

*Irigoin, F.*¹, *Ferreira, F.*², *Casaravilla, C.*¹, *Kremer, C.*³, *Iborra, F.*⁴, *Soulé, S.*², *Fernández, C.*¹, *Sim, R.B.*⁵ y *Díaz, A.*¹

¹ Cátedra de Inmunología, Fac. Química/Fac. Ciencias; ² Laboratorio de Glicoconjugados, Fac. Química/Fac. Medicina; ³ Cátedra de Química Inorgánica, Fac. Química; ⁴ Departamento de Patología, Oxford, UK; ⁵ Unidad de Inmunoquímica del MRC, Departamento de Bioquímica, Oxford, UK.

En la hidatidosis, la interfase parásito-hospedero está conformada por la pared del quiste hidático (PQH) y las células del hospedero en directo contacto con ella. La capa externa de la PQH, llamada capa laminar (CL), es una malla acelular rica en glúcidos. En la búsqueda de moléculas de la PQH involucradas en controlar el disparo de la inflamación, se purificó un componente que fue identificado como *myo*-inositol hexakisfosfato (IP₆). El IP₆ es una molécula intracelular abundante y ubicua en eucariotas. En *E. granulosus*, el IP₆ se encuentra mayoritariamente en la CL insolubilizado con Ca⁺⁺, siendo la primera vez que se describe una localización extracelular para esta molécula. Mediante diferentes técnicas de microscopía electrónica se determinó que los depósitos de IP₆-Ca⁺⁺ corresponden a los gránulos densos a los electrones, de tamaño definido, que son uno de los dos constituyentes ultraestructurales de la CL; estos gránulos, de origen exocítico, que llamamos "inositosomas", se disponen como agregados sobre las fibrillas ricas en glúcidos que son el otro componente morfológico de la CL. Los inositosomas se purificaron de la CL mediante la digestión química de la malla de glúcidos en que se encuentran inmersos. El material obtenido fue caracterizado por NMR, IR y análisis elemental, detectándose únicamente la sal cálcica de IP₆, de estequiometría Ca₅H₂IP₆·(H₂O)₁₆ (la misma que la de la sal obtenida por precipitación *in vitro* de IP₆ y Ca⁺⁺). Este trabajo abre la puerta al estudio del papel de los inositosomas en la biología del parásito y su interacción con el hospedero.

EFFECTOS DE LA DECONDENSACIÓN DE LA CROMATINA EN RESPUESTA AL DAÑO INDUCIDO POR UV-C EN UNA LÍNEA CELULAR DE HAMSTER CHINO HOMÓLOGA DEL SÍNDROME DE COCKAYNE

Martínez-López, W.^{1,2,3}, *Lorenti, C.*³, *Prosper, I.*¹, *Marotta, E.*³, *Rinaldi, G.*¹, *Folle, G.A.*³, *Natarajan, A.T.*³, *Palitti, F.*³

¹Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (Montevideo – Uruguay).; ²Facultad de Ciencias, UdelaR (Montevideo – Uruguay); ³Università degli Studi della Tuscia (Viterbo – Italy).

AA8 y UV61 son líneas celulares isogénicas que difieren en la eficiencia del sistema de reparación acoplado a la transcripción (TCR). AA8 repara lesiones inducidas por UV-C a nivel de las regiones transcritas de los genes activos. Las células UV61 (símil Síndrome de Cockayne) son deficientes en la reparación de los dímeros de pirimidina de la hebra transcrita. El TCR remueve las lesiones de la hebra transcrita de los genes activos lo que constituye del 5-8% del genoma eucariótico. Por tanto, solo se esperaría que ocurriese un pequeño incremento de las aberraciones cromosómicas (AC) inducidas por UV-C en células UV61. Sin embargo ha sido observado un aumento significativo en la inducción de AC por UV-C en células UV61. Células AA8 expuestas a β -amanitina, un inhibidor de la RNA polimerasa II, también provocó un incremento significativo de las AC. Por otro lado, ha sido descrito que β -amanitina también produce la decondensación de la cromatina, lo cual podría explicar la mayor sensibilidad de las células a la irradiación con UV-C. Para probar esta hipótesis se utilizó un inhibidor de las deacetilasas de histonas, la tricostatina A (TSA), que produce la decondensación de la cromatina sin inhibir a la RNA pol II. El tratamiento con TSA post-irradiación con UV-C de células AA8 mostró un incremento significativo de las AC similar al obtenido con β -amanitina. Los resultados obtenidos sugieren que el proceso de decondensación de la cromatina tendría un rol importante en la conversión de lesiones inducidas por UV-C en AC en células UV61.

Financiado parcialmente por CSIC (UdelaR – Uruguay) y la Universidad de la Tuscia (Italia)



POSTERS

CLONADO Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LOS TRANSPORTADORES ESPECÍFICOS DE UREA EN ARROZ (*Oryza sativa*) Y EN *Aspergillus nidulans*.

*Abreu, C.**, *Bertone, A.[?]*, *Ramón, A.**, *Vidal, S.[?]* y *Gorfinkiel, L.**

* Sección Bioquímica y [?] Unidad de Biología Molecular Vegetal, Depto. de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias - Iguá 4225, Montevideo, Uruguay

Es poco lo que se sabe sobre cómo las plantas absorben la urea y cómo se transporta en el interior de la mismas. Intentando dilucidar los mecanismos de transporte de urea en el arroz, diseñamos una estrategia que involucra su expresión heteróloga en un mutante deficiente en el transportador específico de la urea (UreA) del hongo filamentoso *Aspergillus nidulans*. Identificamos en la secuencia genómica del arroz una proteína que presenta una identidad del 41 % con la permeasa de la urea de *Saccharomyces cerevisiae*, ScDUR3. Utilizando esta información diseñamos cebadores específicos que permitieron clonar por PCR la secuencia correspondiente a DUR3 en arroz (*OsDUR3*) a partir de ADN genómico. Estamos estudiando la expresión del gen en diferentes condiciones de crecimiento (tiempos y fuentes de nitrógeno) así como en los distintos tejidos de la planta. Este estudio se está realizando mediante ensayos de Northern blot y por seguimiento de la localización de una proteína de fusión entre *OsDUR3* y la GFP. Una vez identificadas las condiciones de expresión, se clonará el ADNc y se expresará en *A. nidulans*, para su caracterización bioquímica. En este contexto, hemos considerado de interés clonar el gen *ureA*, que codifica el transportador de la urea en *A. nidulans*, y caracterizar funcionalmente la proteína que éste codifica. *ureA* ya ha sido clonado y en este momento estamos comenzando el estudio de la expresión del mismo. Resultados preliminares sugieren que este gen está sujeto al control por AreA, el mediador de la represión catabólica por nitrógeno en *A. nidulans*.

CLONADO Y EXPRESION FUNCIONAL DE UNA LEUCIN AMINOPEPTIDASA CITOPLÁSMICA DE *FASCIOLA HEPATICA*.

Acosta, D.¹, Carmona, C.¹, Cancela M.^{1,2}, Roche, L.² y Tort, J.²

¹Unidad de Biología Parasitaria, Departamento de Biología Celular y Molecular. Facultad de Ciencias. Instituto de Higiene. UDELAR ²Departamento de Genética. Facultad de Medicina. UDELAR

Fasciola hepatica es el agente causante de la fasciolosis, enfermedad parasitaria en rumiantes domésticos de gran importancia económica. Si bien existen terapéuticas efectivas como el triclabendazol, el tratamiento es costoso y no previene la reinfección. El desarrollo de estrategias de vacunación es fundamental para el control de esta enfermedad. Recientemente nuestro grupo a reportado la presencia de una actividad exopeptidasa en el epitelio intestinal y tegumento del adulto de *F. hepatica*. La purificación y caracterización de la enzima usando diferentes sustratos peptídicos fluorogénicos, así como activadores e inhibidores de proteasas, demostró que se trata de una leucin aminopeptidasa (LAP; E.C. 3.4.11.1). Ensayos de vacunación en ovinos demostraron que la LAP nativa obtenida a partir de parásitos adultos fue capaz de generar una protección media del 89%, la mayor protección reportada hasta el momento en fasciolosis. El clonado y expresión funcional de la LAP abre interesantes perspectivas, en el campo del desarrollo de inmunógenos contra helmintos, y en el estudio de los mecanismos de interacción huésped-parásito. A partir de ARN total de adultos de *F. hepatica* se obtuvo el ADNc completo de una leucin aminopeptidasa de 1550 pb que codifica para una proteína de peso molecular de 52 kDa. El clonado en el vector de expresión pThioHisPatch y su expresión en *E. coli* permitió obtener la proteína como producto de fusión con la tio-redoxina. Mediante cromatografía quelante se obtuvo una fracción altamente enriquecida en una banda de 66-kDa la cual presenta actividad LAP sobre sustratos fluorogénicos.

CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DEL CÁNCER CÉRVICO UTERINO EN LA POBLACIÓN URUGUAYA: ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO EN EL CODÓN 72 DE P53 Y SU VINCULACIÓN CON LA ONCOGENICIDAD DE HPV.

Álvarez, A.D., Greif, G., Tucci, P., Sotelo, J.R. y Sanguinetti, C.

Sección Bioquímica y Biología Molecular del Dpto. de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Montevideo.

La oncoproteína E6 de Papillomavirus humanos (HPV) de alto riesgo se une a la proteína supresora de tumores celular p53 y promueve su degradación a través del sistema de ubiquitinas. Un polimorfismo muy común en la segunda base del codón 72 de p53, un cambio prolina (CCC) por arginina (CGC) en la proteína, ha sido estudiado como posible factor de riesgo para el desarrollo de tumores cervicales asociados con HPV. Storey *et al.* reportaron que la variante arginina es más susceptible a ser degradada por el sistema de ubiquitinas que la variante prolina y que individuos con genotipo homocigoto arginina tienen un riesgo siete veces mayor de desarrollar cáncer cervical que individuos heterocigotas. Sin embargo, este resultado no ha sido corroborado por otros autores. El propósito de nuestro trabajo fue estudiar la frecuencia del polimorfismo en el codón 72 de p53 en la población uruguaya y su correlación con la predisposición al desarrollo de cáncer cervico uterino vinculado a la infección de HPV. Mediante PCR y análisis de RFLP se determinó el genotipo en el codón 72 de p53 de una población control de 150 muestras con ausencia de ADN de HPV y una población de 57 muestras con diagnóstico de carcinoma *in situ* y se comparó la distribución del mismo en ambas poblaciones, no encontrándose diferencias significativas entre ambas. Los resultados obtenidos demuestran que la presencia del alelo arginina no representa un factor riesgo en el desarrollo de cánceres asociados con HPV.

EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE *Echinococcus granulosus* EN CEPAS VACUNALES DE *Salmonella*

Alvite, G., Ehrlich, R., Esteves, E., Maskell, D.^(a) y Hormaeche, C.^(a)

Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, Montevideo-Uruguay; (a)Departamento de Medicina Veterinaria Clínica, Universidad de Cambridge-U.K.

