

# ACTAS DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

VOLUMEN 1

## 1<sup>AS</sup> JORNADAS DE BIOQUIMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

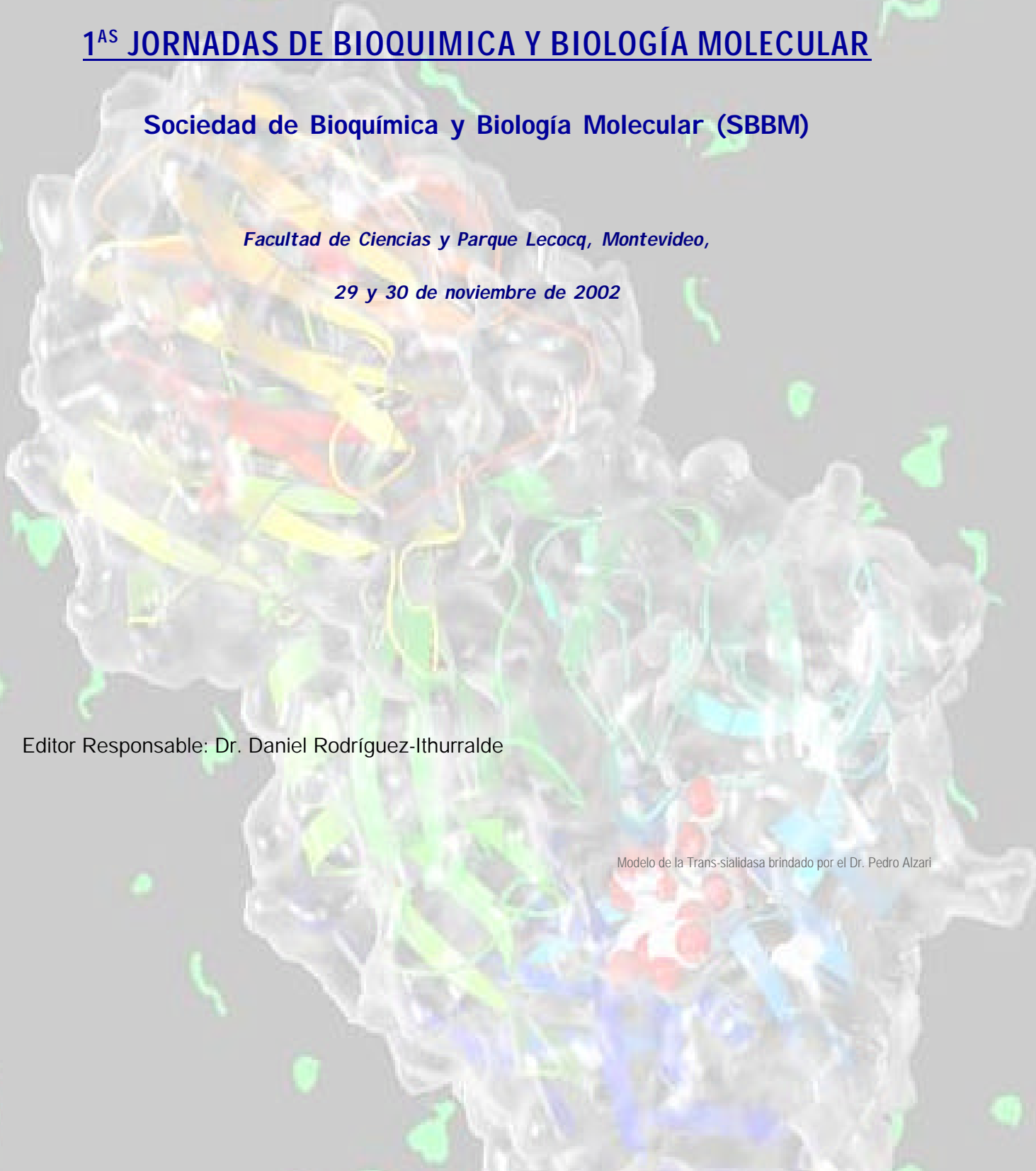
Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular (SBBM)

*Facultad de Ciencias y Parque Lecocq, Montevideo,*

*29 y 30 de noviembre de 2002*

Editor Responsable: Dr. Daniel Rodríguez-Ithurralde

Modelo de la Trans-sialidasa brindado por el Dr. Pedro Alzari



# **1<sup>as</sup> JORNADAS DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA** **MOLECULAR**

*Facultad de Ciencias y Parque Lecocq, Montevideo, 29-30 de noviembre de 2002*

## **Comité Organizador**

Ricardo Ehrlich  
Daniel Rodríguez-Ithurralde  
Juan Claudio Benech  
Leda Roche  
Leonor Thomson  
Carmen Manta  
Lisette Gorfinkiel  
Omar Borsani

## **Asistentes de Organización**

Adriana Maruri  
Miriam Barros

**Se agradece especialmente el patrocinio del**  
Programa AMSUD-Pasteur

# **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**

Lisette Gorfinkiel

Carmen Manta

Omar Borsani

## **COMITÉ CIENTÍFICO DE LAS 1AS JORNADAS**

Alicia Arias  
Cristina Arruti  
Ana Denicola  
Gustavo Folle  
Beatriz Garat  
Elsa Garófalo  
Eduardo Mizraji  
Jorge Monza  
Lucía Muxi  
Elia Nunes  
Eduardo Osinaga  
Rafael Radi  
José Roberto Sotelo

### **AUSPICIAN**

Instituto Clemente Estable (IIBCE)  
Facultad de Agronomía  
Facultad de Ciencias  
Facultad de Medicina  
Facultad de Veterinaria

### **AGRADECIMIENTOS**

Intendencia Municipal de Montevideo (IMM)  
Asociación de Estudiantes de Química  
Parque Lecocq  
Manzanares S.A.  
Palacio del Café  
Kraft Food



**SIMPOSIOS**

# Simposio 1

Comunicación inter e intracelular, Biología del Desarrollo y Glicobiología

**Moderadores: Cristina Arruti y Daniel Rodríguez-Ithurralde**

## **Flavio Zolessi**

Laboratorio de Cultivo de Tejidos, Sección Biología Celular, Facultad de Ciencias

"La proteína MARCKS en el desarrollo del sistema nervioso: un punto de encuentro entre vías de señalización intracelular"

## **José R. Sotelo Silveira**

Departamento de Biología Celular y Molecular, FC y Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto Clemente Estable (IIBCE)

"Caracterización de dominios ribosomales (placas peri-axoplásmicas) en axones mielínicos"

## **Silvia Olivera**

Laboratorio de Neurociencia Molecular y Farmacología, IIBCE

"Modulación de la neurotransmisión glutamatérgica por proteínas"

## **Teresa Freire**

Laboratorio de Oncología Básica y Biología Molecular, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina

"Bases Moleculares de la O-glicosilación simple en parásitos"

## **LA PROTEÍNA MARCKS EN EL DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO: UN PUNTO DE ENCUENTRO ENTRE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR**

*Zolessi, F.R. y Arruti, C.*

Laboratorio de Cultivo de Tejidos, Sección Biología Celular, Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

La proteína MARCKS ha sido señalada como centro de interacción de varias vías de transducción de señales. Es sustrato de proteína quinasas como PKCs, MAPKs y CdKs y se une a calcio-calmodulina, a actina-F y a PIP<sub>2</sub>. Hemos identificado una fracción fosforilada de MARCKS, exclusiva de neuronas, reconocida por un anticuerpo monoclonal generado en nuestro laboratorio: el Acm3C3. Mediante espectrometría de masa y usando péptidos sintéticos, identificamos el sitio de fosforilación reconocido por el anticuerpo como una serina ubicada en una secuencia consenso para quinasas dirigidas por prolina (PDKs). Encontramos que esta fosforilación de MARCKS es regulada durante el desarrollo, siendo evidente en neuronas desde muy poco después de su última mitosis. Durante la histogénesis de la retina neural, fosfo-MARCKS está presente en todas las capas, pero más tarde, en etapas finales del desarrollo (embrionario y post-natal), sufre una restricción a algunos tipos celulares. En los fotorreceptores observamos, además, una desaparición progresiva de MARCKS total. Tanto en neuroblastos como en células gliales de retina en cultivo, encontramos que MARCKS es muy abundante y se distribuye en parches en toda la superficie celular, que colocalizan con PIP<sub>2</sub>. Fosfo-MARCKS colocaliza con MARCKS total en neuroblastos, pero es indetectable en la glía. Finalmente, detectamos la presencia de MARCKS total y fosforilada en fracciones subcelulares enriquecidas en "rafts" de membrana. Nuestros hallazgos sugieren la existencia de un mecanismo de activación sostenida de PDKs, capaces de fosforilar MARCKS en neuronas, en un sitio que no parece afectar la relación de la proteína con la membrana.

## CARACTERIZACIÓN DE DOMINIOS RIBOSOMALES (PLACAS PERI-AXOPLÁSMICAS) EN AXONES MIELÍNICOS

*Sotelo Silveira, J.R.<sup>1,2</sup>, Calliari, A.<sup>3</sup>, Koenig, E.<sup>4</sup>, Sotelo, J.R.<sup>3</sup>*

<sup>1</sup> Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias

<sup>2</sup> Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto Clemente Estable

<sup>3</sup> Laboratorio de Proteínas y Ácidos Nucleicos, Instituto Clemente Estable

<sup>4</sup> Department of Physiology & Biophysics, SUNY at Buffalo, USA.

Los territorios citoplásmicos de una neurona son altamente dependientes de la síntesis de macromoléculas del soma neuronal. Sin embargo, los territorios dendrítico y axonal, poseen la capacidad de sintetizar ciertas proteínas localmente. En el caso del axón, dicha capacidad a sido demostrada por métodos bioquímicos. Sin embargo, el sitio o la distribución de la maquinaria traduccional en los axones permaneció elusiva hasta que Koenig & Martín (J.Neurosci.16:1400) describieron una nueva estructura, a la que llamaron “Placa Peri-Axoplásmica” (**PPA**), que poseía acúmulos de ARN y partículas tipo ribosomas. El objetivo del presente trabajo era la caracterización estructural y funcional de estos nuevos dominios axonales. Como modelo experimental se utilizaron “wholemounds” de axoplasma de axones mielínicos de vertebrados adultos (peces dorados, rata y conejo). Mediante aproximaciones inmunohistoquímicas se demostró que las PPA poseen ARN ribosomal y proteínas ribosomales. Utilizando hibridización in situ y RT-PCR se ha demostrado que en estos lugares se encuentra el ARNm codificante para la beta actina. ESTs generadas a partir de ARN de axón indicarían la presencia de ARN ribosomal, ARNm mitocondriales y varios ARNm citoplásmicos. La dinámica de las PPA fue analizada buscando las proteínas motores Miosina V, Kinesina y Dineina, mediante inmunohistoquímica. Hasta el momento se ha observado que las dos primeras se localizan en las PPA. Tomando estas evidencias en conjunto, es altamente probable que estas estructuras sean sitios de síntesis de proteínas axonales donde ocurre un intercambio dinámico con el axoplasma, tanto para localizar los elementos necesarios para la traducción como para redistribuir sus productos.

Apoyado por: PEDECIBA, CSIC, NSF.



## MODULACIÓN DE LA NEUROTRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA POR PROTEÍNAS EXTRACELULARES

*Olivera, S.*<sup>1</sup>, *Henley, J.M.*<sup>2</sup> y *Rodríguez-Ithurralde, D.*<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Neurociencia Molecular y Farmacología, Instituto Clemente Estable. Avenida Italia 3318, 11600 Montevideo, Uruguay. E-mail: drit@iibce.edu.uy

<sup>2</sup> MRC Centre for Synaptic Plasticity, University of Bristol, Inglaterra.

La estricta modulación del tránsito intracelular, inserción superficial y vida media de los receptores glutamatérgicos (GluRs) es clave para el desarrollo y la función del SNC. Aunque se conocen numerosas proteínas intracelulares responsables del reclutamiento y anclaje sináptico de los GluRs, los factores extracelulares que inician su agregación y facilitan la formación de las sinapsis centrales no han sido totalmente identificados. Dada la homología de la acetilcolinesterasa (AChE) con proteínas cruciales para la sinaptogénesis hemos propuesto que las acciones sinaptogénicas que se le atribuyen a la AChE podrían explicarse por interacciones con los GluRs. Empleando técnicas radioquímicas, quimeras adenovirus-GFP-GluR1-4, inmunocitoquímica con anticuerpos específicos y microscopía confocal, hemos demostrado que la AChE: (1) aumenta selectivamente el binding de agonistas a los receptores AMPA en forma dependiente de la concentración, región cerebral y etapa del desarrollo; (2) acelera su translocación y expresión dendrítica en neuronas en cultivo; (3) aumenta su expresión sináptica en neuronas postnatales; (4) incrementa la longitud y el número de dendritas en función de la concentración y el desarrollo; y (5) potencia significativamente la expresión de marcadores sinápticos. La interacción AChE-receptor AMPA que aquí reportamos podría ser un mecanismo molecular subyacente a los aumentos de expresión de los receptores AMPA que ocurren durante el “encendido” de las sinapsis silenciosas, la plasticidad sináptica dependiente de actividad, la formación de memoria y la neurotoxicidad. Nuestros resultados muestran además que la AChE posee acciones morfogénicas y sinaptogénicas que podrían explicarse por interacciones proteína-proteína con conocidas moléculas de adhesión neuronal.

Financiado por PEDECIBA Biología y MRC (UK)

## **BASES MOLECULARES DE LA O-GLICOSILACIÓN SIMPLE EN PARÁSITOS**

Freire, T.<sup>1</sup>, Robello, C.<sup>1</sup>, Casaravilla, C.<sup>2</sup>, Fernández, C.<sup>3</sup>, Carmona, C.<sup>2</sup>, Osinaga, E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina

<sup>2</sup>Unidad de Biología Parasitaria, Facultad de Ciencias

<sup>3</sup>Cátedra de Inmunología, Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay

Los parásitos infectan millones de personas en el mundo, causando a menudo afecciones crónicas asociadas con alta morbilidad. Por otra parte, algunos de ellos son altamente prevalentes en animales importantes para el sector productivo, produciendo pérdidas anuales estimadas en 10 mil millones de dólares. Los glicoconjugados juegan un papel crítico en la interacción de los parásitos con su huésped, por ejemplo, evadiendo la respuesta inmune, inhibiendo la proliferación celular T o promoviendo respuestas autoinmunitarias. Recientemente hemos obtenido la primera evidencia de la presencia de O-glicosilación incompleta (antígeno Tn) y de actividad UDP-GalNAc-peptidil N-acetilgalactosaminiltransferasa (ppGalNAc-T) en parásitos helmintos y protozoarios. El antígeno Tn (GalNAc-O-Ser/Thr), una de las estructuras más específicas asociadas a cáncer en humanos, se expresa en cadenas O-glicosídicas de las células cancerosas debido al bloqueo en la biosíntesis de las mismas. Las ppGalNAc-Ts son enzimas que atraen gran interés por ser las reguladoras del inicio de la O-glicosilación de proteínas. Algunas de estas enzimas podrían jugar un papel crítico para la vida celular, demostrándose que la ausencia de expresión de una ppGalNAc-T impide el desarrollo de la *Drosophila melanogaster*. La caracterización funcional de ppGalNAc-Ts individuales, así como la identificación de las secuencias peptídicas que constituyen sus sustratos naturales, debería aportar las bases para comprender la regulación de la biosíntesis de O-glicanos en parásitos helmintos. En la dilucidación de las bases moleculares del comportamiento parasitario se sustentan las expectativas de mejores diagnósticos y, particularmente, del desarrollo de tratamientos efectivos de estas enfermedades.

## Simposio 2

Fisiología bacteriana, Biotecnología y Tecnología de proteínas

**Moderadores: Elena Fabiano y Lucía Muxi**

### **Silvia Batista**

Departamento de Bioquímica, IIBCE, Unidad Asociada de Bioquímica, FC

"Expresión del transporte de ácidos dicarboxílicos en *Rhizobium tropici*"

### **Susana Castro**

Departamento de Bioquímica, IIBCE, Unidad Asociada de Bioquímica, FC

"Proteínas con múltiples sitios de unión a cobre en *Sinorhizobium*"

### **Karen Ovsejevi**

Cátedra de Bioquímica, Facultad de Química (FQ)

"Modificación química de proteínas: diferentes estrategias para la creación de grupos tiol y estructuras tiol-reactivas"

### **Laura Franco Fraguas**

Cátedra de Bioquímica, FQ

"Aplicaciones de las interacciones lectina-carbohidrato a la Biotecnología en fase sólida de glicocompuestos de alto valor agregado y a la búsqueda de lectinas en plantas autóctonas"

## EXPRESIÓN DEL TRANSPORTE DE ÁCIDOS C<sub>4</sub>-DICARBOXÍLICOS (ADCs) EN RHIZOBIUM TROPICI

Batista, S. y Martínez-Drets, G.

Depto. Bioquímica, IIBCE. Montevideo, Uruguay. Unidad Asociada a la Facultad de Ciencias. E-mail: [silvia@iibce.edu.uy](mailto:silvia@iibce.edu.uy)

Los rizobios pueden establecer asociaciones simbióticas con leguminosas. Durante este proceso, la planta forma nódulos radicales que alojan los rizobios diferenciándose como bacteroides. En la etapa culminante del programa de diferenciación, el bacteroide es capaz de reducir el N<sub>2</sub> a amonio. La planta incorpora el nitrógeno reducido y, como contrapartida, suministra al huésped con fuentes de energía y poder reductor. Los ADCs son una fuente esencial de nutrientes para los bacteroides, y mutantes incapaces de expresar la permeasa para ADCs (*dctA*), inducen nódulos inefectivos (Fix<sup>-</sup>). Las bacterias de *R. tropici* pueden asociarse con diversas leguminosas incluyendo *Phaseolus* y *Leucaena leucocephala*. Se construyó un mutante (GA1) de *R. tropici* CIAT899, incapaz de expresar el gen *dctA*. A diferencia de los mutantes *dctA* de otros rizobios, GA1 es capaz de crecer en succinato pero no en fumarato ni malato. El succinato es incorporado mediante un sistema activo secundario. La actividad de transporte aumentó al disminuir el pH, lo que sugiere que el succinato se transporta en forma de monoanión. En comparación con la cepa salvaje, GA1 expresa una reducida actividad nitrogenasa (Fix<sup>+</sup>). Por inserción del Tn5 en GA1, se aislaron dos mutantes incapaces de crecer en succinato. El análisis de secuencias de ADN, sugiere que el transposón se habría insertado en los genes *dctB* y *dctD*. Estos genes codifican un sistema regulador de dos componentes, responsable de la expresión del gen *dctA*. En este trabajo se discute la expresión del sistema alternativo para el transporte de succinato, y su posible importancia fisiológica.

Financiado por IFS, Suecia.

## PROTEINAS CON MULTIPLES SITIOS DE UNION AL COBRE EN *SINORHIZOBIUM*

Castro-Sowinski, S.<sup>1</sup>, Rosconi, F.<sup>1</sup>, Franco-Fraguas, L.<sup>2</sup>, Peixoto, L.<sup>1</sup>, Carbó, A.<sup>1</sup> y Martínez-Drets, G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica del IIBCE. Unidad Asociada a la Facultad de Ciencias. Av. Italia 3318, Montevideo-Uruguay. Email: [scs@iibce.edu.uy](mailto:scs@iibce.edu.uy);

<sup>2</sup> Cátedra de Bioquímica, Facultad de Química, CC 1157, Montevideo-Uruguay.