La Hidatidosis es una enfermedad provocada por el platelminto *Echinococcus granulosus*; afecta al hombre y al ganado que eventualmente ofician de hospederos intermediarios del parásito. No se dispone de una vacuna eficaz para su prevención. A pesar que actualmente disponemos de un número importante de genes de este parásito, muy poco se conoce sobre las características antigénicas y las propiedades inmunogénicas de las proteínas correspondientes. El objetivo de este trabajo es desarrollar vacunas para ser utilizadas en el huésped definitivo del parásito (perro). Para ello nos propusimos clonar y expresar de manera estable los antígenos EgFABP2 (proteína de unión a ácidos grasos) y EgTM (tropomiosina) en cepas vacunales de *Salmonella* atenuadas. Ambas proteínas fueron utilizadas en ensayos de protección en perros obteniéndose resultados alentadores. Los genes correspondientes a estas proteínas fueron clonados en el plásmido pTECH2. Posteriormente se transformó la cepa SL5338 de *Salmonella* con el plásmido recombinante, previo a la transducción de las cepas vacunales (C5aroD, SL3261, Se795aroA, BRD726, C5htrA y LVR01aroC) con el fago p22. Los clones recombinantes seleccionados se confirmaron por secuenciación; y se estudió la expresión proteica mediante Western Blots. Se realizaron ensayos de estabilidad in vitro e in vivo. De esta manera se obtuvieron diferentes cepas de *Salmonella* recombinantes que presentan una expresión cuantitativamente equivalente de la proteína heteróloga. La mayoría de las cepas mostraron porcentajes de estabilidad menores para pTECH2-FABP2 que para pTECH2-TM. Este estudio nos permite seleccionar las construcciones más estables para estudiar las características inmunogénicas en ratones previo a la inmunización de perros.

***Mesocestoides corti*: UN MODELO ALTERNATIVO**

Alvite, G., Canclini, L., Corvo, I., Ehrlich, R. y Esteves, A.

Sección Bioquímica, Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Montevideo, Uruguay

Los gusanos cestodes, comúnmente conocidos como gusanos planos, son una importante clase de endoparásitos. *Echinococcus spp.*, *Taenia spp.* y *Mesocestoides spp.* son algunos ejemplos. Nuestro centro de atención ha sido *Echinococcus granulosus*, el agente causante de la hidatodosis, a través de la búsqueda de genes claves para la vida del mismo, como posibles blancos de drogas o vacunas. Contamos actualmente con un importante número de genes que consideramos claves. Sin embargo, varias son las limitantes que nos ofrecen este sistema dificultando el avance, particularmente en el ámbito funcional: no es posible mantener el ciclo de vida del parásito en el laboratorio, ni ninguna de sus formas larvianas; es dificultosa la obtención de material hidático; no están disponibles líneas celulares estables; no se han desarrollado herramientas para manipular y expresar genes en el propio parásito. *Mesocestoides corti*, cestode parásito que rara vez afecta al hombre, resulta un atractivo modelo alternativo dado que varios estadios de su ciclo pueden mantenerse in vitro y aún mantenerse en animales de laboratorio. En base a lo expuesto, hemos adoptado a *M. corti* para estudios moleculares y funcionales de los genes previamente aislados, trasladando las herramientas desarrolladas en *E. granulosus*, (patrones de expresión, electroforesis bidimensionales, inmunohistoquímica, respuesta al shock térmico), y buscando genes y/o proteínas homólogos a los ya aislados (FABPs, tropomiosina, receptor de insulina). Nos proponemos desarrollar nuevas metodologías, especialmente las vinculadas con los estudios funcionales poniendo a punto técnicas de transfección transitoria incluyendo así como el desarrollo de líneas celulares estables.

EFECTOS DEL ESTRÉS SOBRE LAS COLINESTERASAS: UNA EVALUACIÓN DE LAS POSIBLES VIAS Y MECANISMOS DE ACCIÓN

Arce, F., Maruri, A. y Rodríguez-Ithurralde, D.

Unidad de Neurociencia Molecular y Farmacología, Instituto Clemente Estable (IIBCE), Avenida Italia 3318, 11600 Montevideo, Uruguay. FAX: (5982) 4875548. Tel.: (5982) 487 1616. E-mail: drit@iibce.edu.uy

El estrés parece estar implicado en la patogenia de diversas enfermedades neurodegenerativas. El hipocampo, crucial en los procesos de aprendizaje y memoria, está también involucrado en el estrés. Recientemente despierta considerable interés la interacción estrés-acetilcolinesterasa (AChE), ya que ella contribuye a la patología neurodegenerativa en la enfermedad de Alzheimer. Además de hidrolizar la acetilcolina sináptica, la AChE se caracteriza, como otros miembros de su “familia de proteínas con dominio colinesterásico” (tactinas, neuroliginas) por anclajes membranosos selectivos, y por establecer uniones proteína-proteína altamente específicas que son operativas en la adhesión intercelular, en interacciones célula-matriz, y en el crecimiento de las prolongaciones celulares. Por empalme alternativo de su RNA resultan varias isoformas moleculares de AChE con estequiometría, distribución, oligomerización y fisico-química características (AChE-S o Sináptica, AChE-E o Eritrocítica y AChE-R o *Readthrough*, etc.). La AChE-S predomina en el sistema nervioso central y periférico normales, pero por estrés experimental o por exposición crónica a inhibidores, se induce una regulación del empalme alternativo que lleva a la síntesis exagerada de la isoforma monomérica AChE-R. Esta variante “atípica” se acumula en el pericarion y dendritas apicales de las neuronas piramidales de neocorteza e hipocampo, y podría contribuir a disparar la lesión neuronal. Aunque recientemente se ha sugerido que los cambios en empalme alternativo podrían ser parte de una adaptación neuronal al estrés, y que la AChE-R actuaría como un modulador del estrés en el cerebro de mamíferos, para la mayoría de los autores esta disregulación podría contribuir a la neurodegeneración y a la enfermedad de Alzheimer.

NUEVOS COMPUESTOS ANTIFÚNGICOS AISLADOS DE *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* BIOCONTROLADORAS Y SUS EFECTOS SOBRE *RHIZOCTONIA SOLANI* A NIVEL CITOLÓGICO

Bajsa, N.^{1,2}, *Vaz, P.*¹, *De La Fuente, L.*³, *Davyt, D.*⁴, *Arnauld, C.*⁵, *Lemanceau, P.*⁵, *Gianinazzi, S.*⁵, *Gianinazzi-Pearson, V.*⁵ y *Arias, A.*¹.

¹Laboratorio de Ecología Microbiana, IIBCE. ²U.A. Facultad de Ciencias. ³USDA ARS, Washington State University, Pullman, USA. ⁴Cátedra de Química Farmacéutica, Facultad de Química. ⁵INRA, BBCE-IPM. Dijon, France. nbajsa@iibce.edu.uy

Las cepas *Pseudomonas fluorescens* CFBP2392 (sinónimo A6) y UP143 fueron aisladas de rizósfera de plantas sanas creciendo en suelos con damping-off. Ambas cepas son capaces de reducir la infección por *Rhizoctonia solani* en cámaras de crecimiento. Dado que los antibióticos suelen ser los responsables de la actividad biocontroladora en *Pseudomonas* fluorescentes, el objetivo de este trabajo fue purificar y caracterizar los compuestos antibióticos producidos por estas cepas. Se realizaron extracciones orgánicas de cultivos de UP143 y A6 y se separaron por métodos cromatográficos. La actividad antifúngica de las fracciones se evaluó por difusión de discos de papel en agar. De la cepa A6 se aisló un compuesto con actividad cuyos análisis espectroscópicos mostraron que es un ciclopéptido, probablemente con tres o cuatro aminoácidos. Este tipo de molécula no se ha encontrado en otras cepas de *Pseudomonas* fluorescentes. Se estudió la influencia de A6 y del antibiótico que ésta produce sobre la integridad celular de *R. solani in vitro*, mediante microscopía electrónica de transmisión. Al ser expuesto a la bacteria, *R. solani* mostró engrosamiento y distorsiones en la pared celular. En cambio, las alteraciones causadas por el antibiótico fueron a nivel citoplasmático, tales como hipertrofia de mitocondrias, mayor vacuolización y la aparición de estructuras membranosas con contenido granular. Los efectos citológicos de los antibióticos sobre sus organismos blanco aun no han sido extensivamente estudiados. Sin embargo, la elucidación de los mecanismos involucrados en el biocontrol de hongos fitopatógenos es clave para una aplicación consistente del control biológico.

REACCIONES DE LA DESFERRIOXAMINA CON LOS RADICALES DERIVADOS DEL PEROXINITRITO DIÓXIDO DE NITRÓGENO Y CARBONATO: Un mecanismo alternativo para la acción antioxidante de la desferrioxamina

Bartesaghi, S.,¹ Trujillo, M.,² Denicola, A.,³ Folkes, L.,³ Wardman, P. y ¹Radi, R.

¹ Departamento de Bioquímica y Centro de Radicales Libres e Investigaciones Biomédicas, Facultad de Medicina;

² Laboratorio de Físicoquímica Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República y ³ Gray Cancer Institute, Mount Vernon Hospital, UK.

El anión peroxinitrito es una biomolécula que se forma *in vivo* por la reacción del óxido nítrico con el superóxido. La formación del peroxinitrito se asocia con el desarrollo de diversas patologías tales como isquemia-reperfusión, enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas e inflamatorias. Los efectos tóxicos del peroxinitrito se deben principalmente a su reactividad como fuerte agente oxidante y nitrante. La desferrioxamina es un hidroxamato, quelante de metales, capaz de inhibir la química oxidativa del peroxinitrito mediante mecanismos independientes de su capacidad para quelar metales. La desferrioxamina inhibe oxidaciones mediadas por peroxinitrito y atenúa el daño oxidativo dependiente de radicales del oxígeno tanto *in vivo* como *in vitro*. Estudios de cinética rápida revelaron que la desferrioxamina no reacciona directamente con el peroxinitrito. La adición de peroxinitrito a desferrioxamina, tanto en presencia como en ausencia de concentraciones fisiológicas de CO₂ y bajo un exceso de nitrito, llevó a la formación del radical nitróxido de la desferrioxamina, lo cual indica que la desferrioxamina reacciona con los radicales carbonato (CO₃^{•-}) y dióxido de nitrógeno (•NO₂). La desferrioxamina inhibió procesos dependientes de radicales derivados del peroxinitrito, incluyendo dimerización y nitración de tirosina, oxidación de oxihemoglobina en presencia de CO₂, y quimioluminiscencia dependiente de radical carbonato. La oxidación directa de glutatión por peroxinitrito no se vio afectada por la desferrioxamina. La reacción de la desferrioxamina con los radicales CO₃^{•-} y •NO₂ fue confirmada por estudios de radiólisis de pulso obteniéndose constantes de velocidad de segundo orden de 1,7x 10⁻⁹ y 7,6x 10⁻⁶ M⁻¹ s⁻¹, respectivamente.

LOCALIZACIÓN DE DIFERENTES COMPONENTES DE RIBONUCLEOPARTÍCULAS EN LAS PLACAS RIBOSOMALES PERIAXOPLASMICAS DE AXONES MIELÍNICOS.

Cárdenas, M.^{1,2}, Marton, S.¹, Puppo, A.¹, Elizondo, V.¹, Calliari, A.^{1,2}, Sotelo-Silveira, J.R.^{1,3}, Sotelo, JR.¹

1- Laboratorio de Proteínas y Acidos Nucleicos, IIBCE. 2- Area Biofísica, Dpto. Biol.Celular y Molecular, Fac Veterinaria. 3- Sección Biología Celular, Dpto. Biol.Celular y Molecular, Fac Ciencias

La célula neuronal es un tipo celular altamente polarizado, en el cual se han caracterizado recientemente, a nivel de su axón, regiones citoplasmáticas denominadas Placas Ribosomales Periaxoplásmicas (PARPs), ricas en ARNm, ribosomas y proteínas motoras. Tomando como hipótesis la posibilidad que las PARPs sean un sitio de síntesis proteica, nos propusimos estudiar el origen y el transporte de los componentes necesarios para dicha síntesis. Como modelo experimental se utilizaron axones aislados de raíces medulares en comparación con axones y conos de crecimiento de células cultivadas, de los ganglios de la raíz dorsal (GRD) de la rata. En ellos se estudió mediante inmunohistoquímica, la localización de algunos de los componentes de la maquinaria de transporte de ARN, como la proteína de unión a ARNm (HuD), las proteínas motoras (kinesina II y miosina Va), y por hibridización *in situ*, la localización del ARNm codificante para miosina Va. Los resultados obtenidos indican la presencia axoplásmica de HuD y kinesina así como un enriquecimiento de éstas en los dominios tipo PARPs. Asimismo, se identificó la localización preferente del ARNm codificante para la miosina Va en dichos dominios. Análogamente a lo observado en axoplasmas aislados, describimos la colocalización de la miosina Va con proteínas ribosomales en axones y conos de crecimiento de células de los GRDs. La localización preferencial del ARNm, de las proteínas motoras y de la proteína de unión a ARNm en las PARPs, sugiere que estos sitios pueden ser regiones especializadas de localización, distribución, y posible traducción proteica.

EFFECTOS PROVOCADOS POR EL USO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE QUELANTES DE CALCIO EN EL DESENSAMBLE DE LAS UNIONES ADHERENTES EN MONOCAPAS CELULARES DE ENDOTELIO DE CORNEA DE BOVINO

Correa, V y Chifflet, S.

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina.

Las uniones adherentes son uniones intercelulares presentes en los epitelios. Están formadas por cadherinas, proteínas transmembranarias sensibles al calcio, y por proteínas que se asocian a su porción citoplasmática y se vinculan con el citoesqueleto de actina. Se acepta que las cadherinas son las responsables de la ruptura de los contactos celulares en ausencia de Ca^{+2} . Sin embargo, algunos autores sugieren que el efecto de la extracción del Ca^{+2} afecta a las uniones adherentes a través de vías intracelulares de señalización que desencadenarían la contracción del citoesqueleto cortical de actina (CCCA) y ésta, secundariamente, a las interacciones cadherina-cadherina. En este trabajo se estudió el efecto producido por la utilización de diferentes concentraciones de quelante en la distribución de cadherinas (IIF), vinculina (IIF), actina (FITC-faloidina) y en la alteración de la morfología de la membrana plasmática (Dil) de células de endotelio de córnea de bovino *in situ* y en cultivo. Nuestros resultados muestran que en todos los casos tiene lugar la CCCA. Sin embargo, la interacción del citoesqueleto de actina con la cadherina y la vinculina depende de la concentración de quelante utilizada. Por otra parte, la separación de las cadherinas es dependiente de la concentración de quelante, así como de la madurez de los contactos. Asimismo, en determinadas condiciones la ruptura de las interacciones cadherina-cadherina ocurre con posterioridad a la formación de la CCCA. En su conjunto, estos resultados apoyarían la hipótesis de que en ausencia de Ca^{+2} la CCCA ocurre previa a la separación de la interacción cadherina-cadherina.

REDUCCIÓN DE BIOMOLÉCULAS UTILIZANDO AGENTES REDUCTORES EN FASE SÓLIDA CON BRAZOS ESPACIADORES DE DIFERENTE LONGITUD.

Cuadra, K.¹, Ovsejevi, K.¹, Grazú, V.¹ y Batista –Viera, F.¹.

¹ Cátedra de Bioquímica, Facultad de Química. Montevideo, Uruguay. E-mail: kcuadra@fq.edu.uy

Los grupos tiol (SH) son los grupos más reactivos presentes en proteínas. Los agentes reductores en fase sólida son muy eficientes para generar estos grupos, siendo además reusables, regenerables, removibles y no contaminantes. Estos reductores poseen un brazo espaciador o “spacer” con un grupo tiol terminal unido covalentemente a una matriz. Este trabajo reporta la reducción de: β -galactosidasa de *K. lactis* (con disulfuros nativos expuestos) y β -lactoglobulina (con disulfuros internos), utilizando dos derivados tiol-agarosa provistos de “spacers” de distinta longitud, siendo uno tres veces más largo que el otro. Se prepararon reductores con 500-650 μ moles de SH /g de gel seco. Para cada proteína ambos reductores incrementaron en forma semejante el contenido inicial de grupos tiol. La reducción de β -lactoglobulina aumentó el rendimiento de inmovilización en geles tiol-reactivos, de un 2% (proteína nativa, con y sin urea) a más del 70% (proteína reducida en presencia de urea). Esto demuestra que aunque la β -lactoglobulina posee dos residuos cisteína, los mismos no están expuestos. Independientemente del reductor, la β -lactoglobulina se redujo sólo en presencia de urea, confirmando que sus puentes disulfuro son internos. La estructura de la cadena lateral del reductor determinó su comportamiento; aún para el agente de cadena más larga fue requerida la apertura de la estructura proteica. Los grupos hidroxilos en el brazo espaciador incrementarían su hidrofiliidad, impidiendo el acceso a disulfuros internos. Este trabajo continuará con el desarrollo de agentes reductores con brazos espaciadores modificados que permitan reducir disulfuros en proteínas sin requerir agentes desnaturizantes que comprometan su actividad biológica.

LA VIA DE SINTESIS DE PROLINA EN PLANTAS EN CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO ESTÁ CONDICIONADA POR LA NUTRICIÓN NITROGENADA

Díaz, P.¹, Borsani, O.¹, Márquez, A.² y Monza, J.¹

¹Laboratorio de Bioquímica. Departamento de Biología Vegetal. Facultad de Agronomía. Montevideo, Uruguay. ² Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular. Facultad de Química. Sevilla España.

En condiciones de estrés hídrico las plantas acumulan prolina por dos vías, una parte del glutamato, que es reducido a glutamato semialdehído (GSA) y la otra genera GSA a partir de ornitina. El GSA resultante se cicla espontáneamente a pirrolín 5 carboxilato, que es reducido a prolina. En este trabajo se evalúa el efecto del nitrato o amonio sobre la vía de acumulación de prolina en condiciones de estrés hídrico en *Lotus corniculatus*. Las plantas cultivadas con amonio (PCA) acumularon más prolina que las cultivadas con nitrato (PCN) cuando fueron sometidas a estrés hídrico. En PCN se detectaron altos contenidos de glutamato, aspartato y alanina, que disminuyeron cuando las plantas fueron sometidas a estrés. En este tratamiento se observó un incremento de la actividad enzimática y contenido de Fd-glutamato sintasa. Este incremento se puede relacionar con la mayor demanda de glutamato, necesario para mantener la tasa de síntesis de prolina. Por otro lado, en PCA se observaron bajos niveles de los aminoácidos glutamato, alanina y aspartato, que no variaron como consecuencia del estrés hídrico. En PCA no estresadas se encontraron importantes niveles de arginina y ornitina, que no se detectaron en PCN. La actividad enzimática Fd-glutamato sintasa no varió como consecuencia del estrés, pero disminuyó el contenido de esta proteína en plantas sometidas a sequía. En *L. corniculatus* la vía de síntesis de prolina a partir de glutamato sería relevante en plantas cultivadas con nitrato, mientras que la vía a partir de ornitina lo sería cuando se cultivan con amonio.

UN NUEVO TIPO DE PROTEÍNA DE UNIÓN AL AND QUE RECONOCE UN MOTIVO FRECUENTE EN LAS REGIONES INTERGÉNICAS DE *Trypanosoma cruzi*

Duhagon, M.A.¹, Dallagiovanna, B.¹, Ciganda, M.¹, Ruyechan, W.², Williams, N.² y Garat, B.¹

1. Laboratorio de Interacciones Moleculares. Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay and
2. Dept. of Microbiology. 251 Biomedical Research Building. State University of New York at Buffalo. Buffalo 14214, NY. USA

En los tripanosomátidos, la regulación de la expresión génica no está todavía bien comprendida. Los genes se organizan en largas unidades policistrónicas separadas por regiones intergénicas que deben contener la información señal para el procesamiento de los ácidos nucleicos. Los poli-dinucleótidos son frecuentes en estas regiones y se ha propuesto que estén involucrados en la regulación de la expresión génica. Hemos reportado que los repetidos de dinucleótidos [dT-dG] son altamente frecuentes, están asimétricamente distribuidos y constituyen blancos para la unión específica de proteínas de epimastigotas de *T. cruzi*. Aquí presentamos la purificación y caracterización de una proteína, Tc38, de unión a ácidos nucleicos en forma de hebra simple que reconoce específicamente estos motivos. No presenta dominios arquitectónicos ni composicionales conservados. Presenta un punto isoeléctrico de 9.34, una alta frecuencia de Ser y Leu y di-aminoácidos. Existen genes ortólogos en *Leishmania major* y *Trypanosoma brucei*. Se obtuvo Tc38 recombinante como proteína de fusión con GST, y fue purificada y usada para analizar la especificidad por el blanco mediante EMSA. Las inusuales características de esta proteína junto con las características peculiares de su blanco en el ADN sugieren la existencia de un nuevo evento que podría estar relacionado a la distintiva regulación genómica observada en los tripanosomátidos.

PREVALENCIA EN LA POBLACIÓN MONTEVIDEANA DEL POLIMORFISMO GENETICO C677T EN EL GEN QUE CODIFICA PARA LA MTHFR HUMANA

Echarte, L.^{1,2}, Cardozo, H.², Greiff, G.¹, Sanguinetti, C.¹, Tucci, P.¹, Mimbacas, A.^{1,2}

Facultad de Ciencias¹, Depto. Bioquímica e IIBCE², Depto. Citogenética, Montevideo, Uruguay. E-mail: lourdesecharte@hotmail.com

La Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) juega un rol clave en el ciclo del folato y la homocisteína, catalizando la síntesis de 5-metilTHF, co-sustrato de la remetilación de homocisteína a metionina. El polimorfismo C677T en el gene *methfr*, produce una variante MTHFR termolábil de actividad enzimática reducida. El genotipo homocigota 677TT se ha asociado con hiperhomocisteinemia moderada, dependiendo del estatus folato. Este polimorfismo ha sido propuesto como factor de riesgo (F.R) para enfermedades vasculares oclusivas, defectos en el tubo neural y neoplasias malignas. Como la distribución de C677T MTHFR es mundial, pero su frecuencia es muy heterogénea en distintas regiones y grupos étnicos nos propusimos investigar su prevalencia en una muestra representativa de población montevideana. Para ello utilizando el banco de ADN creado por el Depto. de Citogenética, IIBCE, realizamos la genotipificación de 107 individuos por PCR-RFLP. La frecuencia de los genotipos es consistente con la distribución esperada en equilibrio de Hardy-Weinberg ($p < 0.47$). Entre los 107 individuos 10 fueron homocigotos 677TT (9.35%) y la frecuencia del alelo T fue 35%, similar a la obtenida en poblaciones caucásicas, 34%(29-39%). Dado que la prevalencia en nuestra población es alta y sus efectos negativos se asocian a un déficit en folato sería conveniente analizar su nivel de consumo, así como de las vitaminas B12 y B6. Este estudio servirá de base para entender como este F.R, común en nuestra población general, actúa combinándose con otros F.R genéticos o adquiridos en las distintas enfermedades multifactoriales a las que se lo asocia, ayudándonos a determinar su riesgo relativo en cada caso.

CARACTERIZACION DE *Hig1* (HYPOXIA INDUCED GENE) EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE LA RATA : EXPRESIÓN DIFERENCIAL DURANTE EL DESARROLLO Y DETECCIÓN DE UN ARN ANTISENTIDO.

Ferreiro, M.J., Agrati, D., Vargas, M., Chalar, C.² y Bedó, G.