Las proteínas con múltiples sitios de unión al cobre (PMSCu) están ampliamente distribuidas tanto en bacterias, hongos, plantas como en mamíferos. En esta familia de proteínas se encuentran la laccasa, manganeso-oxidasa, ferroxidasa, proteínas de homeostasis a cobre, ceruloplasmina y ascorbato oxidasa. Se ha descrito que *S. meliloti* expresa una proteína de homeostasis al cobre (Reeve et al., 2002. Mol. Microbiol. 43, 981-991), una proteína con actividad del tipo laccasa (Castro-Sowinski, et al., 2002. FEMS Microbiol. Lett. 209, 119-125) y la enzima nitrito reductasa (Toffanin et al., 1996. Appl. Environ. Microbiol. 62, 4019-4025), todas con varios sitios de unión al cobre. La laccasa de *Sinorhizobium* se produce durante la fase de crecimiento estacionaria, cuando se agrega cobre al medio de cultivo, pudiendo oxidar varios sustratos orgánicos. Los estudios de electroforesis en condiciones nativa sugieren la presencia de varias isoenzimas. La purificación de esta enzima se realizó por cromatografía de afinidad mediante metales inmovilizados. La utilización de columnas de Cu-IDA-Sepharose y posterior electroforesis semi-preparativa permitió purificar las diferentes isoenzimas para su estudio de MS (MALDI-TOF). Los análisis en BLAST y de filogenia de varias PMSCu señalaron a una probable oxido-reductasa de rizobio como posible gen codificante de la laccasa. La construcción de un plásmido suicida pero movilizable al rizobio, con el gen interrumpido por un cassette con resistencia a kanamicina (derivado de Tn5) permitió la obtención de una mutante en este gen. Próximamente se realizarán estudios de MS y la caracterización exhaustiva del mutante.

## MODIFICACIÓN QUÍMICA DE PROTEÍNAS: DIFERENTES ESTRATEGIAS PARA LA CREACIÓN DE GRUPOS TIOL Y ESTRUCTURAS TIOL-REACTIVAS

Ovsejevi, K. <sup>1</sup>, Manta, C. <sup>1</sup>, Grazú, V. <sup>1,2</sup>, Cuadra, K. <sup>1</sup>, Betancor, L. <sup>1</sup> y Batista-Viera, F. <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cátedra de Bioquímica, Facultad de Química

<sup>2</sup>Unidad Asociada de Bioquímica, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias

Los grandes avances en el conocimiento de la estructura de proteínas han permitido desarrollar modificaciones químicas selectivas en las mismas. La modificación de la estructura de las proteínas se puede llevar a cabo mediante reacciones de óxido-reducción sobre grupos disulfuro de dichas macromoléculas. Los puentes disulfuro cumplen un rol fundamental en el mantenimiento de la estructura tridimensional de la proteína, debido a esto para evitar alteraciones mayores de la estructura nativa es imprescindible trabajar en condiciones moderadas y fácilmente controlables. De esta forma se busca afectar solamente aquellos disulfuros que no sean críticos para mantener la estructura y la actividad biológica de la proteína. En este trabajo se proponen dos alternativas para la modificación de proteínas: i) el uso de agentes reductores en fase sólida y ii) la formación de óxidos de disulfuro utilizando el agente oxidante monoperoxifalato de magnesio. La reducción se lleva a cabo con la finalidad de generar grupos tiol en la proteína. Dichos grupos son los más reactivos que se pueden encontrar en estas macromoléculas, debido a la gran nucleofilicidad del correspondiente ión tiolato. Por otro lado, cuando se oxidan proteínas que contienen grupos disulfuro con monoperoxifalato de magnesio, éstas adquieren la propiedad de unir tioles. Este es el caso de la queratina, proteína insoluble seleccionada por su alto contenido en grupos disulfuro y de las proteínas solubles inmunoglobulinas. La formación de estructuras tiol y tiol-reativas en biomoléculas posibilita la conjugación de las mismas mediante reacciones de intercambio tiol-disulfuro. Esta reacción es una forma especial de alquilación (S-alquilación), fácilmente reversible y por ello muy utilizada en cromatografía covalente. Estas proteínas modificadas son de gran utilidad para la preparación de bioconjugados con variadas aplicaciones biotecnológicas, por ejemplo: i) bioconjugados insolubles proteína-soporte ( $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* inmovilizada en agarosa) y ii) bioconjugados solubles proteína-proteína ( $\beta$ -galactosidasa-inmunoglobulina).

## **APLICACIONES DE LAS INTERACCIONES LECTINA-CARBOHIDRATO A LA BIOTECNOLOGÍA EN FASE SOLIDA DE GLICOCOMPUESTOS DE ALTO VALOR AGREGADO, Y A LA BUSQUEDA DE LECTINAS EN PLANTAS AUTOCTONAS**

*Franco Fraguas, L.*

Cátedra de Bioquímica, Facultad de Química, CC 1157, Montevideo, URUGUAY. E-mail: lfranco@fq.edu.uy

Las lectinas son proteínas que poseen al menos un dominio que interacciona específica y reversiblemente con carbohidratos. En forma inmovilizada, constituyen importantes herramientas para la purificación de glicocompuestos. Debido a su alto valor biotecnológico nos hemos interesado en el polisacárido capsular de la cepa 14 de *Streptococcus pneumoniae* (CPS-14), el cual constituye uno de los factores principales de virulencia de esta bacteria. Hemos utilizado adsorbentes comerciales para su purificación, logrando importantes resultados con lectina de soja (*Glycine max*) inmovilizada, optimizando la purificación del CPS-14 a escala de laboratorio (1). A efectos de reducir costos y mejorar las propiedades del adsorbente, hemos diseñado una estrategia completa de síntesis incluyendo la purificación por afinidad de la lectina a partir de harina de soja y su inmovilización en agarosa mediante procesos optimizados (2). Se han logrado buenos niveles de producción del polisacárido puro y las columnas pueden reutilizarse hasta 4 veces sin disminución de la capacidad. También estamos interesados en la búsqueda de posibles nuevas fuentes de lectinas en plantas autóctonas. Hemos analizado más de 30 extractos acuosos con varios resultados positivos. Dada la importancia económica de la producción de papa en nuestro país, se profundizó en los resultados obtenidos con extractos de *Solanum commersonii*, una especie salvaje tuberosa cuyo centro de distribución es nuestro país. Hemos purificado una lectina con especificidad para quito-compuestos, presente en extractos de tubérculos y de hojas. Actualmente estamos realizando su caracterización y evaluación de posible actividad antimicrobiana, particularmente contra *Ralstonia solanacearum*, un fitopatógeno de la especie cultivada.

(1) N. Suárez, L. Franco Fraguas, E. Texeira, H. Massaldi, F. Batista and F. Ferreira, *Applied Environm. Microbiol.*, 67, 2001, 969-971.

(2) L. Franco Fraguas, A. Plá, F. Ferreira, H. Massaldi, N. Suárez and F. Batista, *J. Chromatogr.*, 2002 (*en prensa*).

## Simposio 3

### Genética y Regulación de la expresión génica

#### Moderadores: Gabriela Bedó y Gustavo Folle

##### **Fernanda Agius**

Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía

"Identificación y caracterización de un gen responsable de la síntesis de vitamina C en frutos de frutillas"

##### **Adriana Parodi**

Sección Genética Evolutiva, Departamento de Biología Animal, FC

"Una nueva subfamilia de transportadores ABC de *Leishmania*"

##### **Adriana Geisinger**

Departamento de Biología Molecular, IIBCE

"Identificación y caracterización de genes diferencialmente expresados durante la meiosis"

##### **Silvia LLambí**

Departamento de Genética, Facultad de Veterinaria

"Enfoque citogenético-molecular de patologías hereditarias en bovinos"



## IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN GEN RESPONSABLE DE LA SÍNTESIS DE VITAMINA C EN FRUTOS DE FRUTILLA

*Agius, F. y Valpuesta, V.\**

Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de la República

\* Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Málaga, España

La frutilla es considerado un fruto no climatérico por su independencia del etileno en el proceso de maduración. Este motivo sumado a las características anatómicas particulares de este fruto han llevado que sea utilizado como modelo para la comprensión de los mecanismos bioquímicos y moleculares que se suceden durante la maduración de un fruto. El proceso de maduración esta programado en el desarrollo por un gran cantidad de genes los que intervienen tanto en la modificación de la propiedades físicas del fruto como ser el ablandamiento hasta propiedades químicas como la acumulación de compuestos relacionados con aroma o color. En este trabajo se utilizó como herramienta para aislar genes específicos de maduración una genoteca de expresión diferencial la que generó una serie de clones de cDNA que correspondían a mRNAs de específicos de maduración. Uno de los cDNA aislados corresponde a una gen con homología con aldoceto reductasas de plantas (FaALKE). Una caracterización bioquímica y molecular mostró que este gen participa en la ruta de síntesis de vitamina C en frutos de frutilla. La utilización de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresan el gen FaALKE demostró que se puede incrementar los contenidos de vitamina C de tejidos verdes. El análisis de actividad de la proteína mostró actividad específica para el ácido galacturónico lo que confirma resultados obtenidos hace 50 años donde se propuso una vía de síntesis de vitamina C en frutos de frutilla dependiente de la vía del ácido galacturónico.

## **UNA NUEVA SUBFAMILIA DE TRANSPORTADORES ABC DE *Leishmania*: CARACTERIZACION DEL GEN *LtrABC1.1*.**

*Parodi-Talice, A., Araujo, J.M., Torres, C., Pérez-Victoria, J.M., Gamarro, F. y Castanys, S.*  
Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra (C.S.I.C), Granada-España.  
E-mail: [apartal@fcien.edu.uy](mailto:apartal@fcien.edu.uy)

*Leishmania* es un protozooario tripanosomátido causante de la enfermedad denominada leishmaniasis. La quimioterapia empleada para combatir la enfermedad frecuentemente se enfrenta a casos de resistencia al tratamiento. Algunas de las proteínas del parásito que se han vinculado con procesos de resistencia pertenecen a la familia ABC. Hemos identificado en *Leishmania* un gen codificante de un transportador ABC relacionado con la subfamilia ABCA descrita en mamíferos. Miembros humanos de esta subfamilia se han relacionado con el transporte de colesterol y fosfolípidos. La caracterización molecular del gen de *Leishmania*, denominado *LtrABC1.1*, evidenció la existencia de una familia multigénica localizada en dos cromosomas de 1,2 y 0,6 Mb. El gen *LtrABC1.1* se encuentra duplicado en tandem sobre el cromosoma de mayor tamaño. Estudios de inmunolocalización demostraron que la proteína *LtrABC1.1* se encuentra principalmente en el bolsillo flagelar, la membrana plasmática y el flagelo. Estudios de acumulación de análogos de fosfolípidos en parásitos que sobreexpresan *LtrABC1.1*, indicaron que este transportador puede estar involucrado en la translocación de fosfolípidos a través de la membrana. Ensayos de infección de macrófagos mostraron que los parásitos que sobreexpresan *LtrABC1.1* fueron menos infectivos. Procesos tales como la exocitosis parecen estar alterados ya que la actividad fosfatasa ácida secretada fue significativamente menor en los parásitos que sobreexpresan *LtrABC1.1*. Estos resultados sugieren que este transportador ABC puede estar implicado en el movimiento de lípidos a través de la membrana y esta actividad puede afectar procesos tales como el tráfico vesicular y la infectividad.

## IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS DURANTE LA MEIOSIS

**Geisinger, A. y Wettstein, R.**

Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Unidad Asociada a la Facultad de Ciencias

La espermatogénesis es un proceso de diferenciación terminal complejo que puede ser descrito como la ejecución coordinada de al menos dos programas de expresión génica. El primero, que tiene lugar durante la meiosis, provee el aparato necesario para el apareamiento, recombinación y segregación que tienen lugar durante la meiosis; el segundo es responsable de los profundos cambios que ocurren durante la espermiogénesis. Con el objeto de identificar y caracterizar genes expresados diferencialmente durante la meiosis, hemos aplicado el "mRNA differential display" (DD; Liang *et al.*, 1993) para la comparación de ARN de poblaciones celulares altamente enriquecidas mediante elutriación en células meióticas (espermátocitos paquiténicos) y postmeióticas (espermátidas redondas) de rata. De un total de 94 bandas de expresión diferencial identificadas, 73,4% correspondió a espermátidas, y sólo 26,6% a células meióticas. Varias de estas bandas han sido analizadas y caracterizadas. En particular, nos hemos centrado en la caracterización de dos genes de expresión diferencial durante la meiosis, identificados mediante el DD. Uno de ellos dirige la síntesis de una gran proteína de transmembrana; anticuerpos contra esta proteína nos han permitido su identificación. El segundo codifica para una probable proteína de ubicación nuclear, portadora de un largo tramo de homoserinas, a la que hemos denominado SSRP-1. Se presentará la información disponible hasta el momento sobre ambos genes, postulando algunas ideas acerca de la posible función de los productos por ellos codificados durante la espermatogénesis.

Liang, P., Averboukh, L. and Pardee, A.B. (1993). *Nucleic Acids Res.* 21: 3269-3275

## **ENFOQUE CITOGÉNÉTICO-MOLECULAR DE PATOLOGÍAS HEREDITARIAS EN BOVINOS**

Llambí, S.

Área Genética, Facultad de Veterinaria. Montevideo. [sllambi@adinet.com.uy](mailto:sllambi@adinet.com.uy)

La aplicación de técnicas citogenéticas-moleculares ha permitido avanzar en el estudio del mapeo génico y análisis de variantes genéticas en bovinos. Una de las áreas de investigación que estamos desarrollando es el estudio de la fragilidad del cromosoma X, particularmente por su relación con alteraciones de la fertilidad y reordenamientos a nivel evolutivo. Mediante la realización de cultivos linfocitarios inducidos con afidicolina hemos identificado en este cromosoma 5 sitios de fractura, estableciéndose mediante bandeado RBG, el idiograma de fracturas en el cariotipo de bovinos de la raza Holando (Holstein). Mediante técnicas como la microdissección cromosómica, DOP-PCR, PRINS, se ha logrado avanzar en el estudio de estos sitios frágiles. La utilización de secuencias del gen FMR-1 humano en ADN de bovinos (secuencia AF323120, genbank) permitió detectar una homología del 87-89% identificándose la presencia del triplete CGG. Otra raza en estudio por su importancia como recurso genético son los bovinos criollos del Uruguay. En ésta se ha detectado la presencia de la translocación Robertsoniana 1/29. Actualmente se están realizando estudios moleculares con enzimas de restricción (MspI) en estos animales. Otro aspecto de estudio son las enfermedades hereditarias monogénicas, como la deficiencia en adhesión leucocitaria bovina (BLAD), la deficiencia en enzima uridina monofosfato sintasa (DUMPs) y la citrulinemia. Mediante PCR-RFLP en una muestra poblacional de bovinos Holando hemos detectado la presencia de portadores de BLAD con una frecuencia del alelo mutante de  $q=0.029$ . Para el DUMPs y citrulinemia no se han identificado hasta el momento la presencia de animales portadores.

FINANCIACIÓN : CSIC-UDELAR, AECI, CIDEF-FAC.VETERINARIA

## Simposio 4

### Patología Celular y Radicales Libres

#### Moderadores: Ana Denicola y Homero Rubbo

##### **Alicia De María**

Laboratorio de Cultivo de Tejidos, Secc. Biología Celular, FC

"Roles de la DNAasa I en el desensamblaje nuclear"

##### **Francisco Noya**

Laboratorio de Ecología Microbiana, IIBCE

"Modulación del ciclo celular por el *Papilomavirus* humano"

##### **Mercedes Navillat**

Cátedras de Reumatología y de Bioquímica, FM

"Formación de peroxinitrito en la respuesta inmune normal y en procesos inflamatorios"

##### **Leonor Thomson**

Laboratorio de Enzimología, Instituto de Química Biológica, FC

"Mecanismos de daño oxidativo y defensas antioxidantes en *Trypanosoma cruzi*"

##### **Gonzalo Peluffo**

Laboratorio de Radicales Libres, Depto. de Bioquímica, FM

"Rol de las poliaminas en el metabolismo de *Trypanosoma cruzi*"

## **DNasa I EN CÉLULAS DEL CRISTALINO BOVINO**

*De María, A. y Arruti, C.*

Laboratorio de Cultivo de Tejidos, Sección Biología Celular, Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

En el proceso de degradación nuclear que ocurre durante la diferenciación de las células fibras del cristalino la cromatina se condensa y fragmenta. Algunas actividades nucleasa descritas en este órgano exhiben similares características funcionales que la DNasa I. Nuestro interés se centró en determinar si alguna de ellas era la DNasa I así como su localización en las distintas poblaciones celulares del cristalino bovino adulto. Demostramos la presencia de ARN mensajeros de DNasa I en células epiteliales "in vivo" e "in vitro" (células BEL). Fracciones SDS-solubles de células BEL, epitelio y fibras, analizadas mediante zimogramas de nucleasas, mostraron la presencia de una banda de actividad de 30 Kda. Generamos sueros anti-DNasa I que en estas células reconocen un único polipéptido de 30 Kda. Las inmunodetecciones "in situ" mostraron que en células BEL la DNasa I está presente en el retículo endoplásmico, aparato de Golgi y vesículas de secreción. En el epitelio del cristalino la enzima es citoplásmica y en las protofibras está acumulada en la región perinuclear. En las fibras la DNasa I se ubica en la periferia nuclear, ingresando al núcleo en las fibras profundas muy diferenciadas. En estos núcleos la lámina nuclear aún está presente aunque con perforaciones. Cortes en el ADN con extremos 3'OH libres, detectables por la técnica TUNEL, aparecen en núcleos en los que no quedan restos de lámina nuclear y la cromatina está muy compactada. Postulamos que la DNasa I es una de las enzimas involucradas en la fragmentación del ADN durante la diferenciación de las fibras del cristalino.

## **MODULACIÓN DEL CICLO CELULAR POR EL PAPILOMAVIRUS HUMANO**

*Noya, F., Balagué, C., Chien, W., Broker, T.R. y Chow, L.T.*

Department of Biochemistry and Molecular Genetics,  
University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL 35294, EEUU.  
E-mail: [fnoya@geocom.com.uy](mailto:fnoya@geocom.com.uy)

El ciclo de vida productivo del papilomavirus humano (HPV) tiene lugar en el epitelio escamoso completamente diferenciado. En el 99% de los cánceres de cerviz uterina se puede detectar la presencia de HPV. La proteína viral E7 es la principal oncoproteína del virus y es responsable de reactivar la síntesis de ADN en los queratinocitos post-mitóticos diferenciados para permitir la amplificación del ADN viral. Este proceso requiere la activación de genes regulatorios del ciclo celular, como por ejemplo la ciclina E, y pone en marcha nuevas e intrigantes interacciones entre el virus y su huésped. Dos poblaciones de queratinocitos se distinguen en lesiones benignas de HPV: una está compuesta por células activas en la síntesis de ADN, mientras que la otra está representada por células que acumulan altos niveles de ciclina E y del inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas (CKI) p21cip1. El ADN viral se amplifica en la primera población de células, mientras que es incapaz de hacerlo en la segunda población. En primer término, este estudio apunta a comprender las bases moleculares de esta dicotomía y abrir puertas a nuevas posibilidades terapéuticas que potencien este mecanismo de defensa antiviral innato. En segundo término, presentamos el diseño y evaluación de un agente terapéutico oncolítico basado en adenovirus condicionalmente replicativos que explota el conocimiento acumulado sobre la biología molecular de HPV y sus interacciones con el huésped.

## FORMACIÓN DE PEROXINITRITO EN LA RESPUESTA INMUNE NORMAL Y EN PROCESOS INFLAMATORIOS

Naviliat, M

Cátedras de Reumatología y Bioquímica, Facultad de Medicina.