Secc.Genética Evolutiva, 2 Secc. Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Ciencias. Iguá 4225, 11400. Montevideo, Uruguay. E-mail: gbedo@fcien.edu.uy

Durante el desarrollo del Sistema Nervioso Central (SNC) de mamíferos se han definido “períodos críticos”, de los cuales el que ocurre en los primeros días de vida postnatal, asegura la maduración de las motoneuronas y el establecimiento definitivo de la innervación. Si bien se han identificado algunos factores de transcripción implicados en este proceso, poco se sabe acerca de los cambios en expresión génica. Mediante rastreo diferencial de una biblioteca de cDNA y técnica de “differential display”, hemos identificado genes que muestran cambios en su expresión en la médula espinal de rata entre los días 1 y 8 de vida postnatal. Describimos aquí la secuencia de *Hig1* (hypoxia induced gene) de rata (Accession number NM_080902), siendo la primera evidencia de expresión de este gen en Sistema Nervioso. Se observa alta homología con las secuencias previamente descritas en células cervicales de humano y ratón, aparentemente relacionadas con la hipoxia o el bajo nivel de glucosa. Asimismo, se identifican secuencias genómicas en los cromosomas 8 y X de rata. El patrón temporal de expresión entre los 15 días de vida embrionaria y los 15 días de vida postnatal fue analizado mediante RT-PCR semicuantitativa a partir de ARN de médula espinal. La hibridización *in situ* de cortes de médula espinal y de cerebro mostró la distribución espacial de este gen en poblaciones neuronales específicas, así como una primera evidencia de la expresión del ARN “antisentido”. Estos resultados son aportes preliminares para comprender la funcionalidad de este gen en el Sistema Nervioso.

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *FUSARIUM* spp AISLADAS DE TRIGO

Garmendia, G.¹, Garat, M.F.¹, Pereyra, S.³, Brena, B.², Pianzzola, M.J.¹ y Vero, S.¹

1 Cátedra de Microbiología, 2 Cátedra de Bioquímica Facultad de Química. Montevideo.

3 Protección Vegetal INIA La Estanzuela. Colonia

Una de las micotoxinas de mayor incidencia en nuestro país es el Deoxinivalenol, (DON). El DON es un tricoteceno tipo B, producido fundamentalmente por especies del género *Fusarium*. (por ej. *F. graminearum*, *F. crookwellense*, *F. culmorum*). Aunque la síntesis y regulación de la expresión de estas micotoxinas no se conoce muy bien, algunos pasos claves en la vía de síntesis se han elucidado y se han secuenciado algunos de los genes involucrados. En este trabajo se han aislado cepas contaminantes de granos de trigo de la zafra 2002/2003 de Uruguay, las cuales están siendo identificadas a especie según la clave de Nelson y caracterizadas genéticamente. Se ha detectado la presencia del gen denominado *Tri5*, que codifica la tricodieno sintetasa, que cataliza el primer paso de la biosíntesis de tricotecenos. Su presencia no asegura la producción de DON, pero su ausencia imposibilita la producción. A pesar de contar con cepas de una misma especie y creciendo en medios idénticos, la producción de la toxina es variable. Algunas cepas producen altas cantidades, otras relativamente poco. Esta variación se ha relacionado con la región intergénica *tri5-tri6*. En este trabajo se ha estudiado esta región, amplificándola con primers específicos. Se utilizaron dos pares de primers, uno de ellos específico para cepas productoras y otro para cepas poco productoras. Luego de una PCR se obtiene como resultado fragmentos diferenciables de ADN, permitiendo de esta forma una selección primaria de cepas potencialmente productoras de DON.

Proyecto financiado por Comisión Fulbright y PEDECIBA Química

BÚSQUEDA DE ADN INDÍGENA EN LA POBLACIÓN DE MONTEVIDEO

Gascue, C.¹, Mimbacas, A.^{1,2}, Sans, M.³, Gallino, J.⁴, Cardoso, H¹.

¹Citogenética IIBCE, ²Citogenética UA-FC, ³Antropología FHCE, ⁴Biotecnología FA.

Estudios previos mostraron que la composición genética de la población uruguaya es el resultado de la mezcla de los tres diferentes grupos que le dieron origen: europeos, africanos y americanos nativos. El objetivo de este trabajo fue determinar el aporte amerindio mediante el análisis de 4 polimorfismos del ADN mitocondrial (ADNmt), identificados cada uno por una mutación específica y denominados como haplogrupos A-D. Éstos son llamados "linajes fundadores" debido a que se encuentran presentes en el 96,6% de los nativos de América modernos y no existen en poblaciones europeas y africanas. El ADNmt constituye una buena herramienta para estos análisis porque se transmite de manera materna sin recombinación intermolecular, por lo que la información se mantiene a través de las generaciones más fielmente que la transmitida a través del ADN nuclear. Mediante las técnicas de PCR y RFLPs se estudió una muestra de 108 individuos residentes en Montevideo, provenientes de un banco de ADN (Citogenética, IIBCE), la cual es representativa de la población general por abarcar los diferentes estratos sociales que la componen. Los resultados muestran que un 20,37% de la población de Montevideo presenta uno de los 4 haplogrupos estudiados (A: 36,36%, B: 31,82%; C: 18,18%, D: 13,64%). Esto indicaría que 1 de cada 5 montevideanos posee al menos un ancestro indígena en su genealogía.

EL GRUPO DE UNIÓN DE UNA ENZIMA AL SOPORTE: FACTOR DETERMINANTE DE LAS PROPIEDADES DEL BIOCATALIZADOR INMOVILIZADO

Giacomini, C., Irazoqui, G., Batista Viera, F. y Brena, B.M.

Cátedra de Bioquímica, Facultad de Química. Gral. Flores 2124. CC1157. Montevideo, Uruguay,
FAX: + 598 2 9241906. Email: bbrena@fq.edu.uy

La inmovilización sobre soportes sólidos es quizás la estrategia más utilizada para mejorar las propiedades de los biocatalizadores pero requiere el conocimiento de factores críticos para el proceso. En este trabajo se estudió la inmovilización de tres β -galactosidasas en soportes tiol-reativos con el fin de evaluar la influencia del grupo reactivo de la enzima involucrado en la unión, en las propiedades del derivado inmovilizado. De las β -galactosidasas estudiadas (*Escherichia coli*, *Kluyveromyces lactis* y *Aspergillus oryzae*) sólo la de *E.coli* presenta grupos tiol nativos expuestos en la superficie, por lo que esta estrategia de inmovilización no permite la orientación selectiva de la misma. En los otros dos casos, los grupos tiol pueden ser introducidos por reducción de sus puentes disulfuro, tiolación química pre- inmovilización, o mutagénesis dirigida, lo que genera alternativas que podrían resultar en mejores biocatalizadores. El derivado de *E. coli* presenta muy buena actividad pero su estabilidad no se mejora por la inmovilización. Los derivados de *K. lactis* obtenidos con el proceso de reducción son térmicamente más estables que la enzima soluble. También se logra estabilización respecto a los co-solventes acetona y dimetilformamida (18 % v/v). Sin embargo, la inmovilización de la enzima tiolada genera derivados de estabilidad similar a la enzima en solución. El comportamiento de la β -galactosidasa de *A.oryzae* es notoriamente diferente. Con el proceso de tiolación se obtienen derivados sustancialmente más estables que con el proceso de reducción, frente a la temperatura y frente a los co-solventes, aunque ninguno de los derivados resulta más estable que la enzima soluble.

CARACTERIZACIÓN SIMBIÓTICA Y MOLECULAR DE CEPAS NATIVAS DE *SINORHIZOBIUM MELILOTI*.

González, F.¹, Grieco, G.¹, Casaretto, E.¹, Carbo, A.², Peixoto, L.², Castro, S.², Pérez, E.¹, Labandera, C.¹ y Martínez-Drets, G.²

¹ Departamento de Microbiología de Suelos. División de Suelos y Aguas. Dirección General de Recursos Naturales (MGAP). ² Departamento de Bioquímica, IIBCE (Unidad Asociada a Facultad de Ciencias).

La alfalfa es la leguminosa forrajera de mayor producción y persistencia en Uruguay. Su capacidad de asociación con bacterias del género *Sinorhizobium* (*Sinorhizobium meliloti*) mediante la formación de nódulos radiculares, le permite obtener nitrógeno atmosférico para su desarrollo. El microorganismo es capaz de fijar el nitrógeno y transformarlo en formas asimilables por la planta constituyendo, por tanto, una alternativa natural al uso de fertilizantes nitrogenados. En nuestros suelos existen naturalmente cepas nativas o naturalizadas de rizobios, pero a menudo, fallan en producir una simbiosis efectiva debido al escaso número ó a la ausencia de especificidad con la leguminosa a implantar. La inoculación de la leguminosa con una concentración adecuada del rizobio correspondiente es esencial para una nodulación efectiva. Factores bióticos y abióticos pueden afectar esta asociación. Entre estos, la acidez del suelo constituye un factor de estrés importante que afecta el establecimiento y funcionamiento de una simbiosis efectiva. Un porcentaje de los suelos de nuestro país es ácido, lo que restringe la producción de alfalfa. Con el objetivo de contribuir a mejorar la implantación de este cultivo a través de una mayor eficiencia simbiótica particularmente en condiciones de acidez, se estudiaron las características simbióticas, bioquímicas, y moleculares de 27 aislamientos nativos. En particular se estudió su capacidad de crecer a pH.ácido. La efectividad simbiótica se determinó mediante estimación estadística de valores de materia seca de plantas crecidas en cámaras de crecimiento. Los aislamientos con características genéticas contrastantes se están evaluando en invernáculo y campo.

Financiación INIA/ BID, PEDECIBA.

PURIFICACIÓN E INMOVILIZACIÓN EN UN SOLO PASO DE β -GLUCOSIDASAS A PARTIR DE UNA CEPA AUTÓCTONA DE LEVADURA.

González, P., Batista, F., y Brena, B.

Cátedra de Bioquímica, Facultad de Química. Montevideo

La β -glucosidasa es una enzima de considerable importancia en tecnología de alimentos que se utiliza para incrementar el aroma de mostos, jugos de fruta y vinos. Se trabajó con una cepa autóctona de levadura, previamente seleccionada por el grupo de enología de Facultad de Química. Se estudió la producción de β -glucosidasas intra y extra-celulares en función del tiempo de cultivo así como la influencia de la celobiosa como inductor de la enzima. La cepa produce tres β -glucosidasas intracelulares de las cuales dos son mayoritarias. Esto se evidenció mediante el revelado específico con 4-metilumbeliferil- β -D-glucósido (sustrato fluorogénico), luego de la separación electroforética en geles nativos de gradiente de poliacrilamida. Se ha estudiado y optimizado la purificación de las mismas por intercambio iónico en geles amino-agarosa (monoaminoetil-N-aminoetil). Las β -glucosidasas purificadas exhiben un óptimo de actividad catalítica a 50°C y pH 4.5 y presentan actividad frente a celobiosa y sacarosa. La enzima es inhibida por Zn^{+2} y Mg^{+2} y dado que no fue afectada por el EDTA parece no depender de un cofactor metálico. La presencia de etanol (hasta 2M) aumenta la actividad glicosidásica en forma importante. Mediante el procedimiento de intercambio iónico no solo fue posible purificar sino inmovilizar en un solo paso las β -glucosidasas. El biocatalizador inmovilizado presentó muy buenas propiedades de actividad y estabilidad. Debido a que los glicósidos presentes en el vino representan una fuente potencial de compuestos aromáticos, es de gran interés estudiar el uso de las β -glucosidasas inmovilizadas para la liberación de los precursores aromáticos ligados.

ANÁLISIS DE REDES REGULATORIAS CONTROLADAS POR EL COMPLEJO TRANSCRIPCIONAL “HAP” EN LA LEVADURA DE PANADERO

Graña, M., Delahodde, A. y Bolotin-Fukuhara, M.

Laboratorio de Genética Molecular, Instituto de Genética y Microbiología (CNRS UMR 8621), Universidad de París XI, Francia. E-mail: marting@fcien.edu.uy

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* exhibe considerable flexibilidad en la regulación coordinada de redes encargadas de la fermentación y la respiración. El crecimiento máximo se obtiene bajo elevadas concentraciones de glucosa, y esto incluso en presencia de oxígeno (represión catabólica). El complejo de transcripción Hap2/3/4/5p es el principal responsable de la inducción de la maquinaria respiratoria cuando la glucosa se torna escasa en el medio (transición diáuxica). Este complejo consta de un trímero de unión al ADN, Hap2/3/5p, expresado constitutivamente, y un dominio activador, Hap4p, sub-unidad cuyo transcripto está regulado por la fuente carbonada. En este trabajo analizamos el transcriptoma de cepas mutantes nulas para *HAP2* y *HAP4*. Se puso de manifiesto que las cascadas de regulación afectadas por este complejo van mucho más allá del control estrictamente respiratorio. También validamos estos resultados de transcriptoma con un abordaje de Northern blot, para algunos genes sub-expresados en los mutantes –siendo pues presumiblemente regulados positivamente por el complejo HAP. Finalmente, estudiamos algunos aspectos fisiológicos de diversos mutantes del tetrámero.

ADN CINCUENTA: 25 de abril de 1953-25 de abril de 2003

Greif, G.

Instituto de Biología. Departamento de Biología Celular y Molecular. Sección Bioquímica. Facultad de Ciencias.

En 1869 Miescher aísla a partir de esperma de salmón y de otras muestras una sustancia ácida que denomina nucleína, veinte años después Miescher le escribe a su tío que la nucleína podía transportar el mensaje de la vida “del mismo modo que las palabras y los conceptos de todos los lugares encuentran expresión en 24 o 30 letras”. Igualmente, casi un siglo antes, Erasmus Darwin pensaba que “la causa de toda vida orgánica ha sido uno y el mismo tipo de filamentos.....”. Recién medio siglo después del descubrimiento de Miescher, comienzan a aparecer fuertes evidencias sobre el papel del ADN en la herencia. En 1943 Schrödinger plantea en el Trinity Colleague: “estos cromosomas...los que contienen en una especie de guión la clave de toda la pauta del futuro desarrollo del individuo y de su funcionamiento”. Avery que en 1942 había demostrado este papel junto con McLeod y McCarty le escribía a su hermano Roy: “si estamos en lo cierto.....los ácidos nucleicos son funcionalmente activos en la determinación de la actividad bioquímica ...y caracterización específica de la célula”. Muchos son los participantes de la historia del descubrimiento de la estructura (y función) del ADN. Hoy, a 50 años de la publicación del famoso artículo de Watson y Crick que dio por finalizada una etapa, pretendo rescatar al resto de los protagonistas: Franklin, Wilkins, Chargaff, Donohue, Gosling, Pauling, Ronwik, Corey, Atsbury....., así como también proyectar hacia el presente y futuro las consecuencias de la elucidación de la doble hebra.

ACONITASA DE *Sinorhizobium meliloti* 1021 COMO UN BIOSENSOR DE LA CONCENTRACIÓN DE HIERRO

Hannibal, L. y Noya, F.

Laboratorio de Ecología Microbiana, Departamento de Bioquímica, Instituto de Investigaciones Biológicas "Clemente Estable", Montevideo.

El presente estudio intenta determinar si la aconitasa (AcnA) de la bacteria fijadora de nitrógeno *Sinorhizobium meliloti* es capaz de actuar, no sólo como enzima en el ciclo de los ácidos tricarbónicos, sino también como biosensor de los niveles de hierro. Este metal es un elemento de importancia vital en el proceso de fijación biológica del nitrógeno y por tanto se le ha adjudicado una participación clave en las interacciones bacteria-hospedero. Las bacterias del suelo, incluyendo las de interés agronómico como *S. meliloti*, se encuentran en un entorno donde el metal se halla formando agregados insolubles difíciles de asimilar. Curiosamente, en estas bacterias aún no se ha encontrado el regulador global responsable de detectar los niveles del metal y responder adecuadamente a ellos. En células eucariotas esta función es llevada a cabo por la IRP-1 (iron regulated protein 1), una ferroproteína con una función dual. En condiciones de abundancia de hierro, la proteína funciona como aconitasa citoplasmática, pero si el hierro escasea la proteína pierde su actividad aconitasa y adquiere la capacidad de unirse a regiones no traducidas de ARNm involucrados en el transporte o utilización del metal. Nuestros resultados preliminares muestran que la AcnA, única proteína clasificada como aconitasa en *S. meliloti*, presenta un alto grado de homología con IRP-1. Hemos comprobado que la actividad aconitasa de AcnA es sensible a las concentraciones de hierro tanto *in vivo* como *in vitro*. Esta actividad puede ser recuperada *in vitro* a través del agregado de Fe(II) en condiciones reductoras, propiedad ésta que también es compartida por IRP-1. Hemos verificado que este efecto es relativamente específico de AcnA no observándose en otras enzimas relacionadas como la succinato deshidrogenasa, la isocitrato deshidrogenasa o la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

USO DE PORFIRINAS DE Mn^{III} PARA LA PROTECCIÓN DE LA SUCCINATO DESHIDROGENASA MITOCONDRIAL FRENTE AL DAÑO POR ONOO⁻

Hannibal, L. y Ferrer-Sueta, G.

Laboratorio de Físicoquímica Biológica, Instituto de Química Biológica. Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo.

Las porfirinas de manganeso redirigen las oxidaciones mediadas por peroxinitrito (ONOO⁻) y radical carbonato (CO₃^{-•}) generado a partir de la reacción de CO₂ con ONOO⁻ hacia distintos reductores biológicos desviándolos de otros blancos potencialmente críticos como proteínas y ácidos nucleicos. Esta redirección ocurre mediante el ciclo catalítico redox de las porfirinas entre Mn^{IV} y Mn^{II}. Hemos determinado que un sistema de partículas submitocondriales (PSM) en presencia de succinato como sustrato respiratorio realizan la reducción *in vitro* de las porfirinas desde Mn^{III} a Mn^{II}. La exposición de las PSM tanto a bolos como a infusiones de ONOO⁻ en concentraciones micromolares, produce una inactivación del 50 a 60% de la actividad succinato deshidrogenasa. En particular, el grado de inactivación no aumenta en presencia de CO₂, lo cual sugiere que el daño por ONOO⁻ no ocurre por un mecanismo exclusivamente de radicales. Por otra parte, el sustrato de la enzima no protege del daño oxidativo ocasionado por ONOO⁻, pero su presencia es indispensable para la protección mediada por las porfirinas. Nuestros resultados muestran que las porfirinas de Mn^{III} estudiadas son antioxidantes efectivas, ya que protegen el 90% de la actividad frente a la exposición a ONOO⁻. Con base en estos y otros resultados, una concentración aumentada de las porfirinas en el estado reducido Mn^{II} en la matriz mitocondrial puede imaginarse como un recurso muy poderoso para la inactivación de ONOO⁻ y CO₃^{-•}.

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE UNA GLUTATIÓN S-TRANSFERASA DE *ECHINOCOCCUS GRANULOSUS*.

Harispe, L.^{1,2} y Fernández-Mancebo, V.²

¹Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, ²Cátedra de Inmunología, Facultad de Química – Facultad de Ciencias – Montevideo.

Las glutatión S-transferasas (GSTs) constituyen una familia de proteínas multifuncionales inducibles por xenobióticos e involucradas en la detoxificación celular de componentes citotóxicos y genotóxicos. En helmintos parásitos las GSTs adquieren especial relevancia debido a que estos organismos presentan escasos mecanismos de detoxificación alternativos. Por ejemplo, en *F. hepatica* se han descrito formas citosólicas y secretadas de esta enzima, y en cultivos de estadios larvarios de *E. granulosus* se ha detectado actividad GST. Recientemente se ha clonado y caracterizado en nuestro laboratorio un gen, de *E. granulosus*, que codifica para una GST citosólica inducible por Fenobarbital (EgGST). La caracterización bioquímica de esta GST podría contribuir al entendimiento de la relación entre el hospedero y el parásito aportando elementos que permitan el control de la infección. Aquí se presenta la expresión y purificación de la EgGST recombinante enzimáticamente activa y la determinación de su actividad específica. Asimismo, se establece su patrón de especificidades con segundos sustratos y su sensibilidad a distintos inhibidores.

ESTUDIO DEL EFECTO DE MUTACIONES SINÓNIMAS SOBRE EL PLEGAMIENTO DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS

Horjales, S.¹, Cota, G.¹, Rovira, C.², Señoral, M.¹, Ehrlich, R.¹, Marín, M.¹

(1) Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, UdelaR; (2) Dpto. de Oncología, Hospital Universitario de Lund, Suecia.

AISLAMIENTO DE UN GEN LIM-HOMEBOX DE *Mesocestoides corti* Y ESTUDIO DE SU EXPRESIÓN MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL

Lalanne, A.I., Britos, L., Ehrlich, R. y Castillo, E.

Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, Montevideo.

El platelminto parásito *Mesocestoides corti* (Cyclophyllidea, Mesocestoididae), es un interesante modelo para estudiar la biología de los cestodos. La larva o tetratiridio se divide asexualmente por fisión longitudinal, en el hospedero intermediario. En ciertas condiciones de cultivo *in vitro* los tetratiridios se desarrollan en formas estrobilares, adultas, al igual que en el intestino del hospedero definitivo. Se aisló la secuencia parcial de un gen, que llamamos *MvLim*, y que presenta una alta similitud con genes de la familia LIM-homeobox. Por estudios de Southern blot se comprobó que este gen se encuentra en copia única. Las proteínas que estos genes codifican son factores de transcripción que contienen dos motivos LIM, de interacción proteína- proteína, y un homeodominio, que se une al ADN. Mediante PCR en tiempo real se cuantificó la expresión de *MvLim* en tetratiridios y adultos, respecto al gen de expresión constitutiva GAPDH. Se constató que el nivel de expresión de *MvLim* aumenta 20 veces en el desarrollo de tetratiridio a gusano adulto. *MvLim* presenta una mayor identidad con genes del grupo *lin-11* que participan en la especificación del destino de neuronas sensoriales (de respuesta a estímulos químicos, olfativos, táctiles y térmicos) y neuronas motoras. Esto sugiere que *MvLim* podría estar involucrado en el desarrollo del sistema nervioso de *Mesocestoides*.

GENES HOX DE *Echinococcus granulosus* Y *Mesocestoides corti*

Lalanne, A.I., Blanco, N., Ehrlich, R. y Castillo, E.

Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, Montevideo.

Echinococcus granulosus es el agente causante de la hidatidosis y *Mesocestoides corti* es otro cestodo adoptado como modelo por su manejo accesible en el laboratorio. Ambos presentan una importante plasticidad biológica que los posiciona como modelos atractivos para estudios de desarrollo. Intentando identificar los genes que participan en la formación del patrón durante el desarrollo de parásitos cestodos, nos hemos interesado en el aislamiento de factores de transcripción, en especial los genes con *homeobox* del tipo *Hox*. Estos genes establecen identidad posicional en el eje ántero- posterior de muchos organismos. Mediante RT- PCR hemos aislado 3 secuencias parciales de genes *Hox* de *M. corti*: *MvHox1*, *MvHox7* y *MvHox10*. Las secuencias de estos genes muestran una alta similitud en la región del homeodominio con genes *Hox* de grupos parálogos anteriores, centrales y posteriores. Se constató mediante RT-PCR que *MvHox1* se expresa en los dos estadios abordables del parásito: larvas (tetratiridios) y adultos (segmentados). En *E. granulosus* se aislaron 3 secuencias parciales de genes *Hox*: *EgHox3*, *EgHox5* y *EgHox9*, distintos a los hallados previamente en este parásito. Los estudios preliminares de expresión por hibridación *in situ* en el organismo entero, para dos de los genes de *E. granulosus* encontrados, muestran una mayor expresión en la zona anterior del protoescólex. Este trabajo contribuyó a aumentar el número de las familias de genes *Hox* conocidos de cestodos de 5 a 8.