El peroxinitrito es una molécula fuertemente oxidante y nitrante, formada por la reacción entre el anión superóxido y el óxido nítrico, capaz de producir lesiones moleculares por oxidación, por ejemplo de tioles no proteicos, metioninas, fosfolípidos de membranas, y ADN y mediante nitración de tirosinas y fenilalaninas. Diferentes tipos celulares como por ejemplo los macrófagos activados, neutrófilos, motoneuronas y células endoteliales son capaces de producirlo. Su formación ha sido demostrada durante diferentes procesos patológicos como sepsis, aterosclerosis, enfermedades neurodegenerativas, autoinmunes e infecciosas. Estudiamos los efectos y la formación de peroxinitrito durante la respuesta inmune normal y durante procesos inflamatorios. En la respuesta inmune, evaluamos la formación de peroxinitrito *in vivo* e *in vitro*, así como sus efectos sobre la proliferación y supervivencia de linfocitos T (LT). Nuestros resultados demuestran que, mediante la nitración de tirosinas, el peroxinitrito es capaz de inhibir la proliferación de LT y de producir su muerte apoptótica. Observamos también que *in vitro*, durante la activación inmune, los macrófagos son capaces de producirlo y que *in vivo* es generado durante la respuesta inmune normal. Tomamos como modelo de proceso inflamatorio la enfermedad de Chagas experimental. Demostramos que el peroxinitrito participa en el control de la parasitemia y es formado durante la carditis aguda. Estos resultados argumentan a favor de un papel inhibitorio del peroxinitrito durante la respuesta inmune fisiológica y de mediador clave en las lesiones celulares y tisulares secundarias a procesos inflamatorios.



## EL SISTEMA TRIPANOTIONA-TIOL EN *TRIPANOSOMA CRUZI* COMO MECANISMO ANTIOXIDANTE CLAVE CONTRA LA TOXICIDAD MEDIADA POR PEROXINITRITO

Thomson, L.<sup>1</sup>, Denicola, A.<sup>2</sup> y Radi, R.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Enzimología, Facultad de Ciencias

<sup>2</sup>Fisicoquímica Biológica, Facultad de Ciencias

<sup>3</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República.

Peroxinitrito, el producto de reacción entre superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y óxido nítrico (NO), es un potente oxidante que contribuye a la actividad macrofágica contra diferentes patógenos. En este contexto, peroxinitrito juega un rol importante en el control de la infección por *Trypanosoma cruzi*. Los sistemas antioxidantes del *Trypanosoma cruzi* son limitados, con la mayor parte de su capacidad antioxidante dependiente de un arreglo particular de enzimas/proteínas que incluye a la tripanotiona reductasa, triparedoxina y triparedoxina peroxidasa y que involucra la participación del ditiol de bajo peso molecular tripanotiona ( $N^1, N^8$ -bis-(glutathionil)-espermidina). En este estudio demostramos que la dihidrotriptanotiona es consumida efectivamente durante el ataque por peroxinitrito a las células parasitarias para dar el disulfuro correspondiente. Glutathión, presente en *T. cruzi* en menor concentración que tripanotiona fue menos afectado y evolucionó fundamentalmente a disulfuros mixtos glutathión-proteína. Diamida, que depletó significativamente (>70 %) las células de dihidrotriptanotiona, aumentó considerablemente la nitración de proteínas intracelulares y reforzó la inhibición del crecimiento celular inducida por peroxinitrito. En conjunto, nuestros resultados sustentan el rol clave de la dihidrotriptanotiona y del sistema antioxidante parasitario dependiente de tripanotiona contra uno de los productos fundamentales de la activación macrofágica, peroxinitrito.

## **ROL DEL METABOLISMO DE LAS POLIAMINAS EN *TRYPANOSOMA CRUZI***

*Peluffo, G., Piacenza, L. y Radi, R.*

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República [gonzapel@fmed.edu.uy](mailto:gonzapel@fmed.edu.uy)

Las poliaminas putrescina, espermidina y espermina participan en una gran variedad de procesos celulares en la biología de *Trypanosoma cruzi* como empaquetamiento y estabilización del ADN, proliferación y diferenciación celular, procesos de regulación de la expresión y síntesis de macromoléculas. La ornitina a través de la ornitina descarboxilasa (ODC) es la principal fuente de putrescina y por consiguiente de poliaminas en la mayoría de los organismos estudiados. *T. cruzi*, a diferencia de otros trypanosomatídeos, carece de ODC. La arginina y la agmatina actúan como precursores de la síntesis de poliaminas en bacterias y plantas. Si bien existe controversia sobre la presencia de esta vía dependiente de arginina en *T. cruzi*, ha sido demostrada la participación de la arginina y agmatina en ensayos de infección a macrófagos y en la modulación de la muerte apoptótica inducida por suero humano fresco. Ensayos de infección a macrófagos por trypomastigotas, muestran que la proliferación intracelular de los parásitos es modulada por los niveles de poliaminas en el macrófago. Mas aún, la presencia de linfocitos T apoptóticos o TGF- $\beta$  estimula la producción macrofágica de poliaminas, favoreciendo la proliferación intracelular de los amastigotas. La intrincada interrelación de las vías de síntesis de poliaminas en la célula huésped y en el parásito así como la muerte apoptótica del trypanosoma, podrían ayudar a explicar como *T. cruzi* evade la acción del sistema inmune durante la infección aguda.



**POSTERS**

## ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LA HIDROFOBICIDAD Y LA GENERACIÓN DE RESISTENCIA EN AGENTES ANTIBACTERIANOS DE BACTERIAS GRAM (-)

Acevedo, A.<sup>1,2</sup>, Borthagaray, G.<sup>1</sup>, Paulino, M.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Microbiología Clínica, Cátedra de Microbiología. Facultad de Química, Montevideo, Uruguay

<sup>2</sup> Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias

<sup>3</sup> Grupo de Modelado Biomolecular, Facultad de Química

Las bacterias Gram (-) son más resistentes que las bacterias Gram(+) a los inhibidores lipofílicos y anfifílicos, entre los que se incluyen colorantes, detergentes, ácidos grasos y antibióticos. Esta resistencia puede explicarse debido a la presencia en las bacterias Gram (-) de una membrana externa con gran proporción de lipopolisacáridos que disminuye la difusión transmembrana de los solutos lipofílicos, a la destrucción enzimática de los betalactámicos en el espacio periplásmico y a que poseen sistemas de eflujo activo mono o multidroga. Una de las hipótesis es que los transportadores capturan el sustrato desde la membrana citoplasmática, el que luego es extruído de la célula bacteriana. En particular en *Neisseria gonorrhoeae* se ha demostrado la presencia del sistema de eflujo multidroga MtrCDE, cuyos sustratos son Tritón X-100, cristal violeta, ácidos grasos, penicilina G, tetraciclina, eritromicina y azitromicina. Tenemos evidencias que sugieren la implicancia del sistema MtrCDE en la extrusión de otros antibióticos. Según la hipótesis de captura desde la membrana citoplasmática, estas drogas deberían ser hidrofóbicas o tener alguna región hidrofóbica. En consecuencia, el objetivo de este trabajo es realizar un análisis de la relación entre la hidrofobicidad y la actividad de las sustancias mediante un análisis químico-computacional. En primera instancia se realizó el modelado molecular de dichas sustancias mediante el programa Hyperchem 6.0. Luego, se midió la hidrofobicidad (logP) usando el algoritmo de Ghose, Pritchett y Crippen (J. Comp. Chem. **9**(1), 80-90 (1988)). Finalmente se estudió la relación entre la hidrofobicidad de las estructuras y sus fragmentos y la sensibilidad de estas sustancias en cepas isogénicas con y sin el sistema de eflujo.

## ESTUDIOS DE DEGRADACIÓN DEL COLORANTE REMAZOL BRILLIANT BLUE

*Alborés, S., Cerdeiras, M. P.*

Cátedra de Microbiología, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. E-mail: salbores@fq.edu.uy

Hace tiempo que se conoce la habilidad de los hongos de la podredumbre blanca de la madera de decolorar un amplio rango de colorantes. Se han utilizado colorantes poliméricos para detectar actividad ligninolítica al ser de estructura similar a la lignina. Este complejo sistema enzimático sigue siendo estudiado, pues existen numerosas aplicaciones potenciales para estos biocatalizadores. La gran mayoría de estos estudios de decoloración se han realizado utilizando el cultivo entero del hongo en estudio, siendo la principal limitación de dicho sistema la lentitud con la cual transcurre la decoloración. Al mismo tiempo, el volumen del efluente aumenta con la generación de biomasa. Tampoco se conocen los metabolitos intermediarios producidos. En el presente trabajo se plantea el estudio de la decoloración del Remazol Brilliant Blue (RBB), colorante importante industrialmente como *sinton* en la producción de colorantes poliméricos. Es un derivado antracénico y representa a un tipo de contaminante generalmente tóxico y recalcitrante. Se estudió asimismo la degradación de estructuras químicas más sencillas, y precursores del RBB para intentar elucidar la vía de degradación de este último. Los ensayos de degradación se realizaron con extracto de actividad enzimática conocida con o sin el agregado de cofactores. Los intermediarios utilizados fueron: antraquinona, 1-aminoantraquinona, 1,4-diaminoantraquinona y acid blue 25. Los resultados obtenidos fueron promisorios, al obtenerse una velocidad de degradación de RBB de  $3 \times 10^{-6}$  mM/s. Los estudios de degradación de intermediarios permiten plantear una aproximación a la vía de degradación del compuesto antracénico.

## RELACION ESTRUCTURA ACTIVIDAD PARA O-NAFTOQUINONAS TRIPANOCIDAS

*Alvareda Migliaro, E.M.<sup>1</sup>, Garcia Otero, A.<sup>1</sup>, Iribarne, F.<sup>1</sup>, Stoppani, A.O.M.<sup>2</sup> y Paulino, M.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Cátedra de Química Cuántica, Facultad de Química. Grupo de Farmacología Molecular y Modelado Biomolecular. Montevideo. Uruguay.

<sup>2</sup> CIBIERG. Facultad de Medicina, Buenos Aires, Argentina.

Las quinonas son una clase de moléculas con gran importancia biológica, muy reactivas por su capacidad para reacciones de oxidorreducción, inhibir el transporte de electrones y la lipoperoxidación microsomal hepática. Entre ellas se encuentran las o-naftoquinonas con actividad citotóxica y en especial la  $\beta$ -lapachona, sus análogos, la  $\alpha$ -lapachona y las mansononas que son inhibidores del crecimiento de tripanosomatídeos. Las o-naftoquinonas actúan por un mecanismo redox en el cual forman la semiquinona que es un intermediario esencial produciendo oxi-radicales citotóxicos que en un paso posterior se transforman reversiblemente en hidroquinonas. El objetivo de en éste trabajo es analizar el estado activo de una población de o-naftoquinonas, analizando sus diferentes estados electrónicos como quinonas neutras, hidroquinonas o radicales. Para ello se correlacionarán las propiedades estructura-actividad por un tratamiento extratermodinámico en donde se considera que cada parte de la molécula ejerce una determinada influencia sobre las constantes de equilibrio y la velocidad de la reacción, debido a variaciones en la densidad electrónica y a efectos estéricos y/o lipofílicos. Los parámetros usados fueron la energía del primer orbital molecular no ocupado (LUMO); la probabilidad de densidad electrónica de cada uno de los centros atómicos de cada molécula ( $f_N$ ); la misma propiedad normalizada respecto al LUMO (densidad frontera  $F_N$ ) y la carga parcial neta para cada átomo ( $Q_a$ ). Las propiedades electrónicas calculadas y las actividades químicas se presentan en una tabla y el análisis extratermodinámico cuantitativo (QSAR) se realiza mediante un análisis de componentes principales (PCA).

## INACTIVACIÓN DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA DE COBRE Y ZINC (CuZnSOD) POR EL PEROXINITRITO

Alvarez, B.<sup>1</sup>, Demicheli, V.<sup>1</sup>, Duran, R.<sup>2</sup>, Trujillo, M.<sup>3</sup>, Cerveñansky, C.<sup>2</sup> y Radi, R.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Enzimología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República (UdelaR), Uruguay

<sup>2</sup> Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE)

<sup>3</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina (UdelaR).

La CuZnSOD, enzima citosólica que cataliza la dismutación de superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) a peróxido de hidrógeno y oxígeno está vinculada a la esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad neurodegenerativa en la cual el peroxinitrito, producto de la reacción entre los radicales óxido nítrico y superóxido, también tendría un rol. Para investigar las interacciones de la CuZnSOD humana con el peroxinitrito se expresó un plásmido que codifica la CuZnSOD humana "wild type" (donado por el Dr. J. Beckman) en *E. coli*, y se purificó la enzima recombinante. Cuando la CuZnSOD fue expuesta a peroxinitrito, su actividad decayó en forma creciente al aumentar la concentración de peroxinitrito, necesitándose  $\approx 100 \mu\text{M}$  de peroxinitrito para inactivar 50% de CuZnSOD ( $5 \mu\text{M}$ ). Tanto el  $\text{NO}_2^-$  como el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , posibles contaminantes del peroxinitrito, protegieron a la CuZnSOD de la inactivación. La inactivación fue mayor a pH alcalino, lo que sugiere que la especie reactiva es el anión peroxinitrito. Se determinó la constante de segundo orden de la reacción directa entre el peroxinitrito y la CuZnSOD utilizando un espectrofotómetro de flujo detenido, encontrándose un valor de  $(9.4 \pm 1.0) \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  por monómero a pH 7.5 y 37 °C. Radicales secundarios formados a partir del peroxinitrito ( $\text{OH}^\cdot$ ,  $\text{NO}_2^\cdot$ ,  $\text{CO}_3^{\cdot-}$ ), también fueron capaces de inactivar la enzima. Se están estudiando por espectrometría de masa y resonancia paramagnética electrónica (EPR) las modificaciones introducidas por el peroxinitrito en la cadena polipeptídica, como ser la nitración de aminoácidos críticos y la formación de radicales proteicos.

## **NUEVO RECEPTOR DE ESTRÓGENOS BETA EN EL CÁNCER MAMARIO. ¿VÍA ALTERNATIVA DE REGULACIÓN HORMONAL?**

*Artagaveytia, N.<sup>1,2</sup>, Poggio, R.<sup>2</sup>, Manrique, G.<sup>2</sup>, Alvite, G.<sup>2</sup>, Román, E.<sup>2</sup>, Alonso, I.<sup>4</sup> y Garófalo, E.-G.<sup>3,2</sup>*

<sup>1</sup>Depto. Básico de Medicina y <sup>2</sup>LOBBM, Facultad de Medicina

<sup>3</sup>Depto. Bioquímica, Facultad de Veterinaria

<sup>4</sup> Servicio de Curieterapia, Centro Hospitalario Pereira Rossell. E-mail: nartagave@fmed.edu.uy

Recientemente se ha clonado un nuevo Receptor de Estrógenos, llamado Beta (RE- $\beta$ ) cuyo rol en el desarrollo del cáncer mamario aún no está definido. Nuestro objetivo fue identificar por RT-PCR el RE- $\beta$  en tumores mamarios malignos y analizar su relación con el RE tradicional (RE-a) y con el Receptor de Progesterona (RP, estrógeno-dependiente). Se analizaron 45 biopsias de cáncer mamario humano. En las mismas muestras se estudiaron además los transcritos de RE-a y de RP. Los ARNm de RE- $\beta$ , RE-a y RP se detectaron en el 58%, 76% y 66% de los casos, respectivamente. El 43% de los tumores estudiados co-expresaron RE- $\beta$ /RE-a, el 16% expresaron sólo RE- $\beta$ , el 32% sólo RE-a, y el 9% ningún receptor. Las proteínas RE y RP se detectaron por técnica de radioligando ( $\approx 10$  fmoles/mg) en el 71% y 48% de los tumores respectivamente. En estudios previos (n=143) encontramos una correlación positiva entre los niveles del ARNm-RE-a y de proteína-RE ( $p=0.0001$ ). Por el contrario, el ARNm-RE- $\beta$  se asoció en forma inversa con RE (77 vs 67%). Por otra parte, encontramos una correlación positiva entre las proteínas RE y RP ( $p=0.012$ ) así como entre sus transcritos (RE-a-RP) ( $p=0.006$ ). Sin embargo, RE- $\beta$  se asoció en forma inversa con RP (75 vs 64%). Asimismo, al analizar los diferentes fenotipos RE/RP se observó que la presencia de RE- $\beta$  era mayor cuando uno o ambos receptores eran negativos. El nuevo RE- $\beta$ , cuya expresión y función reguladora parecen ser diferentes del RE-a, plantea interrogantes sobre el rol de los estrógenos en carcinogénesis mamaria y constituye un elemento importante hacia el cual dirigir las investigaciones para la prevención y tratamiento del cáncer así como para el desarrollo de nuevos fármacos.



## ALTERACIONES MOLECULARES VINCULADAS AL PROCESO DE TRANSFORMACIÓN MALIGNA DE LA GLÁNDULA MAMARIA E IMPLICANCIAS EN LA EVOLUCIÓN CLÍNICA DEL CÁNCER MAMARIO

*Artagaveytia, N.*<sup>1,2</sup>, *Román, E.*<sup>2</sup>, *Nappa, A.*<sup>2</sup>, *Poggio, R.*<sup>2</sup>, *Manrique, G.*<sup>2</sup>, *Alvite, G.*<sup>2</sup>, *Alonso, I.*<sup>4</sup>, *Sabini, G.*<sup>5</sup> y *Garófalo, E.G.*<sup>3,2</sup>

<sup>1</sup> Depto. Básico de Medicina y <sup>2</sup> LOBBM, Facultad de Medicina, Montevideo, Uruguay

<sup>3</sup> Depto. Bioquímica, Facultad de Veterinaria

<sup>4</sup> Servicio de Curieterapia, Centro Hospitalario Pereira Rossell

<sup>5</sup> Servicio de Oncología Clínica, Hospital de Clínicas. E-mail: nartagave@fmed.edu.uy

Las alteraciones en la regulación de las vías de proliferación y apoptosis celular, contribuyen al desarrollo del cáncer mamario. En un primer enfoque abordamos el estudio de la vía endócrina (Estrógenos, Progesterona) y su interrelación con la vía parácrina mediada por el receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (REGF). Se determinaron por técnica bioquímica de “binding” los receptores de estrógenos (RE) y de progesterona (RP) y el REGF, siendo el RE positivo en el 71% de los casos y el RP en el 47% (n=512). Se encontró una correlación directa entre los niveles de RE y RP (p<0.0001) e inversa entre los niveles de REGF y RE (p<0.0011) y RP (p<0.018), sugiriendo que la pérdida de la hormono-sensibilidad tumoral favorece el predominio de las vías parácrinas. Hemos introducido el estudio del Receptor de Estrógenos beta (RE- $\beta$ ), por RT-PCR, encontrándose el transcrito en el 59% de los casos (N=80). El RE- $\beta$  está presente en los tumores que no expresan el RE tradicional (RE- $\alpha$ ), así como en los que expresan el REGF, lo que plantea interrogantes sobre el complejo rol de los estrógenos en la carcinogénesis mamaria. Dentro de los factores pro-apoptóticos, analizamos el gen p53 por PCR-SSCP. Se encontraron cambios del patrón electroforético en 27/117 (23%) de los tumores. La secuenciación de algunas muestras mostró mutaciones ubicadas en la región de unión al DNA. Estas estarían modificando sitios críticos de reconocimiento o elementos que colaboran con el posicionamiento de la proteína y por lo tanto alterando la función de p53. Desde el punto de vista clínico, el RE se comportó como un parámetro predictor de recaídas (p=0.011) y de muertes (p=0.03) por la enfermedad. La presencia de mutaciones de p53 se perfila como un indicador de mal pronóstico en etapas precoces de la enfermedad (25% vs 7% gen no mutado).

FINANCIACIÓN: PEDECIBA, CHLCC, CSIC, ROCHE INT.-FUNDACIÓN MANUEL PEREZ

## **CORRELACION ENTRE LA SÍNTESIS DE ARN Y EL GRADIENTE DE $\text{Ca}^{2+}$ DEL ESPACIO PERIPLÁSMICO DEL ENVOLTORIO NUCLEAR EN NÚCLEOS AISLADOS**

*Benech, J.C.*<sup>1,2</sup>, *Escande C.J.*<sup>1,2</sup>, y *Sotelo, J.R.*<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Proteínas y Ácidos Nucleicos, Instituto Clemente estable (IIBCE)

<sup>2</sup> Área Biofísica, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. E-mail: [escande@iibce.edu.uy](mailto:escande@iibce.edu.uy)

La síntesis de ARN (incorporación de  $[\text{H}^3]\text{UTP}$ ) y la carga de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  dependiente de ATP fueron medidas simultáneamente bajo las mismas condiciones experimentales y utilizando la misma fracción de núcleos aislados frescos de hígado de rata. En ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (1 mM EGTA) y en presencia de 1 mM ATP, la síntesis de ARN fue de  $28 \times 10^3$  cpm  $[\text{H}^3]$  UTP /mg. prot. en 15 minutos, siendo la misma incrementada 1.9 veces en presencia de  $1\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  libre. En estas condiciones (presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ ), los núcleos aislados fueron capaces de acumular  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  en forma ATP dependiente. La sustitución del ATP 1 mM por ATP 20  $\mu\text{M}$ , promovió una inhibición total de la carga de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  así como una inhibición de la síntesis de ARN. En presencia de 1 mM ATP y  $\text{Ca}^{2+}$ , la inclusión en el medio de reacción de los ionóforos de  $\text{Ca}^{2+}$  A23187 o Ionomicina, así como de los inhibidores de la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  Thapsigargin, t-BuBHq o  $\text{I}_4\text{PSP}$ , inhibieron total o parcialmente la carga de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ . La síntesis de ARN también fue inhibida en presencia de las drogas antes mencionadas. Sin embargo, en ninguno de los casos la inhibición fue total. Estos resultados sugieren la existencia de un posible acoplamiento entre el gradiente de  $\text{Ca}^{2+}$  del espacio periplásmico nuclear y la síntesis de ARN.

FINANCIADO POR: TWAS, CSIC, PEDECIBA

## **AVANCES EN EL CLONADO DE LA PARAMIOSINA DE *Fasciola hepatica***

Berasain, P.<sup>\*</sup>, Cancela, M.<sup>\*</sup>, Carmona, C.<sup>\*</sup>, Roche, L.<sup>+</sup> y Tort, J.<sup>+</sup>

<sup>\*</sup>Unidad de Biología Parasitaria, Depto. de Biología Celular y Molecular, Fac. de Ciencias, Instituto de Higiene. E-mail: pberasai@higiene.edu.uy

<sup>+</sup> Depto. de Genética, Fac. de Medicina.

*Fasciola hepatica* es un helminto parásito causante de la Distomatosis humana y animal. Esta zoonosis ampliamente distribuida ocasiona grandes pérdidas económicas en los países afectados. La paramiosina, una proteína integral de los filamentos gruesos del músculo, es capaz de generar en ovejas pre-inmunizadas con la misma protección parcial contra el parásito. Sin embargo los rendimientos de los métodos de purificación empleados no permitirían plantear un escalado a nivel industrial. Por lo tanto nos hemos propuesto obtener la proteína recombinante de *F. hepatica*, y una vez expresada, estudiar su potencial inmunoprotector en ovejas. Se diseñaron primers degenerados basados en las regiones conservadas de las secuencias nucleotídicas conocidas de paramiosinas, presentes en los bancos de datos; a partir de ARN total de gusanos adultos, se preparó ADNc que se utilizó como molde en ensayos de PCR con los *primers* antes diseñados. F8/R10 y F8/R8 amplificaron las bandas del tamaño esperado de 556 pb, y 262 pb respectivamente. La banda de 556 pb fue purificada y usada como molde en una reacción de Nested-PCR usando F8/R8 como primers internos, amplificándose la banda de 262 pb. El fragmento de 556 pb fue secuenciado. Los resultados del BLAST indicaron que dicha secuencia alinea con una alta homología en una región próxima al COOH-terminal de las paramiosinas de *Schistosoma japonicum* y *Schistosoma mansoni*.

## REPARACION DE ADN Y CONTROL DEL CICLO CELULAR: EFECTOS DE LOS GENES *CHK1* Y *RAD 17* SOBRE LA ESTABILIDAD GENOMICA

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

Laboratorio de Radiobiología, Departamento de Biofísica, Facultades de Medicina y de Ciencias, UDELAR;

\* Department of Radiation Pathology, Winship Cancer Center., Emory University, Atlanta, USA.

La preservación del genoma depende en parte de mecanismos de regulación y control que actúan en todas las fases del ciclo celular y que comprenden una compleja red de transducción de señales y efectores con llamativas homología conservadas entre especies distantes. En *S. cerevisiae* el complejo PCNA-RFC incluiría al gen *RAD17*, situado corriente arriba de *MEC1*, homólogo de AT en humanos y de *RAD53*, homólogo de p53. *CHK1*, se ubicaría corriente abajo de *RAD53* controlando a *PDS*, en una vía de chequeo mitótico por control sobre adhesión de cromátidas. Se analizaron poblaciones celulares de *Saccharomyces cerevisiae* diploides, isogénicas, en fase exponencial: salvaje, *rad17/rad17* y *chk1/chk1*. Se utilizaron medios de cultivo convencionales (YPD) y el agente radiomimético bleomicina (B: 0.5 – 3 ug/ml, 1,5h). Se analizó la cinética de proliferación, las probabilidades de muerte celular en  $f(t)$  y se aisló el ADN, determinando roturas dobles (TAFE, densitómetro láser, distribuciones binomiales y de Poisson). Se comprobó que los mutantes *rad17/rad17* son incapaces de reparar las DSB inducidas por B, degradando su ADN durante la incubación en YPD; no frenan en el ciclo celular y presentan mayor probabilidad de muerte celular en  $f(B)$  que las salvajes. Los mutantes *chk1/chk1*, no frenan en el ciclo luego de exposición a B, presentando fraccionamiento de ADN y probabilidad de muerte celular similares a las de la cepa salvaje. Los hallazgos son compatibles con un modelo de red con retroalimentación positiva permitiendo continuidad de la proliferación celular o eliminación por acumulación de errores.

## **VISUALIZACIÓN DE ESTRUCTURAS ALTERNATIVAS DE TRINUCLEÓTIDOS REPETIDOS Y POSIBLE VINCULACIÓN EN ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR LA EXPANSIÓN DE TRIPLETAS**

*Braida C.<sup>1</sup>, Gomes-Pereira M.<sup>2</sup>, Tort J.F.<sup>1</sup> y Monckton D.G.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Departamento de Genética, LOBBM, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. E-mail:cbraida@fmed.edu.uy

<sup>2</sup> Institute of Biomedical and Life Sciences, University of Glasgow, United Kingdom.

Está ampliamente reconocido que la expansión de trinucleótidos repetidos es un elemento central en la patología de varias enfermedades humanas neurodegenerativas, como el Síndrome del X frágil, la Distrofía miotónica tipo 1 (DM1) y varias de las Ataxias espinocerebelosas. Sin embargo, todavía no está claro como está expansión provoca los síntomas observados en algunas de estas enfermedades. En esta oportunidad nos centramos en la visualización de estructuras alternativas que forma el ADN en regiones de repetidos CTG del gen DMPK, involucrado en DM1, y también en el gen ERDA-1 y la región CTG18.1, que todavía no están asociadas a un fenotipo patológico. Para ello, amplificamos estas regiones mediante PCR y separamos los productos en geles de poliacrilamida nativos y de agarosa con y sin BrEt. A partir de la alteración de los patrones de movilidad electroforética comprobamos la formación de estructuras alternativas en regiones de repetidos con distinta longitud, que son dependientes del número de repetidos. Estas estructuras alternativas son estables por lo que es posible purificarlas a partir de geles de poliacrilamida y utilizarlas posteriormente en geles de retardo. Estos estudios nos permitirán realizar una caracterización primaria sobre la posible interacción de estas estructuras particulares con proteínas de extractos proteicos de distintos tejidos y aportar al entendimiento de uno de los mecanismos responsables de DM1. A través de la comparación con ERDA-1 y CTG18.1 intentaremos identificar si existe un mecanismo general o si hay diferencias entre estos sistemas.

Agradecimientos: PEDECIBA (Biología) y CSIC.

## **GENES EXPRESADOS DURANTE EL DESARROLLO DE CESTODOS: ESTUDIO DE LA FAMILIA DE PROTEÍNAS CRISP EN *MESOCESTOIDES CORTI***

Britos, L., Farinha, L., Lalanne A.I., Castillo E., Marín, M.

Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, Montevideo.

Con el objetivo de identificar genes vinculados al desarrollo y la relación hospedero-parásito en cestodos, se identificó una familia de genes codificantes para proteínas secretadas ricas en cisteína (CRISP) en *Mesocestoides corti*. Los genes CRISP se encuentran ampliamente distribuidos en la escala filogenética y se caracterizan por una expresión tejido o estadio-específica. En *M. corti*, hemos aislado y secuenciado cuatro secuencias parciales CRISP, tres de ellas a partir de ADN copia. Los estudios de expresión sugieren que al menos uno de los genes identificados –denominado McP2- se expresa diferencialmente en el estadio larvario del parásito (tetratiridio). Por otra parte, ensayos de hibridación in situ realizados in toto y sobre cortes de tetratiridios, localizan su expresión específicamente en la región que bordea las ventosas, asociada a una función secretora. Como aproximación a la función biológica, y de acuerdo a datos de actividad reportados en otros organismos, se investigó la capacidad de inhibición de la tripsina –potencial inductor del desarrollo estrobilar en parásitos intestinales- por parte de los productos ES de *M. corti*. Se investigó asimismo la presencia de genes CRISP en otros parásitos mediante RT-PCR, verificándose la amplificación de posibles secuencias homólogas en *E. granulosus*, *T. crassiceps* y *T. cruzi*. Con el fin de estudiar las proteínas de esta familia en *M. corti*, se está analizando el reconocimiento con sueros reactivos contra proteínas CRISPs heterólogas, en tanto se logra la obtención de la proteína McP2 recombinante.

## **INESTABILIDAD GENOMICA FRENTE A DIFERENTES TIPOS DE ESTRES EN SACCHAROMYCES CEREVISIAE**

Candrea E. C., Keszenman D.J. y Nunes E.

Lab.de Radiobiología. Departamento de Biofísica. Facultad de Medicina y Facultad de Ciencias,  
UDELAR. E-mail: ecandrev@fmed.edu.uy

En poblaciones de *Saccharomyces cerevisiae* sometidas a diferentes tipos de estrés se inducen vías de transducción de señales que incluyen a la proteinquinasa A, P38/HOG, YAP e IMP2 resultando en activación transcripcional (secuencias promotoras: STRE, HSE, ARE). Se ha demostrado tolerancia cruzada en caso de combinación de agentes que producen estrés, observándose aumento de la sobrevivencia, disminución de la mutagénesis y disminución del daño en el ADN. En este trabajo se expusieron poblaciones postdiáxicas, estacionarias y exponenciales a los siguientes tipos de estrés: oxidativo, producido por bleomicina (B), choque térmico (HS) y disminución de nutrientes. Se utilizaron la cepa salvaje SC7K(*lys2-3*) y las mutantes *rad6?* y *rad52?*. Se expusieron las poblaciones a B: 0 - 30  $\mu$ g/ml, 1,5 h, con y sin HS previo (1 h a 38°C). Se analizaron las probabilidades de sobrevivencia y mutagénesis en f (t, B). A nivel del ADN aislado se determinaron roturas de doble cadena (DSB) (TAFE, densitometría laser, Poisson). Los resultados más relevantes son: las poblaciones en fase postdiáxica (disminución de nutrientes) presentan una llamativa estabilidad genómica en relación a las poblaciones en fase exponencial, aumento de la probabilidad de sobrevivencia y disminución de la mutagénesis. Los genes *RAD6/UBC2* y *RAD52* son esenciales en la tolerancia a B inducida por HS en fase exponencial y en la sobrevivencia en fase postdiáxica. Estos hechos indican que las vías de ubiquitinación y de reparación de DSB son parte de los mecanismos esenciales en la estabilidad genómica. Adicionalmente actuarían protectores, fundamentalmente trealosa, tioles y HSP constitutivas.

Se agradece a PEDECIBA

## **INHIBIDORES RECOMBINANTES DE PROTEASAS DE *F. HEPATICA***

*Cappetta, M.*<sup>1</sup>, *Díaz, A.*<sup>2</sup>, *Tort, J.*<sup>1</sup> y *Roche, L.*<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Genética, Facultad de Medicina, UDELAR, Uruguay.

<sup>2</sup> Cátedra de Inmunología, Facultad de Química, UDELAR, Uruguay.

e-mail: [monicac@fmed.edu.uy](mailto:monicac@fmed.edu.uy)

Las cisteín proteasas de la familia de la papaína juegan un rol fundamental en la penetración de tejidos y la evasión de la respuesta inmune por los parásitos helmintos. Con el propósito de diseñar drogas antiparasitarias, se estudiaron inhibidores proteicos naturales de las cisteín proteasas de *Fasciola hepatica*: el propéptido de la catepsina L1, un inhibidor potente y selectivo de su proteasa parental y las cistatinas, inhibidores generales de las cisteín proteasas. Los propéptidos N-terminales de las proteasas mantienen las enzimas inactivas para proteger las células de la degradación proteica descontrolada. Además, intervienen en el plegamiento y la estabilidad de la enzima. Los propéptidos libres son potentes inhibidores altamente selectivos de sus proteasas parentales. En este trabajo se demostró que el propéptido recombinante de la catepsina L1 de *F. hepática* expresado en *E. coli*, es un potente inhibidor selectivo de la catepsina L1. Mediante estudios de mutagénesis dirigida del propéptido aislado expresado en el sistema bacteriano y de la proenzima expresada en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, se puso en evidencia la participación del propéptido en el plegamiento y estabilidad de la enzima. Las cistatinas son inhibidores proteicos naturales encargados de modular la actividad de las cisteín proteasas dentro de las células y en los fluidos biológicos. Se presenta el aislamiento de un gen codificante de cistatina a partir de cDNA de organismos adultos de *F. hepática*. Se obtuvo cistatina funcional en el medio de cultivo de levaduras usando un sistema de expresión en *Saccharomyces cerevisiae*.



## FORMACIÓN DE ÁCIDO SULFÉNICO EN LA ALBÚMINA HUMANA

*Carballal, S.<sup>1</sup>, Radi, R.<sup>2</sup>, Freeman, B.A.<sup>3</sup> y Alvarez, B.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Laboratorio de Enzimología, Facultad de Ciencias; <sup>2</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina y <sup>3</sup>University of Alabama at Birmingham, USA.

La albúmina sérica humana (HSA) es la proteína más abundante del plasma. Ha sido propuesta como antioxidante en el compartimento vascular debido a su único tiol libre (-SH), correspondiente a la cisteína 34. En este trabajo se investigaron las reacciones de la HSA con peróxido de hidrógeno y peroxinitrito. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidó el tiol con una constante de velocidad de 2.26 M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> y una estequiometría 1:1. No se observó la formación de dímeros unidos por enlaces disulfuro, lo cual sugiere que el tiol de la HSA estaría alcanzando otros estados de oxidación. La utilización del reactivo 7-cloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD-Cl), permitió detectar la formación de ácido sulfénico (RSOH) por espectrofotometría UV-VIS. La formación de ácido sulfénico en Cys34 fue además confirmada mediante estudios de espectrometría de masa MALDI-TOF utilizando dimedona. La exposición de HSA a peroxinitrito -producto de la reacción entre los radicales óxido nítrico y superóxido- tanto en presencia como en ausencia de CO<sub>2</sub>, también llevó a la formación de ácido sulfénico. En presencia de CO<sub>2</sub> el peroxinitrito se descompone en radical carbonato y dióxido de nitrógeno, lo cual sugiere que la formación de ácido sulfénico puede también proceder mediante una vía radicalar. Finalmente se estudió la participación del ácido sulfénico como posible intermediario en el mecanismo de formación de disulfuros mixtos con tioles de bajo peso molecular, los cuales se encuentran presentes en cerca de un tercio de la HSA circulante en el plasma.

## **DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS PARA LA ACTIVIDAD FLUORESCINDIACETATO HIDROLASA EN ARGIUDOLES ACUICOS URUGUAYOS**

*Carrasco-Letelier, L.*

Centro de Investigación en Ciencias Ambientales EULA-Chile, Universidad de Concepción, Chile. E-mail:lcarrasco@netexplora.cl

En el estudio de los cambios en la biogeoquímica de los suelos es frecuente la evaluación de actividades enzimáticas del suelo, como la actividad enzimática fluoresceindiacetato hidrolasa (FDAsa). Ya que, han demostrado su utilidad como parámetros para la evaluación de la condición metabólica de diferentes manejos del suelo. El presente trabajo presenta la determinación de los parámetros cinéticos de la actividad FDAsa con el objetivo de evaluar si las condiciones asumidas como óptimas por la literatura internacional son validas en suelos uruguayos. La actividad FDAsa fue estudiada en Argiudoles acuicos con pradera natural y bajo monocultivo de Eucaliptus sp. Los resultados encontrados demuestran que las condiciones de evaluación estándar indicadas por la literatura no son las óptimas para los suelos uruguayos estudiados. A esto se agrega, que los parámetros cinéticos de la actividad FDAsa presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los suelos forestados ( $K_m = 16.08$ ;  $V_{max} = 40.13$  [ $\mu\text{g}$  Fluresceina/g suelo-seco min]) y la pradera natural ( $K_m = 46.24$ ;  $V_{max} = 8.99$  [ $\mu\text{g}$  Fluresceina/g suelo-seco min]). Los resultados plantean la necesidad de definir las condiciones óptimas para la evaluación de la actividad FDAsa en los diferentes tipos de suelo y cobertura vegetal existentes en Uruguay, previo a su empleo de este parámetro como bioindicador. De otro modo, siguiendo las condiciones definidas por la literatura, se podría llegar a resultados erróneos.