4558

DETECCIÓN MOLECULAR DE MICROMETÁSTASIS EN GANGLIO CENTINELA DE PACIENTES CON MELANOMA

Manrique, G.^a, Alonso, O.^a, Alvarez, B.^a, De Boni, D.^c, Delgado, L.^b y Martínez, M.^b

^a Centro de Medicina Nuclear, ^b Dpto. Básico de Medicina y ^c Cátedra de Dermatología del Hospital de Clínicas, Universidad de la República. ^c Instituto Nacional de Oncología. Montevideo, Uruguay.

En pacientes con melanoma (ML), la detección del ganglio centinela (GC), la biopsia del mismo y posterior análisis histopatológico han revolucionado la habilidad de identificar con exactitud y de manera mínimamente invasiva, aquellos pacientes que presentan metástasis ganglionares ocultas. Sin embargo un subgrupo de pacientes con GC negativos recaerán en la evolución de la enfermedad indicando que la evaluación histopatológica del GC puede subestimar la presencia de metástasis clínicamente relevantes. La detección molecular de micrometástasis del GC mediante técnicas de RT-PCR es considerablemente más sensible, presentando una mejor relación costo beneficio que las técnicas histopatológicas convencionales. OBJETIVOS: Poner a punto en muestras de GC, un ensayo de RT-PCR para tres marcadores asociados al melanoma, con especial énfasis en la relación sensibilidad/especificidad. METODOS: Seleccionamos tres marcadores asociados a melanoma, a) la enzima Tirosinasa b) la proteína MART-1 y c) la proteína MIA. Analizamos 11 biopsias de GC proveniente de 11 pacientes con ML clínicamente localizado y 3 biopsias de ganglios linfáticos de pacientes sanos. Optimizamos las condiciones de la RT-PCR para cada marcador. RESULTADOS: Optimizando el número de ciclos de la PCR obtuvimos una alta especificidad y muy buena sensibilidad para cada marcador, pudiendo detectar 1 célula de melanoma en un fondo de 1×10^6 linfocitos. Detectamos la presencia de por lo menos un marcador en 7 de 11 muestras de GC: tirosinasa (n=6), MIA (n=3), y MART-1 (n=2). Mediante estudio histopatológico se diagnosticó metástasis en 4 muestras, las cuales resultaron también positivas por RT-PCR. Al comparar el espesor medio del tumor primario, encontramos valores mas altos en el grupo de pacientes con RT-PCR positivo comparado con el grupo negativo para el ensayo.

EFFECTO DE LA DEPOLARIZACIÓN INESPECÍFICA DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA SOBRE EL CITOESQUELETO DE ACTINA EN EPITELIOS: ROL DE LAS UNIONES ADHERENTES.

Nin, V.¹, Correa, V.¹, Justet, C.¹, Hernández, J.³ y Chifflet, S.¹

¹ Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina ² Sección Biofísica, Facultad de Ciencias ³ Sección Biofísica, Facultad de Ciencias

Algunos autores han sugerido que el potencial de membrana plasmática (PMP) de las células no excitables podría participar en procesos de señalización celular. En trabajos previos demostramos que monocapas confluentes de células de endotelio de córnea de bovino (BCE) en cultivo, caracterizadas por poseer uniones adherentes de tipo epitelial (UAE) (esto es, con distribución circunferencial de actina), responden a la depolarización inespecífica del PMP (DIMP) mediante cambios característicos en la organización del citoesqueleto. Con el fin de contribuir a comprender los mecanismos que median esta respuesta, estudiamos el efecto de la DIMP sobre el citoesqueleto de actina en epitelios con y sin UAE. En este estudio se utilizaron monocapas confluentes de células de los siguientes epitelios: BCE, epitelio pigmentario de retina de bovino (RPE) y dos líneas de epitelio de cristalino de ratón, ?TN4-1 y ?TN4-1-T. La DIMP se logró mediante la incubación de las monocapas en gramicidina-D o en soluciones isotónicas de gluconato de potasio. La distribución de cadherinas y actina se reveló empleando sondas fluorescentes. La asociación de cadherinas con el citoesqueleto se estudió mediante Western-blot. Los resultados obtenidos muestran que las células BCE y las ?TN4-1-T, que presentan UAE bien definidas, desorganizan el citoesqueleto de actina en respuesta a la DIMP. Sin embargo, no se aprecian alteraciones en las células RPE y ?TN4-1, epitelios que no desarrollan UAE. Estos resultados sugieren que la presencia de uniones adherentes de tipo epitelial es necesaria para que ocurra reorganización del citoesqueleto de actina en respuesta a la DIMP.

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA PROTEÍNA DE UNIÓN AL ARN DE EPIMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi*

Pérez, L.¹, Duhagon, M.A.¹, Dallagiovanna, B.¹, Robello, C.² y Garat, B.¹

¹Laboratorio de Interacciones Moleculares, Facultad de Ciencias, ²Laboratorio de Inmunología Básica, Facultad de Medicina, Facultad de Ciencias. UdelaROU. lperez@fcien.edu.uy

El ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* involucra diferentes estadios transcurriendo en dos huéspedes (vertebrado e invertebrado). En los tripanosomas la regulación de la expresión génica sucede principalmente a nivel post-transcripcional. En este trabajo presentamos la obtención de la secuencia completa de una proteína de unión al ARN. Dicha secuencia codifica para una proteína de 17 kDa (Tc17). Ensayos de Southern blot permitieron establecer que esta proteína está codificada por un gen de copia única. Se identificaron: la región 5'UTR, el sitio AG aceptor del miniexón y un tramo de polipirimidinas que posiblemente funcione como aceptor de la maquinaria de trans-splicing. El extremo 3' UTR no pudo ser delimitado. Analizando la secuencia genómica se observó que esa región puede formar estructuras secundarias complejas termodinámicamente favorables que podrían impedir la amplificación por RT-PCR. Mediante comparación con las bases de datos se determinó que la proteína es altamente homóloga con proteínas de unión al ARN conteniendo RRM. Para la obtención de la proteína recombinante, se clonó la secuencia completa en el vector pGEX. Se estudiaron las condiciones de inducción y se purificó la proteína recombinante Tc17-GST. Con la proteína recombinante se inoculó un conejo para obtener anticuerpo policlonal anti Tc17. El anticuerpo fue purificado en columna Affigel blue y fue usado para ensayos de Western blot con proteínas totales de diferentes estadios del parásito. El estudio de la funcionalidad de Tc17 se encuentra actualmente en curso, estudios preliminares indican que tiene una mayor afinidad *in vitro* por ribosondas polyC y polyG.

UN ENFOQUE PROTEÓMICO PARA EL ESTUDIO DE FACTORES DE VIRULENCIA EN *Trypanosoma cruzi*.

Piñeyro, D.¹, Parodi, A.¹, Durán, R.², Cerveñansky, C.², Prieto, V.¹, Arrambide, N.¹, Sánchez, V.¹, Cayota, A.¹, Pritsch, O.¹ y Robello, C.¹

¹ Unidad de Patología Molecular, Facultad de Medicina/Facultad de Ciencias, Montevideo-Uruguay.

² Unidad de Bioquímica Analítica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo-Uruguay.

Durante el ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*, el parásito alterna entre los hospedadores invertebrado y vertebrado presentando formas intracelulares y extracelulares. Con la invasión e internalización en las células del hospedador, los parásitos se exponen a una variedad de situaciones de estrés ambientales (oxidativo, pH, temperatura). Las moléculas de *T. cruzi* que participan en el establecimiento de la infección pueden ser consideradas como factores de virulencia, pues son capaces de permitir que los parásitos sobrevivan y proliferen dentro de sus hospedadores, así estableciendo y perpetuando las infecciones. En este estudio hemos puesto a punto un enfoque proteómico para identificar posibles factores de virulencia. Los principales resultados obtenidos han sido: Utilizamos las metodologías de electroforesis bidimensional y espectrometría de masa (MALDI-TOF) para construir un perfil 2D de las proteínas expresadas en el estadio epimastigota de *T. cruzi*. Utilizamos diferentes rangos de pH y analizamos el perfil peptídico de alrededor de 80 spots de proteínas, llegando a identificar 50 proteínas. Estos resultados nos han permitido obtener un mapa 2D preliminar de *T. cruzi*. Estudiamos diferentes condiciones de estrés, que mostraron diferentes patrones proteicos, tanto de respuesta general como específicos del tipo de estrés (pH, temperatura, oxidativo). Una de las proteínas involucradas en defensas antioxidantes, la triparedoxina peroxidasa fue clonada, purificada, cristalizada en su forma activa y su estructura fue resuelta a 2,8 Å. El modelaje molecular demostró que la triparedoxina peroxidasa es un decámero cuyo sitio activo está compuesto por dos residuos cisteína esenciales que están reducidos. Realizamos estudios enzimáticos demostrando que la enzima no sólo es activa con hidropéroxidos sino también con peroxinitrito.

Estos resultados muestran que la proteómica funcional y estructural pueden ser una herramienta muy útil para estudiar el ciclo de vida de este parásito y sus respuestas frente a situaciones de estrés. Las proteínas identificadas por esta metodología podrán ser candidatos para blancos de acción de fármacos.

Este trabajo fue financiado por CSIC (Universidad de la República, Uruguay) y por el Programa ECOS.

ACTIVIDAD COLINESTERASA CEREBRAL COMO BIOMARCADOR DE CONTAMINACIÓN POR PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS EN PECES DE LA CAÑADA DEL DRAGÓN (MONTEVIDEO, URUGUAY)

Pistone, G.¹, Maruri, A.¹, Eguren, G.², y Rodríguez-Ithurralde, D.¹

¹Unidad de Neurociencia Molecular y Farmacología, Instituto Clemente Estable (IIBCE). Avenida Italia 3318, 11600 Montevideo, Uruguay. FAX: (598 2) 487 5548. ²Facultad de Ciencias, UdelaR. E-mail: drit@iibce.edu.uy.

La contaminación por organofosforados (OP), provoca degradación de los ecosistemas acuáticos. Estos compuestos, utilizados intensivamente en fruticultura, se caracterizan por su alta toxicidad aguda y amplio espectro de acción. Actúan a nivel del sistema nervioso central y periférico interrumpiendo la transmisión nerviosa al inhibir las colinesterasas. El objetivo del presente trabajo es determinar la actividad colinesterasa cerebral en peces de la cañada del Dragón (Melilla) a fin de validar su uso como biomarcador molecular en el monitoreo de la contaminación acuática. El muestreo se realizó en setiembre 2001, en tres estaciones del curso principal que presentan un gradiente de intensidad frutícola ascendente hacia la desembocadura. Incluyó 18 bagre-anguilas (*Heptapterus mustelinus*), 16 mojarra (*Bryconamericus iheringi*) y 5 anguilas (*Synbranchus marmoratus*); luego de su decapitación, los cerebros fueron inmediatamente extraídos y congelados. La actividad colinesterasa se midió por el método espectrofotométrico de Karlsson *et al.* (1984) a 324 nm y 22°C. Nuestros resultados indican que la actividad específica de colinesterasa es mayor en *H. mustelinus* que en el resto de las especies y que no exhibe variaciones significativas entre estaciones de muestreo. *B. iheringi*, por el contrario, mostró diferencias significativas en la actividad colinesterasa entre peces de distintas estaciones, siendo mayor en la zona 1, la menos frutícola. Estos resultados señalarían a *B. iheringi* como especie más sensible a la contaminación por OP, ya que presenta diferencias en la actividad colinesterasa a lo largo de un gradiente de intensidad frutícola, dato que volvió a comprobarse en un muestreo realizado en setiembre de 2003.

REGULACIÓN DEL TRANSPORTE DE MANGANESO EN *Sinorhizobium meliloti* 1021.

Platero, R., Jaureguy, M., Amarelle, V., Vaz, P., Fabiano, E.