APOYADO POR PROYECTO PESCA-IAI IMPACT OF FORESTRY IN URUGUAYAN GRASSLANDS

## **CAPACIDAD ANTIOXIDANTE PLASMÁTICA Y SU VARIACIÓN CON LA EDAD**

*Celano, L.<sup>1</sup>, Vidal, A.<sup>1</sup>, Olascoaga, A.<sup>3</sup>, Alallón, W.<sup>3</sup>, Arago, A.<sup>4</sup>, Denicola, A.<sup>2</sup> y Thomson, L..<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Enzimología y <sup>2</sup> Físicoquímica Biológica, Facultad de Ciencias

<sup>3</sup> Laboratorio Clínico y <sup>4</sup> Unidad de Hemoterapia, Hospital de Clínicas, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. [icelano@fcien.edu.uy](mailto:icelano@fcien.edu.uy)

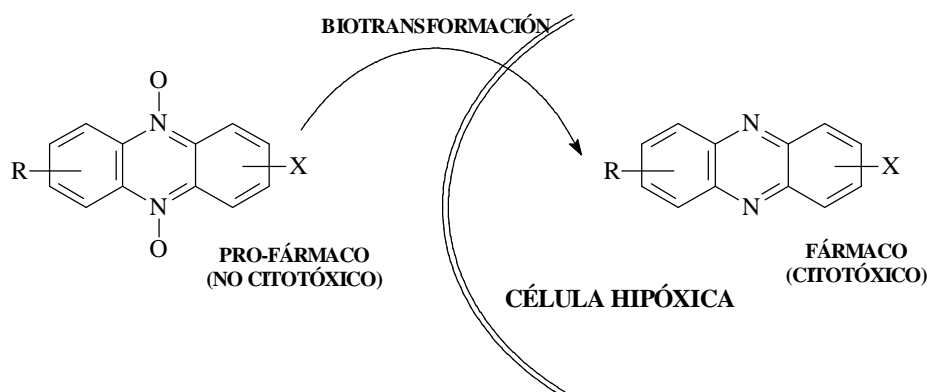
La acumulación progresiva de cambios inducidos por especies reactivas del oxígeno (ERO) y del nitrógeno es la base etiológica de las enfermedades degenerativas asociadas al envejecimiento. La capacidad de diferentes moléculas antioxidantes de actuar previniendo la aparición de enfermedades degenerativas es área de intensa investigación. El objetivo de este trabajo es estudiar la capacidad antioxidante plasmática en adultos sanos, su variación con la edad y con diferentes parámetros plasmáticos. La capacidad antioxidante plasmática se determinó en personas sanas entre 20 y 60 años, mediante la técnica de FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma). La oxidación de proteínas plasmáticas medida como el contenido de carbonilos se cuantificó con dinitrofenilhidrazina. Se dosificó ácido úrico, bilirrubina y proteínas totales. La capacidad antioxidante en las muestras osciló entre 1 y 3 mM, presentando relación con el contenido de ácido úrico, pero no con la concentración de bilirrubina. No se observaron diferencias significativas en la capacidad antioxidante entre los diferentes grupos etarios. El contenido de carbonilos entre los 18 y 49 años (0.79 nmoles/mg proteínas), aumentando en el grupo entre 50 y 60 años (1.37 nmoles/mg proteínas). La correlación observada entre capacidad antioxidante y ácido úrico plasmático confirma su contribución mayoritaria (60%) al poder antioxidante plasmático total. El aumento en la oxidación proteica observada en los adultos mayores, acompañada de una capacidad antioxidante conservada, es indicativo de un efecto acumulativo de ERO asociado a la edad.

# MODIFICACIONES ESTRUCTURALES DE AGENTES CITOTÓXICOS: ESTUDIO DE LA RELACIÓN ESTRUCTURA-VIABILIDAD CELULAR

Cerecetto, H., González, M., Lavaggi, M.L., Lafon, L. y Dajas, F.

Dept. de Química Orgánica, Facultad de Química - Facultad de Ciencias, UDELAR; Dept. de Neuroquímica, IIBCE. Montevideo, Uruguay. E-mail: lavaggi@fcien.edu.uy

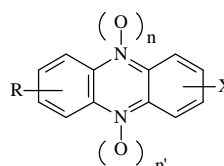
En la actualidad, las estrategias en la búsqueda de fármacos antineoplásicos son muy variadas e involucran numerosas disciplinas. En este sentido, nuestro grupo ha orientado su trabajo al diseño y síntesis de nuevos agentes capaces de erradicar células contenidas en el centro de los tumores sólidos, células hipóxicas por la baja vascularización de estos tumores. Para ello, se han obtenido compuestos capaces de bio-transformarse selectivamente en el seno de estas células, a especies tóxicas por su potencial intercalación al ADN (Esquema 1).



Esquema 1

La citotoxicidad selectiva, biotransformación, puede ser evaluada analizando la metabolización del pro-fármaco o a través de la síntesis química de los metabolitos y el análisis de su citotoxicidad.

En el presente trabajo se describirán los resultados preliminares, químicos y biológicos, obtenidos en el estudio de los aspectos moleculares del modo de acción de estos profármacos. Así, sobre un grupo de pro-fármacos y de fármacos (Tabla 1) se realizan estudios de viabilidad celular sobre células PC12.



Tabla

Ref.	n	n'	R	X
1	1	1	(CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )CH-	-NH <sub>2</sub>
2	0	0	(CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )CH-	-NH <sub>2</sub>
3	1	1	CH <sub>3</sub> -	-NH <sub>2</sub>
4	1	1	CH <sub>3</sub> -	-OH
5	1	0	CH <sub>3</sub> -	-NH <sub>2</sub>
6	0	0	CH <sub>3</sub> -	-NH <sub>2</sub>
7	1	1	Cl-	-NH <sub>2</sub>
8	1	1	Cl-	-OH
9	1	0	Cl-	-NH <sub>2</sub>
10	1	0	Cl-	-NH <sub>2</sub>

Ayudado por PEDECIBA (Química y Biología) la C.H.L.C.C.

## **ANÁLISIS PROTEOMICO DE LINFOCITOS B DE PACIENTES CON LEUCEMIA LINFOIDE CRONICA EN RESPUESTA A FLUDARABINA**

Cortazzo, P.<sup>1</sup>, Durán, R.<sup>2</sup>, Tiscornia, A.<sup>1</sup>, Cayota, A.<sup>3</sup>, Pritsch, O.<sup>1</sup>, Cerveñansky, C.<sup>2</sup> y Robello, C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina;*

<sup>2</sup> *Unidad de Bioquímica Analítica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) -Facultad de Ciencias;*

<sup>3</sup> *Departamento Básico de Medicina, Facultad de Medicina.*

La Leucemia Linfocítica Crónica (LLC) constituye un paradigma de las enfermedades malignas humanas, ya que el aumento clonal de células B es debido a un defecto en la capacidad de muerte apoptótica. Se ha demostrado que los análogos de nucleósidos, en particular la fludarabina, son altamente efectivos en el tratamiento de la LLC, ya que inducen la apoptosis en células B-LLC, aunque no se conocen las moléculas implicadas en esta respuesta. El objetivo de este trabajo es, mediante el uso de metodologías de análisis del proteoma, estudiar los perfiles de expresión proteica de linfocitos B tratados y no tratados con fludarabina. Para ello se aislaron linfocitos B de pacientes con LLC y se cultivaron en presencia (5 µg/ml) y ausencia de fludarabina. Luego de 48 horas de cultivo, se prepararon extractos proteicos, los cuales fueron analizados por electroforesis bidimensional utilizando para la primera dimensión (isoelectroenfoque) el sistema IPGPhor (Pharmacia) con rangos de pH 4-7 y 3-10, y para la segunda dimensión electroforesis en poliacrilamida/SDS. Los resultados obtenidos muestran que frente a la presencia de fludarabina varias proteínas cambian sus perfiles de expresión. Se seleccionaron algunos de dichos "spots", se eluyeron del gel y se digirieron con tripsina. Los péptidos obtenidos se analizaron por espectrometría de masa (MALDI-TOF), y el análisis en banco de datos de los perfiles obtenidos permitió identificar hasta la fecha cinco proteínas diferencialmente expresadas.

Este trabajo ha sido financiado por la Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer

## PURIFICACIÓN DE UNA BASE NUCLEOTÍDICA MODIFICADA A PARTIR DE LÍQUIDO AMNIÓTICO BOVINO

Cota, G.<sup>1</sup>, Rossi, S.<sup>2</sup>, Ferreira, F.<sup>3</sup>, Battistoni, J.<sup>2</sup>, Marín, M.<sup>1</sup>, Señorale, M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Sección Bioquímica, Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias;

<sup>2</sup> Cátedra de Inmunología, Facultad de Química-Facultad de Ciencias;

<sup>3</sup> Dpto. de Desarrollo y Producción, Laboratorio de glicoconjugados y carbohidratos, Facultad de Química-Facultad de Medicina

La queuina es una base nucleotídica modificada presente únicamente en la primer posición del anticodón de los ARN de transferencia específicos para Asn, Asp, His y Tyr. Los animales no tienen la capacidad de sintetizar este compuesto, y deben obtenerlo de la dieta. La presencia de queuina en ARNt específicos se ha relacionado con el uso diferencial de codones sinónimos. Se ha observado también que el grado de modificación que presenta la población de ARNt puede variar según el estado fisiológico o de diferenciación celular. Con el fin de estudiar los efectos de esta base modificada sobre la síntesis de proteínas *in vivo*, en este trabajo se purificó queuina a partir de líquido amniótico bovino. El método utilizado para la purificación consta de tres cromatografías: (1) intercambio iónico; (2) adsorción en gel y (3) HPLC en columna de fase reversa. Dos litros de líquido amniótico bovino se procesaron en *batch* con la resina Dowex 50 (H<sup>+</sup>). El material eluido fue concentrado y cargado en una columna de Sephadex G10. La mayor parte de las proteínas y otros materiales contaminantes se lavan de la columna, en tanto que la fracción de interés permanece unida al gel hasta que se provoca la elución con una solución adecuada. El conjunto de fracciones de elución con A<sub>280</sub> significativa se concentró y se aplicó a una columna de HPLC analítica. Los cromatogramas se registraron a 260nm y la polaridad de la fase móvil se ajustó hasta lograr una buena separación de picos. El material purificado presenta un espectro de absorbancia idéntico al conocido para la queuina.

## APLICACIONES DE LA TÉCNICA DE ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) AL ANÁLISIS DE PROTEÍNAS LÁCTEAS.

Damián, J.P.<sup>1</sup>, De Lima, D.<sup>1</sup>, Bermúdez, J.<sup>2</sup> y Reginensi, S.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Veterinaria, Área de Bioquímica, Las Placetas 1550 Montevideo.

Email: jpdamian@adinet.com.uy

<sup>2</sup> Facultad de Agronomía, Montevideo, Tecnología de los Alimentos

Las caseínas constituyen 80 % de las proteínas totales de la leche; siendo las más importantes en la transformación tecnológica. Existen cuatro especies de caseínas bovinas:  $\alpha$ s1-cn,  $\alpha$ s2-cn,  $\beta$ -cn y  $\gamma$ -cn, admitiéndose que sus proporciones relativas varían en diferentes razas y especies. Para la especie *caprina*, en nuestro país la producción lechera se destina casi en su totalidad a la fabricación quesera y el contenido en la fracción  $\alpha$ s1-cn se correlaciona positivamente con la aptitud quesera. Interesa conocer la composición en caseínas para seleccionar aquellas razas o individuos que potencialmente proporcionarán rendimientos queseros mayores. Se empleó la técnica de SDS-PAGE en el análisis de leche desgrasada, de cabras de diferentes razas, logrando la separación neta de dos subfracciones ( $\alpha$ s2-cn y  $\beta$ -cn), en tanto que otras dos se superponen en una banda ( $\alpha$ s1-cn y  $\gamma$ -cn). En la especie *bovina* la leche es almacenada en tanques de frío en los tambos, pudiendo permanecer allí de uno a dos días antes de ser transportada a la planta. El frío preserva la leche de la acción de microorganismos mesófilos y termófilos, pero en tales condiciones se desarrolla la flora psicrótrofa. Algunos de los microorganismos psicrótrofos se han identificado y demostrado que liberan enzimas proteolíticas capaces de degradar las caseínas, afectando la calidad del queso. La técnica de SDS-PAGE fue utilizada para estimar el grado de proteólisis de las caseínas por acción de estas enzimas desde el tanque de frío y en ensayos de laboratorio. Se discuten ventajas y limitaciones de la técnica.

## **AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA CEPA NATIVA DE *AUREOBASIDIUM SP.* COMO AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO DE *PENICILLIUM EXPANSUM* Y *BOTRYTIS CINEREA* EN MANZANAS.**

Díaz, M.V.<sup>1</sup>, Garat, M.F.<sup>1</sup>, De Aurrecoechea, I.<sup>2</sup>, Franco-Fraguas, L.<sup>3</sup> y Vero, S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Cátedra de Microbiología, Facultad de Química

<sup>2</sup> Cátedra de Bioquímica, Facultad de Química

<sup>3</sup> Unidad de Estadística y Cómputos, Facultad de Agronomía

*Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea* son los patógenos de mayor importancia durante el almacenamiento postcosecha de manzanas. Luego de la cosecha, parte de la fruta se conserva a baja temperatura (0-1 °C) durante meses. Para evitar el ataque por los mencionados patógenos, la fruta se baña con fungicidas, práctica que tiene actualmente varios reparos, incluyendo la toxicidad de los productos aplicados y la falta de eficacia, debido a la aparición de cepas de patógenos resistentes. Por lo tanto, se plantean medidas de control alternativas para sustituir o complementar el uso de fungicidas. Este trabajo plantea el aislamiento y caracterización de microorganismos para ser utilizados como biocotroladores de los mencionados patógenos fúngicos, durante el almacenamiento postcosecha de manzanas. Se aisló la flora superficial de manzanas sanas que habían estado almacenadas en cámara fría durante 8 meses, se caracterizó y se realizaron ensayos de biocontrol contra cepas nativas de *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea* sobre fruta a 5°C. Se seleccionaron aquellas cepas que lograron controlar la aparición de síntomas y se realizaron nuevos ensayos en las mismas condiciones, utilizando un número mayor de frutos. Una cepa de *Aureobasidium sp.* resultó un buen antagonista de ambos patógenos, mostrando un 70% de protección contra *Botrytis cinerea* y un 100% de protección contra *Penicillium expansum*. La cepa antagonista fue identificada y caracterizada, determinándose la temperatura óptima de crecimiento en medio líquido. Se realizaron además estudios tendientes a determinar los mecanismos de acción del antagonista, determinándose que era capaz de producir quitinasas y 1,3 glucanasas en presencia de paredes de *Botrytis* como única fuente de carbono. Además, se realizaron ensayos de producción de sideróforos en medio líquido y sólido. Se determinó la capacidad de colonización del sitio de acción realizando curvas de crecimiento del antagonista a 5°C y 1°C en heridas de manzana. Por otro lado, se determinó la concentración inhibitoria mínima de iprodione que permitía el crecimiento de la cepa antagonista, con el fin de evaluar la posibilidad de aplicar en forma conjunta el antagonista con bajas concentraciones de fungicida. Con esta misma cepa, se están llevando a cabo estudios promisorios de biocontrol de *P. italicum* en naranjas.



## **FUNCION DE LA GLUTAMINA SINTETASA PLASTÍDICA EN PLANTAS DE *Lotus japonicus* SOMETIDAS A ESTRÉS HÍDRICO**

Díaz, P.<sup>a</sup>, Orea, A.<sup>b</sup>, Monza, J.<sup>a</sup> y Márquez, A.<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Bioquímica. Departamento de Biología Vegetal. Facultad de Agronomía. Unidad Asociada Bioquímica Vegetal. Facultad de Ciencias. Av. E. Garzón 780, Montevideo;

<sup>b</sup> Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, Sevilla, España.

La sequía disminuye la productividad-calidad de las plantas las cuales responden acumulando osmolitos nitrogenados. Para que los osmolitos nitrogenados se acumulen, es necesario un suplemento de glutamato que en tejidos verdes se da a través del ciclo glutamina sintetasa (GS)/glutamato sintasa. Se ha sugerido que la GS citosólica (GSc) puede estar involucrada en la acumulación de prolina en condiciones de estrés osmótico. El objetivo de este trabajo fue establecer el rol de la GS plastídica (GSp) en condiciones de estrés hídrico. Se trabajó con folíolos de *L. japonicus* salvaje y mutantes deficientes en GSp (MDGS) crecidas en una atmósfera con alto contenido de CO<sub>2</sub>. Los niveles de prolina en valores absolutos y relativos al total de aminoácidos fueron mayores en el salvaje que en los MDGS. Asimismo, en condiciones de estrés hídrico, los contenidos de poliaminas, GABA y asparagina de los MDGS se modificaron con respecto al salvaje. El daño oxidativo (evaluado como sustancias reactivas al tio-barbitúrico) fue mayor en los MDGS que en el salvaje y los niveles de amonio en los MDGS en sequía y en aire se incrementaron como consecuencia de la fotorrespiración, pero no por la sequía. En los MDGS los contenidos de proteína GSc no variaron y en el silvestre la GSc incrementó y la GSp disminuyó como consecuencia del estrés hídrico. La GSp y la GSc colaborarían en proveer de glutamato para la síntesis de osmolitos nitrogenados responsables de proteger a la planta contra el estrés osmótico y daño oxidativo generados por la sequía.

## **FUNCIÓN DE LOS MOTIVOS REPETIDOS [dT-dG]<sub>n</sub> EN *T. cruzi*: ANÁLISIS DE PROTEÍNA TGBP Y CONSTRUCCIÓN DE GENES REPORTEROS**

*Duhagon, M.A.*<sup>1</sup>, *Smircich, P.*<sup>1</sup>, *Ciganda, M.*<sup>1</sup>, *Dallagiovanna, B.*<sup>1,2</sup>, *Williams, N.*<sup>3</sup>, *Garat, B.*<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Interacciones Moleculares, Instituto de Biología e Instituto de Química Biológica. Facultad de Ciencias. UdelaR, Uruguay

<sup>2</sup> Departamento de Biología Molecular de Paraná, Brasil

<sup>3</sup> Department of Microbiology, SUNY at Buffalo, USA

*Typanosoma cruzi*, agente causante del mal de Chagas, atraviesa un complejo ciclo de vida que implica modificaciones substanciales de la expresión génica. La importancia de la regulación post-transcripcional hace que las secuencias intergénicas y sus factores específicos adquieran un interés particular. Previamente propusimos que los motivos dinucleotídicos [dT-dG]<sub>n</sub> podrían tener un papel importante en la regulación de la expresión génica (Duhagon y col, *BBRC* 287;98, 2001). Hemos purificado y microsecuenciado una proteína que se une específicamente a estos motivos *in vitro*. Aquí presentamos la caracterización del gen *tgbp* por PCR, RT-PCR, rastreo de una biblioteca de ADNg y Southern blot. El gen fue clonado en un vector de expresión como fusión con la proteína GST. La actividad de unión al blanco de la proteína recombinante fue ensayada por geles de retardo. Para analizar el efecto de los motivos [dT-dG]<sub>n</sub> en la modulación de la expresión génica se construyeron plásmidos con dos genes reporteros: luciferasa y cloramfenicol acetil transferasa. Se estudiará el efecto de la transfección de construcciones con repetidos de varios tamaños ubicados en diferentes sitios en las posibles regiones reguladoras determinando los niveles de expresión de los genes reporteros.

## BIOTRANSFORMACIÓN DE ESTEROIDES POR CATÁLISIS ENZIMÁTICA EN FASE SÓLIDA

*Ferraz, N., Manta, C., Batista-Viera, F.*

Cátedra de Bioquímica, Facultad de Química. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. E-mail: [nferraz@fq.edu.uy](mailto:nferraz@fq.edu.uy)

Debido al gran interés de la industria farmacéutica por los esteroides, se han desarrollado numerosos trabajos de investigación con la finalidad de encontrar nuevas rutas semi-sintéticas para la obtención de derivados altamente activos. Frecuentemente un primer paso en dichas transformaciones consiste en una hidroxilación estereoespecífica del núcleo esteroideo. Dichas hidroxilaciones son difíciles de llevar a cabo mediante la química tradicional debido a la presencia de un gran número de átomos de carbono potencialmente reactivos. Sin embargo el uso de biocatalizadores permite realizar síntesis altamente específicas y de gran rendimiento. Los sistemas enzimáticos que actúan sobre esteroides son generalmente complejos y necesitan la presencia de varias enzimas y cofactores, observándose en muchos casos inactivación de la enzima deseada al final de la purificación. Es por ello que se ha estudiado la posibilidad de utilizar sistemas "in vivo" por medio de la inmovilización de células recombinantes. Las principales ventajas de la inmovilización de células con respecto a las células libres son: i) se logra una mayor densidad de células; ii) se pueden separar fácilmente del medio de reacción; iii) se logran procesos continuos y iv) se pueden reusar dichos sistemas. En el presente trabajo se ha estudiado la posibilidad de hidroxilar la progesterona, intermediario clave en la producción de diversas hormonas, por medio del uso de derivados enzimáticos en fase sólida. Para ello se cuenta con el sistema de la 9 $\alpha$ -hidroxilasa, enzima recombinante que se expresa en células de *E.coli* modificadas. La molécula de 9 $\alpha$ -hidroxiprogesteroona puede ser fácilmente convertida en 9,11-dihidro derivados, material de partida para la preparación de esteroides fisiológicamente activos: 9 $\alpha$ -halo-11 $\beta$ -hidroxi-esteroides (por ej. 9 $\alpha$ -halo-hidro cortisona). Se exploraron algunas de las técnicas más usadas para la inmovilización de células, como el encapsulamiento en geles de alginato de calcio y en geles de poli acrilamida. Se muestran resultados preliminares referentes al comportamiento de las células libres y los derivados en fase sólida mediante medidas de actividad enzimática por HPLC.

## SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE GALACTOSYL-XYLOSA USANDO ?-GALACTOSIDASE A. ORYZAE

*Giacomini, C.*<sup>1,2</sup>, *Irazoqui, G.*<sup>1</sup>, *Gonzalez, P.*<sup>1</sup>, *Batista-Viera, F.*<sup>1</sup> y *Brena, B.M.*<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Cátedra de Bioquímica, Facultad de Química. Gral. Flores 2124, Montevideo, Uruguay, FAX: + 598 2 9241906. Email: [cgiacomi@bilbo.edu.uy](mailto:cgiacomi@bilbo.edu.uy);

<sup>2</sup> Laboratorio de Bioquímica, Unidad Asociada del Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Montevideo, Uruguay.

En los últimos años la síntesis de oligosacáridos está recibiendo atención a nivel mundial debido al importante papel que los mismos tienen en muchos procesos y biológicos y a su efecto en la salud humana y de animales de granja. La síntesis química de oligosacáridos es compleja y la condensación regioselectiva de los monosacáridos requiere muchos pasos de protección, activación, condensación y desprotección. Algunas glicosidasas han probado ser catalizadores atractivos para la síntesis de oligosacáridos ya que son accesibles, económicas, fáciles de manejar y no requieren cofactores. Su mayor desventaja cuando se las compara con las glicosil-transferasas son sus rendimientos de moderados a bajos y la falta de regioespecificidad en al glicosilación. En este trabajo se reporta la síntesis enzimática del disacárido galctosil-xilosa en medio acuoso, utilizando ?-galactosidasa de *A.oryzae*, o-nitrofenil-?-D-galactopiranosido (ONPG, 0.05 M) como dador del grupo galactosil y xilosa (0.5 M) como aceptor. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente y el grado de avance de la síntesis se monitoreó por HPLC. El rendimiento de la reacción se define como la cantidad de galactosil-xilosa producida, expresada como el porcentaje de la cantidad inicial del dador del grupo galactosil. El ONPG se hidrolizó completamente en dos horas y el rendimiento máximo de la reacción de síntesis fue de un 16 % , el que se alcanzó a los 60 minutos. Se estudió también la influencia de la concentración del aceptor, variando la concentración de xilosa entre 0.05 – 2.7 M. Cuando esa concentración fue de 2.7 M (41 % w/v) la velocidad de hidrólisis de ONPG no disminuyó y el rendimiento de la reacción de síntesis aumentó a un 22%. El efecto de los co-solventes orgánicos en el rendimiento de la reacción de síntesis fue estudiado para dimetil-formamida (DMF, 50% v/v) y acetona (50% v/v) con xilosa 0.5 M. La velocidad de hidrólisis de ONPG disminuyó notoriamente en ambos casos. En el caso del DMF el rendimiento máximo de síntesis fue de un 4% y se alcanzó a las cinco horas. Por otro lado, cuando el co-solvente utilizado fue acetona, se alcanzó un rendimiento máximo de un 12% en una hora. En la síntesis de otro galactosil-glicósido: galactosil-etilenglicol se alcanzaron rendimientos de transglicosilación mayores a un 90%.

## UNA ALTERNATIVA PARA EL ESCALADO DEL PROCESO DE INMOVILIZACIÓN REVERSIBLE DE $\beta$ -GALACTOSIDASA DE LEVADURA: REDUCCIÓN DE ENZIMAS EN FASE SÓLIDA

Grazú, V.<sup>1,2</sup>, Cuadra, K.<sup>1</sup>, Ovsejevi, K.<sup>1</sup> y Batista-Viera, F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Cátedra de Bioquímica, Fac. de Química.

<sup>2</sup> Unidad Asociada Química Biológica, Fac. Ciencias. Montevideo, Uruguay E-mail: [bioquim@bilbo.edu.uy](mailto:bioquim@bilbo.edu.uy).

La enzima  $\beta$ -galactosidasa (EC 3.1.1.23) cataliza la hidrólisis de lactosa produciendo una mezcla isomolecular de glucosa y galactosa. El gran interés en la obtención de derivados inmovilizados de dicha enzima se debe a su aplicación a la hidrólisis de lactosa en leche y suero, obteniéndose productos aptos para poblaciones con intolerancia a la lactosa, y reduciendo la polución generada por el desecho de sueros y permeados de queso. Nuestra experiencia en la inmovilización de  $\beta$ -galactosidasa (lactasa) de *Kluyveromyces lactis* en soportes tiol-reactivos, indica que sólo es posible inmovilizarla si esta previamente reducida. Con el fin de posibilitar el escalado del proceso de inmovilización hemos desarrollado agentes reductores en fase sólida. En este trabajo se reporta el uso de agentes reductores insolubles provistos de grupos tiopropil (mercaptohidroxipropil-éter), sintetizados en tres tipos de matrices distintas: agarosa, Eupergit-C y Toyoperal HW-65. Los tres permitieron triplicar el contenido inicial de grupos tiol (SH) de la enzima, al igual que en la reducción en solución con ditioneitol (DTT), pero requiriéndose aproximadamente 7 veces menos  $\mu$ moles de SH del agente reductor/mg de proteína, que cuando se utiliza DTT. La enzima reducida fue inmovilizada en forma reversible en agarosa conteniendo estructuras tiol-reactivas, grupos tiolsulfatos (TSI), alcanzándose altos rendimientos de inmovilización: más de un 60% (para la enzima reducida con DTT o tiopropil-agarosa) y 40% (para la enzima reducida con tiopropil-totoppearl o tiopropil-eupergit). Con todos los derivados fue posible alcanzar un porcentaje de conversión de lactosa del 90 % a las 2 horas de reacción.

## **UN MUTANTE EN UNA PROTEÍNA Ras-GAP AFECTA PLEIOTRÓPICAMENTE LA GERMINACIÓN Y LA FUNCIONALIDAD DE ALGUNOS TRANSPORTADORES DE MEMBRANA EN EL HONGO *Aspergillus nidulans***

*Harispe, L., Portela, C. y Gorfinkiel, L.*

Sección Bioquímica, Dpto. de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Iguá 4225, Montevideo, Uruguay

El objetivo de este trabajo es caracterizar fenómenos implicados en la topogénesis de proteínas de membrana. En el hongo *Aspergillus nidulans* se han descrito varios sistemas de transporte a través de la membrana plasmática. apC, el transportador general de purinas de *A. nidulans*, no es funcional a 25°C. El mutante *apf1*, supresor de la criosensibilidad natural del transporte mediado por UapC fue aislado y caracterizado. La funcionalidad de la proteína UapC se encuentra aumentada en este mutante así como la actividad del transportador PrnB, responsable de la incorporación de prolina. A 37 °C, el mutante *apf1* posee una morfología alterada, las conidias muestran un retraso en la germinación y defectos en la citoquinesis. Un plásmido capaz de rescatar el fenotipo mutante fue aislado a partir de una genoteca de *A. nidulans*. Su secuencia reveló dos fases abiertas de lectura. Una de ellas, es homóloga a las proteínas GAP, reguladoras negativas de las proteínas Ras. Las proteínas Ras han sido implicadas en actividades celulares fundamentales como la organización del citoesqueleto, la proliferación celular y la citoquinesis. La otra secuencia presenta una alta homología con el gen *sec14* de *Saccharomyces cerevisiae* que codifica una proteína de tipo fosfatidylinositol/fosfatidilcolin transferasa. Una deleción de 4 pares de bases fue hallada en la secuencia del gen codificante de la proteína homóloga a las GAP en el mutante *apf1* lo que sugiere que es éste, en su alelo silvestre, el responsable de complementar las características mutantes de la cepa *apf1*. Estos resultados indicarían un rol de las proteínas Ras en la inserción y/o mantenimiento de proteínas en la membrana de *A. nidulans*.

## **ESTUDIO DE LA SOLUBILIDAD DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA Cu-Zn EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA**

*Horjales, S.\* , Battistoni, J. \*\*, Bedó, G. +, Señorale, M.\* y Marín, M.\**

\* Sección Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias;+ Departamento de Genética, Facultad de Ciencias,\*\* Laboratorio de Inmunotecnología, Cátedra de Inmunología, Facultad de Ciencias.  
E-mail: horjales@adinet.com.uy

Diversas enfermedades neurodegenerativas están asociadas a la agregación citoplásmica de proteínas, llevando a la muerte celular. Muchos casos de esclerosis lateral amiotrófica (ALS) se encuentran implicados con alteraciones en la enzima superóxido dismutasa (SOD1). Mutaciones en el gen de la SOD1 explican aproximadamente el 20% de los casos de ALS familiar, donde se observa la formación de agregados proteicos y una muerte gradual de neuronas motoras. Por este motivo, se estudió el estado de solubilidad de la SOD1 en células de neuroblastoma como aproximación al análisis del plegamiento de proteínas. Se produjeron anticuerpos policlonales en conejo contra SOD humana recombinante. Se está analizando la reactividad cruzada con la SOD bovina y con la de ratón. Ensayos de western blot permitieron cuantificar a la SOD tanto en la fracción soluble como en la fracción insoluble del extracto de proteínas de neuroblastoma. Se estimó que el 98% de la enzima está en forma soluble. En células de neuroblastoma diferenciadas con ácido retinoico no se encontró variación en el estado de solubilidad de la SOD1 a las 24 horas. Igualmente se observó un aumento de 4 a 8 % en la cantidad de proteínas de la fracción insoluble en células diferenciadas respecto a su control. Ensayos preliminares de proteólisis limitada con proteinasa K, de SOD recombinante y del extracto de neuroblastoma no permitieron obtener perfiles de digestión por SDS-PAGE o western blot. Esta aproximación al estudio del plegamiento de proteínas intentará ser trasladada al modelo de ratón transgénico.

## **VIGILANCIA DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA A CARBAPENEMS EN CEPAS DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* PROCEDENTES DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS.**

*Ingold, E., Cordeiro, N., Calvelo, E. y Vignoli, R.*

*Cátedra de Bacteriología y Virología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay*

La aparición de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a Carbapenems, representa un serio problema asistencial. Nuestro objetivo fue investigar la producción de metalobetalactamasas y/o posibles trastornos de permeabilidad a carbapenems asociados a la pérdida de la porina D2 (Omp-D2) de 45 kDa. Se estudiaron 14 cepas de *P. aeruginosa* resistentes a Imipenem, provenientes de pacientes internados en el Centro Nacional de Quemados. Se estudiaron: - trastornos de permeabilidad mediante corridas de peso molecular de extractos de Omp por SDS-PAGE y ensayo de competencia por detección de CIM con y sin lisina (50mM). -detección de metalobetalactamasas, midiendo actividad de extractos crudos de proteínas sobre Meropenem en agar almidón iodo (AAI) + meropenem (AAIM) y AAI + cefalotina (AAIC), paralelamente con AAIM y AAIC + EDTA (inhibidor de las metalobetalactamasas). Se utilizó como controles: Omp-D2 + cepas ATCC 27853 y Ps001 (Imipenem sensible), y como metalobetalactamasa + una cepa de *S.maltophilia*. 13 cepas fueron resistentes a Gentamicina, 7 a Amikacina y 10 a Ciprofloxacina (por disco difusión, según normas NCCLS 2000). Todas las cepas resistentes a Imipenem mostraron disminución de Omp-D2 y no mostraron variación significativa en la CIM + Lisina. Las cepas sensibles (control) mostraron un aumento de al menos 4 veces. Cuatro cepas presentaron además una banda 51 kDa compatible con un mecanismo de eflujo asociado (sistema MexAB/OprM). No se observó actividad sobre AAIM, ni inhibición en AAIC + EDTA. En conclusión, el mecanismo de resistencia en estas cepas fue por disminución de Omp-D2, no detectándose la presencia de metalobetalactamasas.



## ESTABILIDAD DE $\beta$ -GALACTOSIDASAS SOLUBLES E INMOVILIZADAS EN SISTEMAS SEMI-ACUOSOS. EFECTO DEL AUMENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE CO-SOLVENTE

Irazoqui, G.<sup>1</sup>, Giacomini, C.<sup>1,2</sup>, Batista, F.<sup>1</sup> y Brena, B.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Cátedra de Bioquímica, Facultad de Química. Gral. Flores 2124. Montevideo, Uruguay. FAX: +598 2 9241906. E-mail: [bbrena@fq.edu.uy](mailto:bbrena@fq.edu.uy);

<sup>2</sup> Unidad Asociada de Química Biológica, Facultad de Ciencias

Se utilizaron tres  $\beta$ -galactosidasas (*A. oryzae*, *K. lactis*, *E. coli*) como modelos para el estudio de la estabilidad en sistemas semi-acuosos y la inmovilización se realizó a glutaraldehído-agarosa. Los co-solventes usados fueron: N,N-dimetilformamida (DMF), etanol, acetona, dioxano y acetonitrilo (todos entre 6 y 75% v/v). La cinética de inactivación fue analizada de acuerdo al modelo en dos pasos propuesto por Henley y Sadana, con un estado final enzimático ( $E_2$ ) con actividad específica distinta a cero.

$$A = [100 + (\%_1 k_1 / (k_2 - k_1)) - (\%_2 k_2 / (k_2 - k_1))] \exp(-k_1 t) - (k_1 / (k_2 - k_1)) (\%_1 - \%_2) \exp(-k_2 t) + \%_2$$

Los parámetros  $\%_1$  y  $\%_2$  son los porcentajes de actividad específica de los estados enzimáticos  $E_1$  y  $E_2$  con respecto al estado enzimático nativo. Los gráficos experimentales de la actividad residual vs. tiempo fueron ajustados utilizando el programa Enzfitter. El estudio de inactivación térmica a diferentes temperaturas reveló que todos los derivados son considerablemente más estables que las correspondientes enzimas solubles. En la forma soluble de la  $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae* es la más estable, pero su forma inmovilizada fue más inestable que la enzima soluble en presencia de los co-solventes estudiados. Los derivados de *E. coli* y *K. lactis* mostraron estabilización importante a bajas concentraciones de co-solventes. A pesar de que la inmovilización permitió estabilización frente a la temperatura y frente a bajas concentraciones de co-solventes, esto se torna difícil al aumentar la concentración de los mismos. La inmovilización puede imponer cierta tensión en la estructura de la proteína dejándola más sensible para desnaturalizarse a altas concentraciones de co-solventes, por lo que se están estudiando estrategias complementarias de estabilización.

## ESTUDIOS DE DOCKING DE COMPUESTOS FENOTIAZINICOS EN TRIPANOTIONA Y GLUTATION REDUCTASA: UN ANALISIS GRAFICO

Iribarne, F.<sup>1</sup>, García Otero, A.<sup>1</sup>, Alvareda, E.<sup>1</sup>, Aguilera, S.<sup>2</sup> y Paulino, M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Modelado Biomolecular, DEQUIFIM, Facultad de Química, General Flores 2124, 1157 - Montevideo, Uruguay

<sup>2</sup> Departamento de Física, Laboratorio de Cristalografía Macromolecular, Facultad de Ciencias, Universidad Católica del Norte, Av. Angamos 0610, CC 1280, Antofagasta, Chile

Se presenta un estudio teórico de afinidades de unión de una extensa serie de derivados fenotiazínicos previamente sintetizados en los sitios activos de tripanotiona reductasa (TR) y glutatión reductasa (GR). Algunos de los derivados han probado ser inhibidores de TR de *T.cruzi*. Se hizo una comparación con las afinidades de los ligandos naturales, tripanotiona disulfuro (T[S]<sub>2</sub>) y glutatión disulfuro (GSSG). Se obtuvieron geometrías de mínima energía para todos los compuestos y se calcularon propiedades electrónicas mediante cálculos semi-empíricos de Química Cuántica. Todos los compuestos fueron sujetos a procedimientos teóricos de docking (programa DOCK) en los sitios de TR y GR. Con la muestra total se realizó un análisis de componentes principales (PCA), intentando correlacionar los resultados de docking y las propiedades electrónicas con los datos de actividad inhibitoria experimental. Las conformaciones dockeadas se analizaron en detalle por medio de inspección visual (programa O). En particular, se intentó dar cuenta de los resultados energéticos considerando la orientación relativa de las estructuras en los sitios activos y el tipo y cantidad de contactos con residuos proteicos vecinos. De manera similar a estudios previos de docking sobre ligandos nitrofuránicos, se evidencia que el factor electrostático tiene un rol preponderante en la selectividad de los ligandos frente a TR y GR. En particular, ligandos capaces de adquirir carga positiva en condiciones fisiológicas probaron poseer mayor afinidad por la enzima del parásito. Coincidentemente, la carga de los grupos sustituyentes aparece como el componente principal en el estudio PCA.

## **PARTICIPACIÓN DEL GEN *RAD52* EN LA TOLERANCIA A LA BLEOMICINA INDUCIDA POR CHOQUE TERMICO**

*Keszenman, D.J., Candreva, E.C., Sánchez, A.G. y Nunes, E.*

Dpto. de Biofísica, Facultad de Medicina, UDELAR. Montevideo, Uruguay. E-mail: dkeszen@fmed.edu.uy

El genoma está continuamente expuesto al daño oxidativo inducido por perturbaciones del entorno e intracelulares que puede ser contrarrestado por mecanismos de reparación del ADN. Previamente, hemos demostrado la inducción de tolerancia por choque térmico (HS) a los efectos celulares y moleculares producidos por la Bleomicina (BLM: radiomimético inductor de ROS) en *Saccharomyces cerevisiae*. Esta tolerancia depende, por lo menos en parte, de procesos de reparación del ADN, estando involucradas las vías postreplicativa (*RAD6*) y probablemente la recombinacional (*RAD52*). Para investigar esta última posibilidad se analizó, en la cepa mutante *rad52?*, la reparación de roturas dobles del ADN (DSBs) inducidas por BLM sin y con pretratamiento con HS. Células mutantes en fase exponencial fueron expuestas a BLM (0–30  $\mu\text{g/ml}$ , 1.5h, 30°C) sin y con pretratamiento de HS (38°C, 1h). La determinación de las DSBs por electroforesis (TAFE) y su análisis por densitometría láser se realizó inmediatamente después de los tratamientos y a diferentes intervalos de incubación en medio nutriente sin BLM. En la cepa mutante *rad52?* se observó reparación de DSBs para dosis bajas de BLM (0  $\mu\text{g/ml}$  [BLM] ? 3.75 $\mu\text{g/ml}$ ), siendo más rápida y eficiente en las muestras pretratadas con HS. Para altas dosis, [BLM] = 15 $\mu\text{g/ml}$ , no se observó reparación de DSBs. Los resultados demuestran que la reparación recombinacional participa en la tolerancia inducida por HS a dosis altas de BLM. Además los datos sugieren que parte de las lesiones se procesan por una vía de reparación sin error, probablemente post-replicativa.

Agradecemos el apoyo de PEDECIBA (Biología)

## **CARACTERIZACIÓN Y CLONADO DE UNA TIORREDOXINA REDUCTASA DE *Fasciola hepatica***

Maggioli, G., Piacenza, L., Martín-Alonso, J.M.<sup>2</sup>, Parra, F.<sup>2</sup> y Carmona, C.

Unidad de Biología Parasitaria, Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Instituto de Higiene, Montevideo, Uruguay, E-mail: [maggioli@higiene.edu.uy](mailto:maggioli@higiene.edu.uy)

<sup>2</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Instituto Universitario de Biotecnología de Asturias, Universidad de Oviedo, Oviedo, España.

El sistema tiorredoxina (tiorredoxina reductasa (TrxR), tiorredoxina (Trx), tiorredoxina peroxidasa (TrxP)) ha demostrado ser un mecanismo antioxidante de gran importancia en helmintos parásitos. A partir de una librería de expresión de cDNA de adultos de *Fasciola hepatica*, utilizando suero de conejo hiperinmune producido contra la tiorredoxina reductasa nativa previamente purificada, se aisló un clon de cDNA que contiene una lectura abierta de 1797pb que codifica una tiorredoxina reductasa. La secuencia nucleotídica del clon revela que la enzima es una proteína de fusión inusual de una piridina nucleótido disulfuro oxidoreductasa con un dominio glutaredoxina en el extremo N-terminal. Utilizando una columna de afinidad en GSH-sefarosa se demuestra que la enzima nativa posee afinidad por el glutatión. Además se observa que es una selenoenzima tal como se postulara, a partir de la inhibición por sales de oro de la enzima nativa. Por medio de la técnica de inmunofluorescencia, la enzima fue localizada en células del parénquima y testículos del parásito. Por otro lado, se demostró usando IgGs purificadas de suero hiperinmune producido contra la TrxR, que la respuesta humoral es capaz de inhibir hasta un 80% de la actividad enzimática. La presencia de una tiorredoxina reductasa junto a otros estudios en los cuales se ha identificado los otros dos componentes del sistema, sostienen la hipótesis de que *F. hepatica* presenta un sistema tiorredoxina funcional, que podría participar en la interacción con su hospedero.

## **PEROXIREDOXINA DE GLÓBULO ROJO HUMANO: POTENCIAL PEROXINITRITO REDUCTASA**

*MANTA, B.<sup>1</sup>; THOMSON, L.<sup>2</sup>; DENICOLA, A.<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup> LABORATORIO DE FISICOQUÍMICA BIOLÓGICA, <sup>2</sup> LABORATORIO DE ENZIMOLOGÍA, INSTITUTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA, FACULTAD DE CIENCIAS. MONTEVIDEO, URUGUAY*

Las peroxiredoxinas (Prx) son enzimas antioxidantes tiol-dependientes, presentes en todos los organismos, cuya función biológica es la reducción de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y peróxidos orgánicos (ROOH) a expensas de un reductor que en general es glutatión o tioredoxina. En el glóbulo rojo (GR) la Prx es la tercer proteína citosólica más abundante. A lo largo de la diferenciación del eritrocito se expresan distintas Prx predominando en la célula madura una Prx de 22 kDa perteneciente a la subfamilia de las peroxiredoxinas de 2-Cys. El ciclo catalítico involucra la oxidación de la Cys51, altamente conservada, a ácido sulfénico (Cys-SOH) y la rápida reacción de éste con el tiol de la Cys172 de otro monómero para formar un disulfuro intermolecular. De los posibles agentes oxidantes a los que está expuesto el GR en el torrente sanguíneo es de particular importancia el peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>/ONOOH), potente oxidante producto de la reacción entre el anión superóxido y el óxido nítrico. Se ha propuesto que Prx bacterianas tienen la capacidad de actuar como peroxinitrito reductasas. La potencial actividad peroxinitrito reductasa de las Prx eucariotas aún no ha sido explorada. En este trabajo se purificó la 2-Cys Prx de GR humano mediante cromatografía de intercambio iónico y gel filtración. Se estandarizó un método espectrofotométrico sensible para medir actividad Prx usando DTT (ditiotreitól) como reductor, corroborándose que es esencial la presencia del tiol reducido para tener dicha actividad. Se estudio el potencial efecto protector de la Prx en oxidaciones mediadas por peroxinitrito (ADN y dihidrorodamina).

## VARIACIONES DE LOS CONTENIDOS DE ACETILCOLINESTERASA (AChE) DEL SNC DE LA RATA EN RESPUESTA AL ESTRÉS AMBIENTAL

*Maruri, A., Olivera, S. y Rodríguez-Ithurralde, D.*

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

En los vertebrados superiores, los cambios bioquímicos y morfológicos causadas por el estrés parecen reflejar la adaptación a la injuria y a los desafíos del entorno. Ya que hemos demostrado que la AChE es una señal de actividad neuronal, hemos investigado sus cambios en modelos establecidos de estrés. Ratas macho Wistar (3 a 18 días de vida postnatal = P3 a P18) fueron sometidas a movimiento pasivo reglado, calor o deprivación materna durante una hora e inmediatamente decapitados. La actividad AChE, medida por el método espectrofotométrico de Ellman en homogenatos de estriado, hipocampo, neocorteza, cerebelo y médula espinal, experimentó incrementos significativos luego de la aplicación de esos modelos de estrés, con la excepción del estriado. Ratas P15 expuestas a 30° C mostraron aumentos del 27% en hipocampo, 22% en cerebelo y neocorteza y 18% en médula espinal. La deprivación materna durante los estadíos P3, P7, P12 y P15 provocó aumentos hipocámpicos del 18, 79, 24 y 37%, respectivamente. En neocorteza, este modelo causó incrementos de 22%, 24% y 37% para P7, P12 y P15, respectivamente, mientras que en cerebelo solo aumentó significativamente en el estadio P7, y no provocó variaciones significativas en ninguna región a la edad P18. En resumen, el estrés agudo determina un incremento en el contenido de AChE que varía en función de la región cerebral y el estadio del desarrollo. Aunque la validez de AChE como marcador de estrés debe analizarse con mas profundidad, los aumentos encontrados pueden ser relevantes en la génesis del daño neurotóxico post-estrés, pues hemos demostrado que la AChE juega un papel en la neurodegeneración experimental.

*Apoyado por PEDECIBA Biología*

## ACCIONES MORFOGÉNICAS Y SINAPTOGÉNICAS DE LA ACETILCOLINESTERASA EN NEURONAS HIPOCÁMPICAS

*Olivera, S.*<sup>1</sup>, *Henley, J. M.*<sup>2</sup> y *Rodríguez-Ithurralde, D.*<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Neurociencia Molecular y Farmacología, Instituto Clemente Estable. Avenida Italia 3318, 11600 Montevideo, Uruguay. E-mail: [drit@iibce.edu.uy](mailto:drit@iibce.edu.uy)

<sup>2</sup> MRC Centre for Synaptic Plasticity, University of Bristol, Inglaterra.

Aunque numerosas evidencias experimentales muestran las acciones morfogénicas de la acetilcolinesterasa (AChE), estas propiedades no han sido caracterizadas en neuronas centrales. Por ello, investigamos los efectos que producen la administración, bloqueo o captura de AChE sobre neuronas hipocámpicas cultivadas (0-20 DIV). Respecto de neuronas controles, crecidas en idénticas condiciones, la adición de AChE al medio de cultivo (1 a 5 U.ml<sup>-1</sup>) aumentó la longitud (220 % ± 70% para primer y segundo orden) y el número de dendritas (256% ± 70%), el número de neuronas que emiten prolongaciones (80% ± 25%) y la expresión de marcadores pre- y postsinápticos (150% ± 26% para SV2a y 240% ± 90% para PSD-95, respectivamente), en función de la concentración de AChE y del desarrollo. La butirilcolinesterasa, enzima funcional y estructuralmente relacionada a la AChE, no afectó significativamente la morfología celular. El anticolinesterásico más selectivo, BW284C51 (10<sup>-7</sup>-10<sup>-5</sup>M), produjo la retracción de las neuritas en forma dependiente de la concentración. La ethopropazina (10<sup>-6</sup>-10<sup>-4</sup> M), inhibidor con acción sobre el sitio activo, no afectó la morfología pero disminuyó al 20% la viabilidad de las neuronas cultivadas luego de 24 horas de incubación. Luego de 3 a 24 horas de exposición, el anticuerpo MAB304 (20-100 µg.ml<sup>-1</sup>) que captura la AChE endógena de las células sin alterar sus propiedades catalíticas, determinó que las neuritas se liberaran del sustrato y se retrajeran completamente. Nuestros hallazgos sugieren que las acciones morfogénicas y sinaptogénicas de la AChE requieren interacciones moleculares con su sitio periférico y podrían explicarse por la considerable homología estructural y funcional de esta proteína con numerosas moléculas proteicas de adhesión celular.

Apoyado por PEDECIBA Biología, Unión Europea y MRC Centre for Synaptic Plasticity, Bristol University, UK

## **ANÁLISIS DE LA COLOCALIZACIÓN DE RIBOSOMAS CON DIFERENTES COMPONENTES CELULARES, EN NERVIIO CIÁTICO DE RATA**

Otero, L.<sup>1</sup>; Kun, A.<sup>1,2</sup>; Sotelo, J.R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Lab. de Proteínas y Ácidos Nucleicos, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) Montevideo-Uruguay

<sup>2</sup> Unidad Asociada a Sección Bioquímica, Dpto. de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República

La presencia de complejos traduccionales citoplásmicos integrados por ribosomas, mRNA, ribonucleoproteínas, factores de regulación, etc. ha sido señaladas en diversos tipos celulares en asociación con el citoesqueleto. En las neuronas se describió la presencia de componentes traduccionales en los conos de arranque de neuronas en cultivo (Bassel, 1998), en axones de Mauthner (Koenig, E. 2000, 2001) y en axones de calamar (Martin, R. 1998, Sotelo J. 1999). El presente trabajo investiga un aspecto del metabolismo proteico neuronal: la síntesis axonal de proteínas. En este sentido nuestra investigación ha pretendido caracterizar los componentes ribosomales de la maquinaria traduccional, describir su distribución dentro del territorio axonal y su relación con diferentes componentes celulares. Produjimos y caracterizamos un anticuerpo anti proteínas ribosomales y anti rRNA. En éste sentido se detalla: 1) la purificación de la fracción ribosomal, utilizada como inmunógeno ; 2) la caracterización proteica, de ácidos nucleicos (rRNA) y estructural (microscopía electrónica) de dicha fracción y 3) la obtención y caracterización del anticuerpo, así como su purificación. Se discuten los resultados obtenidos en la identificación de ribosomas en diferentes dominios celulares realizada por inmunocitoquímica, usando microscopía de luz, epifluorescencia y microscopía electrónica, en nervio ciático de rata. Se comparan los resultados obtenidos con dos anticuerpos específicos: el producido por nosotros y un anticuerpo comercial anti proteínas ribosomales P. La asociación de los ribosomas con diferentes componentes del axoplasma es analizada mediante estudios histológicos de colocalización con anticuerpos anti gap43 , B cop y actina (comerciales).



## ANTIPARASITIC ACTIVITY OF CYCLOSPORIN A AND SOME DERIVATIVES ON *TRYPANOSOMA CRUZI*: MOLECULAR MODELLING OF *T. CRUZI* CYCLOPHILIN-CYCLOSPORIN COMPLEXES

Paulino, M.<sup>1</sup>, García, A.<sup>1</sup>, Esteva, M.<sup>2y</sup>, Ruiz, A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Farmacología y Biomodelado Molecular. DEQUIFIM. Facultad de Química, Montevideo, Uruguay

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Parasitología "Dr. Mario Fatala Chabén", Buenos Aires, Argentina

The immunosuppressive drug cyclosporin A (CsA) has shown antiparasitic activity against several protozoans and helminths, when complexed to proteins called cyclophilins. It has been reported the molecular characterisation of seven members of the cyclophilin family in *Trypanosoma cruzi*. Among others, the TcCyP19 gene was expressed in *Escherichia coli*. The TcCyP19 purified recombinant protein exhibited a prolyl peptidyl cis/trans isomerase activity that was inhibited by CsA (IC<sub>50</sub> = 18.4 ± 0.8 nM). The trypanocidal activity of CsA and some non-immunosuppressive analogs on epimastigotes and trypomastigotes was demonstrated. A tridimensional modelling of TcCyP19 and its complexes with CsA and CsA analogues was performed. In a first step, a sequence alignment (Fasta-SAS) allow us to select the NMR structure of cyclophilin A from human complexed with the CsA from *Tolypocladium inflatum* (Spitzfaden et al., 1994, J. Biomol. NMR, 4, 463) to make the molecular replacement of non conserved side chains (mdFrodo/TOM) and further structure refinement (REFI subprogram). With the resulting set of coordinates, a comparison of interactive contacts between cyclosporin A (and analogues) and *T. cruzi* and human cyclophilins was performed. This result jointly with an analysis of the quaternary structure of complexes were used to conjecture about the basis of specificity of cyclosporin-cyclophilin complexes.

## **TcRBP: UNA NUEVA PROTEÍNA DE UNIÓN AL ARN DE *Trypanosoma cruzi***

Pérez, L.<sup>1,2</sup>, Duhagon, M.A.<sup>2</sup>, Robello, C.<sup>3</sup> y Garat, B.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Biología Molecular Vegetal

<sup>2</sup> Laboratorio de Interacciones Moleculares. Facultad de Ciencias. UdelaR

<sup>3</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UdelaR

A diferencia de los eucariotas superiores, en los tripanosomas la regulación de la expresión génica ocurre principalmente a nivel post-transcripcional. El ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* involucra diferentes estadios y transcurre a través de dos huéspedes lo que implica que la expresión proteica debe estar estrictamente regulada para permitir una rápida adaptación. Nuestro grupo se interesa en la identificación de factores implicados en este tipo de regulación. A partir de ADNc de epimastigotas, se obtuvo una secuencia parcial que contenía un dominio de unión a ARN conservado del tipo RRM. Para completar la secuencia, se realizaron ensayos de RT-PCR, subclonado, hibridación en gota (dot-blot) y secuenciación. Por otra parte, para la obtención de la secuencia genómica se hizo uso de fagos recombinantes obtenidos de una biblioteca genómica en  $\lambda$ EMBL3 y se realizaron ensayos de Southern blot y secuenciación. En base a estos datos, se identificó una secuencia que codifica para una proteína de 191 amino ácidos, con un peso molecular estimado de 21kDa. El dominio RRM presenta los dos submotivos característicos de proteínas de unión al ARN, RNP1 y RNP2. Se resalta además, la existencia de un dominio tipo "dedo de Zinc" (knuckle motif)  $CX_{2-5}CX_{4-12}C/HX_{2-4}C/H$  en el extremo carboxi terminal.

## ESTUDIOS MOLECULARES DE LA PROTEINA REGULADORA DEL TRANSPORTE DE HIERRO (Fur) Y SU EXPRESION EN *Sinorhizobium meliloti*

Platero, R., Jaureguy, M., Battistoni, F., O'Brian, M.R.<sup>§</sup> y Fabiano, E.

Laboratorio de Ecología Microbiana, IIBCE., Unidad Asociada a la Facultad de Ciencias, Montevideo, Uruguay

<sup>§</sup> State University of New York (SUNY) at Buffalo, USA

Durante su ciclo vital los rizobios (bacterias del suelo capaces de fijar nitrógeno en simbiosis con leguminosas) se ven enfrentados a drásticos cambios en la disponibilidad de sus nutrientes. Entre los nutrientes esenciales, el hierro presenta la particularidad de ser abundante pero poco soluble. Por otra parte, puede catalizar la formación de radicales libres generadores de estrés oxidativo y daño celular. En las bacterias gram-negativas, la proteína Fur (ferric uptake regulator) juega un papel central en la regulación de genes que responden a la concentración de hierro. En general, la expresión de proteínas involucradas en el transporte de este metal se reprime en presencia del complejo Fur-Fe. Estudios bioinformáticos del genoma de *Sinorhizobium meliloti* 1021 mostraron un probable gen *fur* contiguo al operón *sitABCD*. Trabajos realizados en nuestro laboratorio demostraron que este operón participa del transporte de manganeso. En los 122 pb que separan los probables sitios de inicio de la transcripción de *fur* y *sitA* se encuentra una secuencia palindrómica TGCAAATGxxxxCATTTGCA. Esta observación nos lleva a proponer un mecanismo de regulación coordinado para la transcripción de *fur* y *sitABCD*. Con la finalidad de caracterizar la expresión de estos genes, se clonó una región de 1248 pb conteniendo al gen *fur*, la región intergénica y parte del gen *sitA*. Se obtuvieron mutantes Fur- intercambiando al gen por un cassette de resistencia a espectinomicina. La región intergénica está siendo clonada en ambas direcciones en un plásmido que contiene al gen *gfp* como marcador.

Parcialmente financiado por PEDCIBA (Química) y ASM-USA

## **ESTUDIO DE FACTORES DE RESISTENCIA A MICROORGANISMOS EN *Solanum commersonii***

Siri, M.I.<sup>1</sup>, Villanueva, P.<sup>2</sup>, Franco Fraguas, L.<sup>3</sup>, Ferreira, F.<sup>2</sup>, Acosta, M.<sup>4</sup>, Galván, G.<sup>4</sup> y Pianzzola, M.J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Cátedra de Microbiología, <sup>(2)</sup> Laboratorio Carbohidratos y Glicoconjugados, Dpto. Química Orgánica,

<sup>3</sup> Cátedra de Bioquímica, Facultad de Química, CC 1157, Montevideo, URUGUAY.

<sup>4</sup> Cátedra de Horticultura, Facultad de Agronomía, Montevideo, URUGUAY.

La especie *Solanum commersonii* crece en forma salvaje en nuestro país, el cual es el centro de su zona de distribución. Está reportado que esta especie autóctona ha desarrollado resistencia a algunos patógenos de importancia económica así como también a las bajas temperaturas. En este trabajo hemos estudiado la posible actividad antimicrobiana de diferentes tipos de extractos, tanto acuosos como no acuosos, preparados a partir de hojas de 10 accesiones diferentes de *Solanum commersonii* colectadas en el sur de nuestro país. El estudio de inhibición del crecimiento microbiano se realizó por el método de difusión en agar frente a cuatro microorganismos diferentes: una bacteria Gram positiva (*Staphylococcus aureus*), una Gram negativa (*Escherichia coli*), un hongo filamentoso (*Penicillium expansum*) y una levadura (*Cándida albicans*). Los resultados muestran que varios de los extractos poseen actividad antimicrobiana, especialmente contra *S. aureus* y *E. coli*. Es interesante el resultado frente a *E. coli*, ya que generalmente organismos Gram-negativos suelen ser más resistentes que Gram-positivos. No menos interesante ha sido encontrar extractos con actividad contra *C. albicans* y *P. expansum*. Está reportado que en las defensas de plantas frente a microorganismos patógenos suelen participar tanto metabolitos primarios como secundarios. Por tal motivo, en el presente trabajo se han incluido análisis que involucran tanto alcaloides típicos del género *Solanum*, como proteínas, con el fin de avanzar en la identificación de los factores de resistencia responsables de la actividad.