Laboratorio de Ecología Microbiana. IIBCE. Av. Italia 3318. Montevideo. Uruguay. Tel: 4871616 int 146.
E.mail: rufo@iibce.edu.uy

La concentración intracelular de metales de transición tales como el Fe y Mn, está controlada fundamentalmente mediante la regulación de su transporte a través de las membranas. Los sistemas bacterianos involucrados en el transporte de manganeso comprenden: transportadores del tipo NRAMP (Natural Resistance-Associated Macrophage Protein), transportadores del tipo ABC (ATP-Binding Cassette) y un transportador del tipo P encontrado en *Lactobacillus plantarum*. En el genoma de *Sinorhizobium meliloti* 1021 (una α -proteobacteria fijadora de nitrógeno) se han identificado genes homólogos a transportadores del tipo NRAMP (*smA_1115*) y ABC (*mnt_ABCD*). Con la finalidad de evaluar la funcionalidad del sistema MntABCD en la bacteria *S. meliloti* 1021 en vida libre y durante su interacción simbiótica con alfalfa, se clonó la región promotora del gen *mntA* delante del gen *gfp* contenido en un vector plasmídico de bajo número de copias. Para determinar la participación de la proteína Fur en su regulación, la construcción plasmídica se introdujo en la cepa salvaje y en una mutante carente del gen *fur* (Mf1). Demostramos que la expresión de MntA está regulada principalmente por la presencia de manganeso en el medio de cultivo y que la falta de este metal promueve su inducción. Aunque cuantitativamente menor, también pudo observarse una disminución de la expresión en presencia de Fe. Mostramos que la expresión de MntA está regulada a nivel transcripcional y depende de la presencia de un gen *fur* funcional. Los ensayos realizados en plantas infectadas con las cepas portadoras de las construcciones realizadas no fueron concluyentes obteniéndose resultados poco reproducibles debido quizás a la inestabilidad del vector utilizado en ausencia de presión selectiva.

ACTIVACIÓN DEL SISTEMA INMUNE EN VÍAS AÉREAS POR INMUNIZACIÓN INTRANASAL CON EXTRACTOS BACTERIANOS

Rial, A.¹, Lens, D.², Benkiel, H.³, Silva, J. S.⁴ y Chabalgoity, J. A.¹

¹ Lab. Investigación en Vacunas, Departamento de Desarrollo Biotecnológico, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. ² Laboratorio de Citometría y Biología Molecular, Departamento Básico de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. ³ Laboratorios I.R.A.S.A, Montevideo, Uruguay. ⁴ Departamento de Bioquímica e Inmunología, Facultad de Medicina de Ribeirao Preto, Universidad de San Pablo, Brasil.

Se ha demostrado que la estimulación no específica de las defensas pulmonares por administración repetida de inmunomoduladores tales como extractos bacterianos, colabora en la prevención de infecciones del tracto respiratorio. Por otro lado, se ha sugerido que la vía intranasal presenta varias ventajas con respecto a otras vías como la oral, en cuanto a la inducción de respuestas efectivas a nivel de mucosas. En particular, nosotros hemos trabajado con un extracto bacteriano coloidal, que se utiliza en nuestro país para el tratamiento de infecciones respiratorias recurrentes, y que además es de uso intranasal. En un modelo murino intranasal, vimos que 24 hrs. después de administrar la tercer dosis de este extracto bacteriano se observa un fuerte influjo de células dendríticas hacia el pulmón, existiendo una alta proporción de éstas que muestran fenotipo activado, determinado por una mayor expresión de moléculas co-estimuladoras (CD80 y CD86). También hemos analizado por RT-PCR la expresión de quemoquinas (QK) en pulmón, a las 4 y 24 hrs. después de la última dosis, observándose un fuerte aumento en la expresión del mRNA de varias QK, incluidas aquellas que se sabe están implicadas en el reclutamiento de células dendríticas (CCL3, CCL4). A su vez, pudimos demostrar el aumento en la expresión de otras QK como CXCL9 y CXCL10, tanto por RT-PCR como por Real Time PCR que se ha descrito están implicadas en el reclutamiento de células T hacia el pulmón, y en particular de linfocitos de tipo Th1. Otras QK que están claramente aumentadas en los animales inmunizados, son CXCL1 y CXCL2, que tienen fuerte actividad quimioattractante y estimuladora sobre leucocitos polimorfonucleares. Estos resultados, junto con otros obtenidos previamente, nos permiten comenzar a entender el efecto que este tipo de preparación provoca sobre el sistema inmune, y en particular a nivel pulmonar.

ESTUDIOS DE LA EXPRESIÓN DEL NGF UTERINO Y DE SU VINCULACIÓN A LOS FENÓMENOS DE PLASTICIDAD DE LA INERVACIÓN SIMPÁTICA.

Richeri, A.¹, Chalar, C²., Brauer, M.¹

¹Lab. Biología Celular, I.I.B.C.E., Montevideo, Uruguay. ²Dept. de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Montevideo, Uruguay.

La inervación uterina es dinámica y se modifica en respuesta a los niveles circulantes de hormonas sexuales. Sin embargo se desconocen los mecanismos que subyacen a estos fenómenos de plasticidad neuronal. Estudios recientes han evidenciado que los efectos de los estrógenos sobre la inervación uterina son mediados por cambios a nivel del efector, pero la naturaleza de las señales involucradas en el diálogo neurona-efector se desconocen. Una posibilidad atractiva es que las hormonas sexuales afecten la capacidad neurotrófica del útero. En este marco, en el presente trabajo se evaluó el efecto del tratamiento crónico con estrógenos sobre los niveles uterinos del factor de crecimiento nervioso (NGF). Dado que este tratamiento provoca una denervación completa del útero, sus efectos fueron comparados con los provocados por la simpatectomía química con guanetidina. Los niveles proteicos de NGF uterinos fueron medidos por ELISA y evaluados por inmunohistoquímica. Los niveles de ARNm fueron determinados por Northern blot e hibridación *in situ*. Estos estudios mostraron que: (a) el miometrio uterino sintetiza NGF, y su distribución no se ve afectada por los tratamientos; (b) tanto la simpatectomía como el tratamiento crónico con estrógenos inducen la síntesis de NGF en el útero. Estos resultados indican que la denervación uterina inducida por los estrógenos no es el resultado directo de una disminución en los niveles uterinos de NGF. Los datos obtenidos plantean preguntas acerca de los mecanismos que impiden que los nervios simpáticos respondan a niveles elevados de NGF en el tejido efector, como lo predice la hipótesis neurotrófica.

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES RELACIONADAS CON EL METABOLISMO DE HIERRO EN LA CEPA Z67 DE *Herbaspirillum seropedicae*.

Rosconi, F.¹, Platero, R.², González, M.², González, C.¹, Batista, S.¹, Gill, P.³ y Fabiano, E.²

¹ Depto. Bioquímica y ² Lab. Ecología Microbiana, IIBCE (Us.As. Fac. de Ciencias); ³ Lab. Tecnología Molecular, Fac. de Ciencias. E-mail: federh@iibce.edu.uy

Herbaspirillum seropedicae es una α proteobacteria, endófito de diversas plantas. En asociación con algunos cultivares de arroz, promueve el crecimiento vegetal debido a la reducción de N_2 mediante la acción de la nitrogenasa. Este complejo enzimático contiene alrededor de 40 átomos de Fe. A fin de elucidar los sistemas de adquisición de Fe en *H. seropedicae* y evaluar su contribución a la promoción del crecimiento vegetal, se realizó una mutagénesis generalizada con el transposón *miniTn5gusogfp*. Las transconjugantes fueron discriminadas de acuerdo a la producción de sideróforos en placas CAS. Se obtuvieron 5 mutantes que sobreacumulaban sideróforos y 20 que no producían halo en CAS. Los genes interrumpidos de tres de estas mutantes presentaron alta homología con *exbD* (gen que codifica para un componente del complejo Ton involucrado en el transporte de Fe), *acnA* (gen de la aconitasa A) y un posible gen codificante de la sulfito reductasa (*cysJI*). El gen *gusA* (β -glucuronidasa) contenido en el mini-transposón se insertó en el mismo sentido de transcripción que el de los genes interrumpidos en las mutantes. En la mutante *ExbD*⁻ (superproductora de halo en placas CAS), *gusA* es inducido al crecer la bacteria en medios con baja disponibilidad de Fe. Las mutantes *AcnA*⁻ y *CysJI*⁻ no produjeron halo en placas CAS y su expresión se ve reprimida en medios con bajo contenido en Fe. Basándonos en que la actividad nitrogenasa de esta bacteria se ve afectada por la disponibilidad de Fe (Klassen *et al.* 2003 FEMS Microbiol Lett, 255-259) se evaluará la capacidad de las mutantes de fijar N_2 y promover el crecimiento de plantas de arroz.

FUNCIÓN DEL GEN RAD17 (HRAD1) EN LA REPARACION DE ROTURAS DE DOBLE CADENA DEL ADN EN FASE ESTACIONARIA DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Sánchez, A., Keszenman, D., Candreva, E., Bracesco, N., Soria, S., Dell, M., Siede, W.* y Nunes, E.

Lab. de Radiobiología, Dpto.de Biofísica. Fac. Medicina y Fac. Ciencias, UDELAR. *Dept. Cell Biology and Genetics, Health Sci. Ctr., Forth Worth. North Texas Univ., USA.

En *Saccharomyces cerevisiae* el gen *RAD17* (hRAD1), forma parte de complejos PCNA-RFC, actuando en vías de transducción de señales de desestructuración del ADN en fases exponencial y estacionaria. Su posible función en la reparación de roturas dobles de ADN (DSB) está en investigación. Se analizaron dos poblaciones de *S.cerevisiae* diploides, isogénicas, en fase estacionaria: salvaje (*RAD+*) y *rad17/rad17*. Se utilizaron medios de cultivo convencionales y el radiomimético bleomicina (B:0.5–3?g/ml,1.5h,30°C). Parte de las muestras se expusieron a cicloheximida (CHM: 10?g/ml), incubándose en PBS con o sin glucosa (t:0-36 h). Se estimaron las probabilidades de muerte celular en f (t, B). Se aisló el ADN en bloques de agarosa, determinando roturas dobles mediante electroforesis con campos pulsados y procesamiento con densitómetro láser. El mutante *rad17/rad17* presentó degradación de ADN en condiciones de estrés oxidativo y de nutrientes, a altas tasas de muerte celular. En PBS con glucosa y a baja tasa de muerte celular, se produjo menor reparación de DSB en relación a *RAD+*, independientemente de exposición a CHM. *RAD+* exhibió fraccionamiento de ADN en f(B,t) y significativa reparación de DSB en PBS con o sin glucosa. Con CHM, el número de DSB aumentó significativamente. Se propone un modelo de inducción de la reparación recombinacional de DSB, con magnitud diferencial, según la tasa de lesión del ADN y retroalimentación positiva, en un circuito que comprende a Rad17 como sensor y efector y a vías de reparación constitutivas que actúan en red. (Se agradece a L. Blanc, PEDECIBA y Fogarty- NIH).

USO DE SISTEMAS DE SECRECIÓN TIPO III PARA LA EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS HETERÓLOGOS VEHICULIZADOS POR *SALMONELLAS* VIVAS ATENUADAS.

Schreiber, F.^{1,2}, Khan, C.M.A², Hormaeche, C.E.² y Chabalgoity, J.A¹.

¹ Laboratorio de Investigación en Vacunas, Depto. Desarrollo Biotecnológico, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina. ² Department of Microbiology and Immunology, Medical School, University of Newcastle upon Tyne, UK.