Financiado por Proyecto INIA-LIA 003

## **EFFECTO DE LA NUTRICIÓN SOBRE LA EXPRESIÓN ENDOMETRIAL DE RECEPTORES DE PROGESTERONA EN OVINOS**

*Sosa, C. Viñoles, C., Acuña, S., Lozano, J.M., Abecia, J.A. y Meikle, A.*

Bioquímica, Dpto de Biología Celular y Molecular, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay. E-mail: cecis@adinet.com.uy

Dpto. de Producción Animal, Universidad de Zaragoza, España

Se ha postulado que la subnutrición podría afectar la sobrevivencia embrionaria a través de cambios en el ambiente uterino. Previamente hemos demostrado que ovejas con un plano nutricional bajo (Grupo B) contienen menores contenidos de progesterona en endometrio que ovejas controles (Grupo C). En este estudio se investigó el efecto de la subnutrición sobre la expresión endometrial de receptores de progesterona (RP) los días 5 y 10 postestro. Se determinaron los RP por inmunohistoquímica en 8 tipos celulares. El Grupo B presentó menos inmunopositividad que el Grupo C al día 5, pero no al día 10. Los receptores son capaces de concentrar hormonas específicas en los tejidos blanco: los niveles bajos de RP en el Grupo B concuerdan con las menores concentraciones de progesterona endometrial. No hemos encontrado reportes que vinculen la nutrición con la expresión de RP uterina, pero el IGF-I circulante disminuye en ovejas subnutridas; IGF-I estimula la función del receptor de estrógenos ?, quien a su vez es el principal inductor de RP. Por lo tanto un nivel nutricional más bajo puede resultar en menores cantidades de RP. Todos los tipos celulares del Grupo C tuvieron mayor tinción el día 5 que el día 10 de acuerdo con la conocida regulación en menos de la progesterona. Solo tres tipos celulares en el Grupo B mostraron un patrón similar y no tenemos una explicación obvia para este hecho. Una posible explicación es que en este grupo los niveles de RP ya eran bajos al día 5 y por lo tanto la inhibición no fue observada.

## LOCALIZACION DE MIOSINA Va Y KINESINA EN AXONES MIELINICOS

*Sotelo-Silveira, J.<sup>1,2</sup>, Calliari, A.<sup>1,3</sup>, Cárdenas, M.<sup>1</sup>, Koenig, E.<sup>4</sup> y Sotelo, J.R.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias

<sup>2</sup> Laboratorio de Proteínas y Acidos Nucleicos, IIBCE

<sup>3</sup> Area Biofísica, Facultad de Veterinaria

<sup>4</sup> Department of Physiology and Biophysics, University of Buffalo, N.Y.

Las placas periaxoplásmicas (PPAs) son dominios ricos en ácidos nucleicos que se distribuyen intermitentemente a lo largo de la periferia de los axones mielínicos. En los últimos años se puso en evidencia la presencia de ribosomas y polisomas en estos dominios, así como la presencia del ARNm codificante para la  $\beta$ -actina. Se ha propuesto que las PPAs actuarían como centros de síntesis proteica en los axones mielínicos. De ser así, sería necesaria la presencia de un transporte bidireccional desde y hacia estos dominios. Con el fin de identificar posibles proteínas motoras relacionadas con las PPAs, hemos evaluado la localización de miosina Va, kinesina y dineína en axoplasmas aislados de raíces ventrales y dorsales de rata y conejo. Para ello, las PPAs fueron identificadas por medio de la tinción con YOYO-1, mientras que las proteínas motoras fueron detectadas por inmunohistoquímica. Se observó reacción anti-miosina y anti-kinesina concentrada en las PPAs, así como señal dentro del axoplasma. La reacción anti dineína, sin embargo, se evidenció mucho mas homogénea y sin una distribución preferente. En el soma de las células de los ganglios de la raíz dorsal, las áreas de distribución de la marcación de YOYO y de cada una de las proteínas estudiadas demuestra un grado de equivalencia importante respecto a lo observado en axones. La localización diferencial de kinesina y miosina Va sugiere que pueden estar implicadas en el transporte en zonas espaciales específicas y/o tener funciones organizativas distintas dentro de las PPAs.

## ESTUDIO DE LOS MECANISMOS MOLECULARES DE DERIVADOS DE N-ÓXIDO DE 1,2,5-OXADIAZOL COMO AGENTES ANTICHAGÁSICOS

Tórtora, V.<sup>1</sup>, Aguirre, G.<sup>2</sup>, Möller, M.<sup>3</sup>, Thomson, L.<sup>1</sup>, Porcal, W.<sup>1</sup>, Di Maio, R.<sup>2</sup>, González, M.<sup>2</sup>, Cerecetto, H.<sup>2</sup> y Denicola, A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Lab. Enzimología y <sup>3</sup> Lab. Físicoquímica Biológica, Facultad de Ciencias, UdelaR, Montevideo, Uruguay

<sup>2</sup> Depto. Química Orgánica, Facultad de Química-Facultad de Ciencias, UdelaR.

La enfermedad de Chagas, causada por *Trypanosoma cruzi*, se manifiesta principalmente en Sur y Centro América, donde hay entre 15 y 20 millones de personas infectadas y más de 100 millones en riesgo. A pesar de múltiples investigaciones en el área, la quimioterapia contra la enfermedad de Chagas es aún inadecuada. El principal fármaco actualmente en uso es el Nifurtimox®, que presenta severos efectos secundarios, probablemente debido al grupo nitro que actúa como un centro redox no selectivo. En la búsqueda de compuestos más selectivos y menos tóxicos, se han sintetizado una serie de derivados de N-óxido de 1,2,5-oxadiazol con diferentes características lipo-hidrofílicas, con sustituyentes dadores o aceptores de electrones en el anillo bencénico. Se ensayó la habilidad de estos compuestos de inhibir el crecimiento de *T. cruzi* epimastigotas, tomando al Nifurtimox® como fármaco de referencia. En general, la presencia de sustituyentes aceptores de electrones mejora la actividad citotóxica de los distintos derivados. En una primera aproximación para identificar los mecanismos moleculares de acción tripanocida de esta serie se evaluó su actividad como agentes causantes de estrés oxidativo sobre las células de *T. cruzi*, a través del estudio de la oxidación de sulfhidrilos y lípidos intracelulares. La capacidad de estos compuestos de inducir fragmentación del ADN parasitario, como índice de muerte celular programada (apoptosis), fue también investigada. Por otro lado, la cadena de transporte de electrones mitocondrial fue un blanco importante de la actividad de estos compuestos dado que indujeron una inhibición marcada de la respiración celular.

## **ESTUDIO DE ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE UN EXTRACTO DE SOLANUM GRANULOSO LEPROSO Y SU POSIBLE FUNCIÓN FISIOLÓGICA**

Valles, D., Cantera, A. M.

Laboratorio de Enzimas Hidrolíticas, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4224. Montevideo, Uruguay. E-mail: dvalles@bilbo.edu.uy ; Fax: (598) 25258617

En frutos maduros de *Solanum granuloso leproso* se detectó actividad proteolítica. Dicha actividad ha sido asociada a enzimas de naturaleza cisteínica. El agregado de agentes reductores  $\beta$ -mercaptoetanol o glutatión se ha manifestdo necesaria para mantener la actividad catalítica durante lapsos prolongados de tiempo. Las enzimas son purificadas X veces mediante varios pasos cromatográficos. La función bioquímica de estas proteasas podría asociarse a la degradación de proteínas, dado que la incubación del concentrado enzimático con el extracto de fruto verde manifiesta la desaparición de algunas bandas proteicas, acción que no se manifiesta en el extracto de fruto maduro ni en el extracto verde solo.



## CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE LACTOBACILOS PROVENIENTES DE QUESO ARTESANAL

Vidal, M., Skerl, V., Pianzola, M.J., Cerdeiras, P., Soubes, M.

Cátedra de Microbiología, Facultad de Química, Gral. Flores 2124, Montevideo, Uruguay. E-mail: mcerdeir@bilbo.edu.uy

En los procesos de manufactura de productos lácteos fermentados, se utilizan actualmente cepas de bacterias lácticas como inóculo. En particular en la industria quesera uruguaya es cada vez más común encontrar la utilización de *starters* para la obtención de queso fresco, aún a nivel de quesería artesanal. Si bien el uso de *starters* es positivo con respecto a la calidad y homogeneidad de los productos obtenidos, disminuye en cambio la diversidad de los mismos. Las bacterias lácticas salvajes presentes en esta flora, son sin embargo consideradas esenciales en la producción de propiedades organolépticas características de los quesos tradicionales. Por lo tanto, existe una gran necesidad de estudiar dicha flora láctica más detalladamente para entender su importancia en la formación del sabor, y para ampliar la biodiversidad de los *starters* en uso. En este sentido es que se plantea el siguiente trabajo, basado en el estudio de la flora láctica, en particular lactobacilos, provenientes de una quesería artesanal que no utiliza cultivos *starters*. Las muestras estudiadas fueron: leche cruda, cuajo, suero, cuajada y queso terminado. Sobre dichas muestras se realizaron recuentos de flora láctica, aislamiento y caracterización de diez cepas de lactobacilos provenientes de las distintas muestras. Para la caracterización de dichas cepas se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: catalasa, fermentación de lactosa y xilosa, rojo de metilo-Voges Proskauer, compatibilidad entre las cepas, ARDRA. También se realizó un estudio preliminar de las propiedades organolépticas de las leches coaguladas al cabo de trece días. Todas las muestras analizadas presentaron del orden de  $10^8$  bacterias lácticas/mL, correspondiendo la mayoría de ellas a bastones gram +. Las diez cepas en estudio pueden agruparse en por lo menos dos grupos de acuerdo a sus características fisiológicas y genéticas. De acuerdo a los resultados obtenidos, existen al menos dos cepas que presentarían características adecuadas que se ensayarán en el futuro para usarlas como *starters* en la fabricación de queso tipo colonia.

## EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR Y MECANISMOS DE RESISTENCIA A CEFALOSPORINAS DE TERCERA GENERACIÓN (C3G) EN CEPAS DE LA FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE OBTENIDAS DEL TRACTO GASTROINTESTINAL DE PACIENTES BAJO TRATAMIENTO ANTIBIÓTICO

Vignoli R., Calvelo, E., Cordeiro, N., Ingold, E., del Monte, A., Quintana, A.

Departamento de Bacteriología y Virología, Facultad de Medicina. Instituto de Higiene, A. Navarro 3051, 11600 Montevideo.

Las infecciones nosocomiales por *Enterobacteriaceae* multirresistentes son un problema creciente a nivel hospitalario, siendo el tracto gastrointestinal su principal reservorio. Dentro del programa de control de infecciones del Centro Nacional de Quemados se estudió: (1) la relación entre la administración de antibióticos y la detección de cepas resistentes a C3G. (2) la epidemiología molecular de las cepas que pudieran constituir un brote intrahospitalario y (3) los mecanismos de resistencia a oximinocefalosporinas en dichas cepas. Se realizaron hisopados rectales a todos los pacientes desde su ingreso (y cada 48 hs) admitidos durante 21 meses, que se sembraron en agar Mac Conkey con y sin 4ug/ml de Ceftazidime. A las *Enterobacteriaceae* spp resistentes aisladas se las identificó y se les realizó sensibilidad antibiótica por discodifusión y test de tamizaje para la producción de Betalactamasas de Espectro Expandido (BLEE) (según normas NCCLS 2000). La asociación estadística entre administración de antibióticos y la selección de cepas resistentes se estudió por estimación de Kaplan Mayer y test exacto de Fisher. Se evaluaron 43 pacientes y 10 cepas resistentes. Dentro de ellas cuatro *E.cloacae* y una *K. pneumoniae*, esta última productora de ESBL. Se realizó PFGE para relacionar genéticamente los *E. cloacae*. Se realizó IEF y PCR para caracterizar la ESBL presente en el aislamiento de *K. pneumoniae*. Detectamos una asociación entre la administración de C3G ( $p<0,037$ ) e Imipenem ( $p=0,020$ ) y la aparición de cepas resistentes. Los *E. cloacae* estudiados fueron diferentes molecularmente. La BLEE producida por *K. pneumoniae* fue PER-2 la cual se encuentra ampliamente diseminada en nuestro país.

## **PORFIRINAS DE MANGANESO (III), DETERMINACIÓN DEL $pK_a$ DEL $H_2O$ AXIAL COMO ÍNDICE DE EFICIENCIA CATALÍTICA**

*Vitturi Iglesias, D., Ferrer-Sueta, G.*

Laboratorio de Físicoquímica Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. E-mail: [dario@fcien.edu.uy](mailto:dario@fcien.edu.uy)

La búsqueda de compuestos capaces de catalizar la dismutación de  $O_2^{\cdot -}$  y la eliminación de especies reactivas derivadas ha llevado al estudio de una serie de porfirinas de manganeso(III) con actividad SOD y gran reactividad frente a peroxinitrito. Se ha observado la existencia de una correlación entre el  $E_{1/2}$  de estas porfirinas y tanto  $k_{cat}$  SOD como  $k_{ONOO^-}$ . Esta correlación contempla el efecto electrónico que tienen diferentes sustituyentes en distintas posiciones sobre el centro redox. Sin embargo, estos sustituyentes también generan un entorno particular cerca del ion metálico que resulta en un apartamiento de la linealidad en la correlación anterior cuando los sustituyentes son muy voluminosos. Proponemos que las constantes de ionización de las aguas coordinadas en forma axial al manganeso podrían representar ambos efectos. Se determinaron los  $pK_a$  de dos porfirinas aniónicas y ocho catiónicas N-alkilpiridinium-2(3,4)-il- sustituidas mediante sus espectros de absorción UV-vis entre pH 7.5 y 13. Se trabajó utilizando un accesorio de flujo detenido para el mezclado rápido de  $10^{-5}$  M de porfirina en buffer carbonato 1M/NaOH 0.1N con soluciones de concentración creciente en HCl. Se registraron aproximadamente 100 espectros por porfirina realizándose a 25 diferentes valores de pH. El análisis de los datos se realizó mediante un software capaz de ajustar simultáneamente todos los espectros a una misma función de pH. Se obtuvo una correlación lineal entre el  $pK_{a1}$  de las aguas axiales y  $k_{cat}(SOD)$ , y  $k_{ONOO^-}$ , lo que confirma que la determinación de este parámetro constituye una herramienta adecuada para la estimación de la reactividad.

## **ADN, CLONACIÓN Y DESPUÉS ? LA BIOTECNOLOGÍA DESDE UNA PERSPECTIVA DOCENTE**

*Vomero Lara, M. I.*

Instituto de Profesores Artigas, Montevideo. Institutos Normales "María Stagnero de Munar" y "Joaquín R. Sánchez", Montevideo, Uruguay

En los últimos años, hemos sido testigos del rápido desarrollo de un conjunto de tecnologías genéticas que han permitido realizar grandes avances en el conocimiento de la estructura y función del material hereditario, dando lugar a las múltiples aplicaciones que hoy día trascienden del ámbito estrictamente científico, afectando distintos aspectos de la vida humana. Los niños y jóvenes forman parte de una sociedad donde las tecnologías antes citadas y otras a desarrollarse en los próximos años, son y serán hechos cotidianos. Deberán, como ciudadanos responsables, tomar decisiones personales relacionadas con el uso de estas tecnologías, lo que supone que estén al tanto de los fundamentos básicos y alcances de las mismas. Es dentro de este marco que elaboramos el presente trabajo, que debe ser considerado como un recurso didáctico dirigido a docentes y futuros docentes de Primaria y Secundaria, en el entendido de que la formación y actualización permanentes asegurarán una mejor comprensión de estos hechos científicos y tecnológicos para los educandos.

## IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE PATÓGENOS CÍTRICOS AISLADOS EN URUGUAY

Wozniak, A.<sup>a</sup>, Silvera, E.<sup>b</sup>, de Aurecochea, I.<sup>c</sup>, Pianzzola, M.J.<sup>a</sup>, Vero, S.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Cátedra de Microbiología, Facultad de Química. Gral. Flores 2124.

<sup>b</sup> Cátedra de Fitopatología. <sup>c</sup> Departamento de Biometría, Estadística y Computación. Facultad de Agronomía. Garzón 780. Montevideo, Uruguay. E-mail: aniela@fq.edu.uy

La citricultura en Uruguay es la producción de frutales más importante y la única enfocada netamente a la exportación. Las enfermedades de postcosecha constituyen la mayor causa de pérdidas de fruta durante la cadena exportadora. Dentro de ellas se destacan las podredumbres ocasionadas por *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* y *Penicillium ulaiense* conocidas como Moho verde, Moho azul y Moho "del bigote" respectivamente. En este trabajo se realizó el aislamiento, identificación y caracterización de 132 patógenos provenientes de muestras de distintos puntos del país. Se hizo la identificación clásica según clave de Pitt. Sorprendió el aislamiento de tres cepas de *Penicillium expansum* que no ha sido reportado hasta el momento como patógeno de cítricos. Se determinó la agresividad en fruto y la resistencia en placa y en fruto a los tres fungicidas de mayor uso mundial en cítricos: tiabendazol, imazalil y ortofenilfenato de sodio. Las cepas de *Penicillium expansum* produjeron una lesión en la naranja comparable a la producida por *Penicillium ulaiense*. Buscando un método más objetivo y rápido para la identificación de las cepas aisladas se optimizó una técnica utilizando marcadores RAPD. Se determinó la reproducibilidad del método, siendo ésta del 83 %. Teniendo en cuenta este valor se constató que todas las cepas de la misma especie se agrupaban en un cluster, no pudiéndose determinar diferencias intraespecíficas. En el dendrograma obtenido se observaron 4 clusters correspondientes a las especies de *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, *Penicillium ulaiense* y *Penicillium expansum*. En vista de estos resultados se puede considerar al RAPD un método confiable que permite identificar hongos a nivel de especie en forma más rápida y objetiva que mediante los métodos de identificación clásica.

## **PROPOSICIÓN DE UN MODELO MOLECULAR DE REGULACIÓN DE LA DUALIDAD: PROLIFERACION CELULAR – APOPTOSIS**

*Mila, R., Bracesco, N., Candreva, E., Keszenman, D., Salvo, V., Sánchez, A., Soria, S., Suárez, M., Nunes, E.*

Laboratorio de Radiobiología, Departamento de Biofísica, Facultades de Medicina y Ciencias, UDELAR

En base a datos experimentales obtenidos en nuestro laboratorio y a aportes de la bibliografía se propone un modelo de regulación de los eventos celulares involucrados en la dualidad proliferación–apoptosis en células eucariotas. Nuestra hipótesis de trabajo supone que la resistencia de ciertas poblaciones de células cancerosas a agentes físicos y químicos antitumorales, depende de eventos de recombinación modulados por la vía de reparación de bases mal apareadas. Además esta resistencia dependería de eventos apoptóticos regulados a distintos niveles, p.ej.: mitocondrial (familia BCL, p53, HSP70), traduccional (PKR), postraduccional (ubiquitinación, UBIs, VHL, LOX -matriz extracelular), y de procesamiento de intrones (PRPs). Los siguientes datos experimentales avalan el modelo: ? Activación de la recombinación por mutación en genes de reparación de bases mal apareadas (MMR): Aumento de inestabilidad genómica, con posible incremento de intercambio entre cromátidas hermanas. ? Blancos moleculares comunes en los efectos interactivos sinérgicos de radiación gamma, Pt e Hipertermia: Sensibilización de células tumorales de ovario humanas A2780 CP70 resistentes a radiaciones ionizantes, doxorubicina y Pt. ? Ubiquitinación de supresores tumorales, ciclinas e histonas (E2: hRAD6, E3: VHL-HIF). ? Control de la estabilidad genómica por genes de función dual en la reparación y en “checkpoints” (ATM/MEC1, NBS, DNAPK, PCNA, RFC, CHKs)? ? Señalización de muerte desde la membrana celular (DRs, DcRs, SODD-BAG-4, HSP70-p53) cascadas de transducción y efectores nucleares (RAS, MYC, NF $\kappa$ -B, JUN-FOS, p38/HOG). ? Regulación mitocondrial en la inducción de la apoptosis, vías de las caspasas. Enzimas y compuestos antioxidantes.