Salmonellas vivas atenuadas han sido ampliamente utilizadas como vehículo para la expresión de antígenos heterólogos, generando respuestas inmunes tanto contra antígenos propios como contra el antígeno heterólogo. La respuesta generada es predominantemente humoral, dado que *Salmonella* reside en el fagosoma de la célula a la cual infecta. Sin embargo, en ocasiones es necesaria una respuesta celular de tipo citotóxica. Es por ello que se investigó la posibilidad de fusionar un antígeno heterólogo a SseA, proteína perteneciente a uno de los sistemas de secreción tipo III de *Salmonella*, la cual es secretada por la bacteria hacia el citosol de la célula infectada. De esta forma, tanto SseA como el antígeno a ella fusionado serían procesados por la vía endógena siendo presentados en el contexto de MHC de clase I. En este trabajo se estudió la expresión y secreción de un fragmento de una proteína de *Echinococcus granulosus* por cepas atenuadas de *Salmonella*. Se utilizaron dos sistemas de expresión: el SseA y pTECH2 (control negativo de secreción). La expresión y secreción de EgA31 fue estudiada *in vitro* (lisados celulares y sobrenadantes de cultivo), por Western blot, e *in vivo* (infección de macrófagos peritoneales) por Western blot e inmunohistoquímica. Los resultados muestran que utilizando el sistema de expresión SseA, el antígeno heterólogo EgA31 es efectivamente secretado ya que se detectó su presencia tanto en el sobrenadante de cultivos de *Salmonella* conteniendo las construcciones, como en el citosol de macrófagos infectados con las mismas. No se detectó secreción de EgA31 utilizando el sistema pTECH2.

ANÁLISIS DEL EFECTO DE LOS TRECHOS [TG]_n EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN *T. CRUZI*.

Smircich, P.¹, Duhagon, M.A.¹, Dallagiovanna, B.¹ y Garat, B.¹

¹Laboratorio de Interacciones Moleculares, Facultad de Ciencias, UdelaR

La enfermedad de Chagas es causada por el protozoario *Trypanosoma cruzi*. Este parásito sufre grandes cambios durante su ciclo de vida, experimentando por tanto variaciones significativas a nivel de su expresión génica. A diferencia de lo que ocurre en otros eucariotas la regulación de la expresión se da fundamentalmente a nivel post-transcripcional. Las secuencias que intervienen en dicha regulación, así como los factores que las reconocen no han sido bien caracterizadas. Los motivos [TG]_n podrían constituir posibles blancos de proteínas regulatorias. La estrategia para estudiar el efecto de estas secuencias como elementos en *cis* capaces de regular la expresión génica, se basa en construir vectores de expresión e insertar los motivos [TG]_n en diferentes posiciones con respecto a la CDS. Transfectar luego estos vectores en epimastigotas de *T. cruzi* y evaluar los niveles del reportero en los diferentes casos. El vector elegido para realizar las transfecciones fue el pTEX. En este vector fueron insertadas las CDS de las enzimas Luciferasa y Cloramfenicol Acetil Transferasa (CAT), para su uso como genes reporteros. El correcto clonado de los motivos [TG]_n ha sido confirmado en las posiciones 5' intergénica y 5' UTR con respecto al gen *cat*, y en las posiciones 5' y 3' UTR con respecto al gen de la Luciferasa. Asimismo se ha puesto a punto la transfección de *T. cruzi*. Se han obtenido ya transfectantes para algunas de las construcciones antes mencionadas.

ASOCIACIÓN ENTRE POLIMORFISMOS DEL RECEPTOR DE LA VITAMINA D Y DIABETES MELLITUS INSULINO DEPENDIENTE.

Trujillo, J.⁽¹⁾, Mimbacas, A.^(1,2), Cardoso, H.⁽¹⁾, Gascue, C.⁽¹⁾, Javiel, G.⁽³⁾, Pisciotano, C.⁽⁴⁾, Jorge, A.M.⁽⁵⁾.

(1) Dpto. Citogenética, Instituto Investigaciones Biológicas Clemente Estable. (2) Dpto. Citogenética, U.A. Facultad Ciencias. (3) Unidad Diabetes, CASMU. (4) H.P.Rossell, (5) Unidad Diabetes, C. Galicia.

La diabetes tipo1 es una enfermedad multifactorial originada por la destrucción autoinmune de las células β del páncreas, de gran incidencia a nivel mundial. La vitamina D inhibe la producción de ciertas citoquinas, las cuales son factores para la diferenciación de los linfocitos T, actuando a través de su receptor: VDR. El gen VDR presenta polimorfismos que podrían estar relacionados con enfermedades autoinmunes mediadas por dichos linfocitos como la diabetes tipo1. En el presente trabajo, se analizaron los polimorfismos FokI y BsmI en 49 pacientes diabéticos y 82 individuos como control normal no relacionados entre si (Banco de ADN, Citogenética, IIBCE). Se utilizó la técnica de PCR-RFLP. Se uso el test de χ^2 para el análisis estadístico. Las frecuencias de genotipos de los polimorfismos para FokI y BsmI difieren significativamente entre ambos grupos ($p < 0.01$). De acuerdo a nuestros resultados, podríamos inferir que estos polimorfismos del gen VDR estarían asociados con la diabetes tipo1 en la población uruguaya y podría ser considerado como un indicador de susceptibilidad.

CONTROL BIOLÓGICO DE ENFERMEDADES DE IMPLANTACIÓN EN ALFALFA MEDIANTE EL USO DE *PSEUDOMONAS* FLUORESCENTES NATIVAS.

Yanes, M.¹, De La Fuente, L.², Arias, A.¹ y Altier, N.³

¹ Lab. Ecología Microbiana. IIBCE. Av. Italia 3318. Montevideo, Uruguay. ² USDA ARS, Washington State University. USA. ³ INIA-Las Brujas. Uruguay. E-mail: marialis@iibce.edu.uy

La alfalfa (*Medicago sativa* L.) es una leguminosa forrajera de importancia en los sistemas de producción agropecuarios del Uruguay. Las enfermedades causadas por patógenos del suelo, principalmente *Phytilium spp.*, afectan el establecimiento del cultivo. El control biológico mediante *Pseudomonas* fluorescentes nativas es una estrategia viable y poco agresiva para el ambiente. Una colección de *Pseudomonas* fluorescentes fue aislada de plantas sanas de alfalfa provenientes de distintas regiones del país. Se evaluó la actividad antagónica *in vitro* de todos los aislamientos contra *Phytilium debaryanum*, siendo positivos el 5.1% de los aislamientos de Colonia el 5% de Paysandú y el 25.5% de Tacuarembó. La presencia de genes involucrados en la síntesis de los antibióticos más estudiados en *Pseudomonas* fluorescentes se analizó mediante PCR. Solo el 5% de los aislamientos mostraron dichos loci biosintéticos. Se analizó la producción de biosurfactantes mediante el test de colapso de la gota. Los aislamientos que presentaron estos compuestos fueron 50% en Colonia, 80% en Paysandú y 32% en Tacuarembó. La capacidad de suprimir el damping-off *in vivo* frente a *Phytilium debaryanum*, se evaluó en 65 aislamientos donde 22 fueron capaces de aumentar significativamente la emergencia de las plantas de alfalfa. La diversidad genotípica de los aislamientos se analizó mediante rep-PCR utilizando primers BOX y ERIC. Se observaron distintos patrones con poca correlación entre los aislamientos de acuerdo a las características fenotípicas estudiadas. La identificación y caracterización de cepas antagónicas permitirán el desarrollo de inoculantes bacterianos los cuales tendrán un impacto positivo en el cultivo de la alfalfa.

Parcialmente financiado por IFS y Fondo "Clemente Estable"

LISTA DE AUTORES

A

Abreu, C. 21
Acosta, D. 22
Agrati, D. 35
Alonso, O. 49
Álvarez, A.D. 23
Alvarez, B. 49
Altier, N. 63
Alvite, G. 24, 25
Amarelle, V. 55
Arce, F. 26
Arnauld, C. 27
Arias, A. 27, 63
Arrambide, N. 53

B

Bajsa, N. 27
Bartesaghi, S. 28
Batista, F. 40
Batista, S. 58
Batista–Viera, F. 31, 38
Bedó, G. 35
Benkiel, H. 56
Bertone, A. 21
Blanco, N. 48
Bolotin-Fukuhara, M. 41
Borsani, O. 32

Bracesco, N. 60
Brauer, M. 57
Brena, B. 36, 38, 40
Britos, L. 47

C

Calliari, A. 29
Cancela M. 22
Canclini, L. 25
Candрева, E. 60
Carbo, A. 39
Cárdenas, M. 29
Cardozo, H. 34, 37, 62
Carmona, C. 22
Casaretto, E. 39
Castillo, E. 47, 48
Castro, S. 39
Cayota, A. 53
Cerveñansky, C. 53
Chabalgoity J. A. 56, 61
Chalar, C. 35, 57
Chifflet, S. 30, 50
Ciganda, M. 33
Correa, V. 30, 50
Corvo, I. 25
Cuadra, K. 31

D

Dallagiovanna, B. 33, 52, 61
Davyt, D. 27
De Boni, D. 49
De La Fuente, L. 27, 63
Delahodde, A. 41
Delgado, L. 49
Denicola, A. 28
Dell, M. 60
Díaz, P. 32
Duhagon, M.A. 33, 52, 61
Durán, R. 53

E

Echarte, L. 34
Eguren, G. 54
Ehrlich, R. 24, 25, 47, 48
Elizondo, V. 29
Esteves, A. 25
Esteves, E. 24

F

Folkes, L. 28
Fabiano, E. 57, 58
Fernández-Mancebo, V. 45
Ferrer-Sueta, G. 44
Ferreiro, M. J. 35

G

Gallino, J. 37
Garmendia, G. 36

Garat, M.F. 36
Garat, B. 33, 52, 67
Gascue, C. 37, 62
Giacomini, C. 38
Gianinazzi, S. 27
Gianinazzi-Pearson, V. 27
Gill, P. 58
González, C. 58
González, F. 39
González, M. 58
González, P. 40
Gorfinkiel, L. 21
Graña, M. 41
Grazú, V. 31
Greif, G. 23, 34, 42
Grieco, G. 39

H

Hannibal, L. Hannibal, L. 43, 44
Harispe, L. 45
Hormaeche, C. 24, 61

I

Irazoqui, G. 38

J

Javiel, G. 62
Jaureguy, M. 55
Jorge, A. M. 62

Justet, C. 50

K

Keszenman, D. 60

Khan, C. M. A. 61

L

Lalanne, A.I. 47, 48

Labandera, C. 39

Lemanceau, P. 27

Lens, D. 56

M

Manrique, G. 48

Márquez, A. 32

Marton, S. 29

Martínez-Drets, G. 39

Martínez, M. 49

Maruri, A. 26, 54

Maskell, D. 24

Mimbacas, A. 34, 37, 62

Monza, J. 32

N

Nin, V. 50

Noya, F. 43

Nunes, E. 60

O

Ovsejevi, K. 31

P

Parodi, A. 53

Peixoto, L. 39

Pereyra, S. 36

Pérez, E. 39

Pérez, L. 52

Pianzzola, M.J. 36

Piñeyro, D. 53

Platero, R. 55, 58

Pisciotano, C. 62

Pistone, G. 54

Prieto, V. 53

Pritsch, O. 53

Puppo, A. 29

R

Radi, R. 28

Ramón, A. 21

Rial, A. 56

Richeri, A.

Robello, C. 52, 53

Roche, L. 22

Rodríguez-Ithurralde, D. 26, 54

Rosconi, F. 58

Ruyechan, W. 33

S

Sánchez, A. 60
Sánchez, V. 53
Sanguinetti, C. 23, 34
Sans, M. 37
Schreiber, F. 61
Siede, W. 60
Silva, J. S. 56
Smircich, P. 61
Soria, S. 60
Sotelo, J. R. 23, 29
Sotelo-Silveira, J.R. 29

T

Tort, J. 22
Trujillo, M. 28
Trujillo, J. 62

V

Vargas, M. 35
Vaz, P. 55
Vero, S. 36
Vaz, P. 27
Vidal, S. 21

W

Wardman, P. 28
Williams, N. 33

Y

Yanes, M. 63

