

ACTAS DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

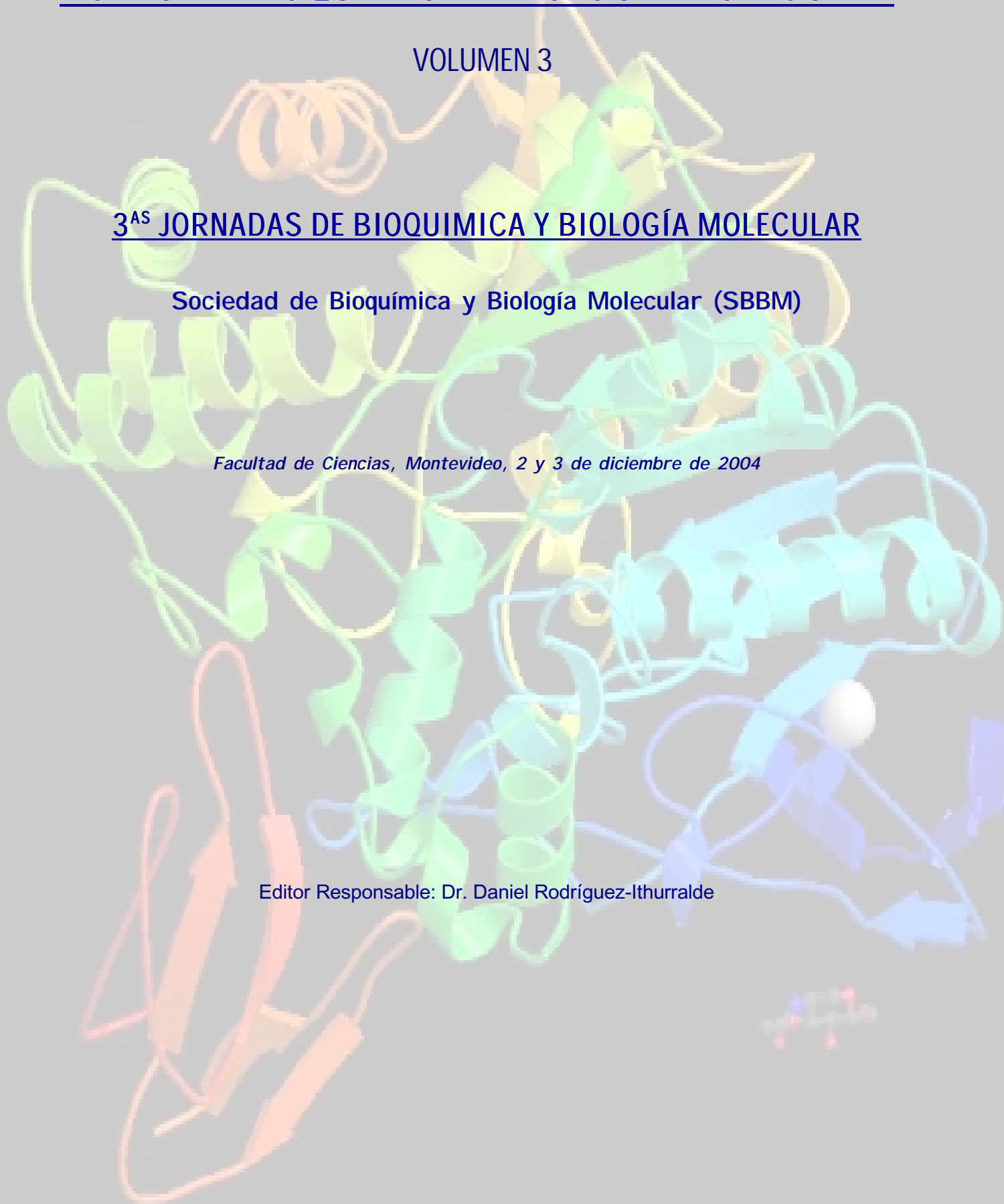
VOLUMEN 3

3^{AS} JORNADAS DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular (SBBM)

Facultad de Ciencias, Montevideo, 2 y 3 de diciembre de 2004

Editor Responsable: Dr. Daniel Rodríguez-Ithurralde



3^{as} JORNADAS DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Facultad de Ciencias, Montevideo, 2 y 3 de diciembre de 2004

Comité Organizador

Daniel Rodríguez-Ithurralde

Pedro Díaz

Carmen Manta

Adriana Maruri

Gaston Azziz

Deborah Keszenman

Sabina Vidal

Ricardo Ehrlich

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

Vocales

Cecilia Fernández

Sabina Vidal

Deborah Keszenman

Pedro Díaz

Wilner Martínez

Gastón Azziz

Leticia Pérez

Carmen Manta

José R. Sotelo-Silveira

Homero Rubbo

Gabriela Irazoqui

SE AGRADECE ESPECIALMENTE EL PATROCINIO A LAS JORNADAS DE:

AMSUD/Pasteur

Pan American Association of Biochemistry and Molecular Biology (PABMB)

AUSPICIAN

PEDECIBA

Facultad de Ciencias

Instituto Clemente Estable (IIBCE)

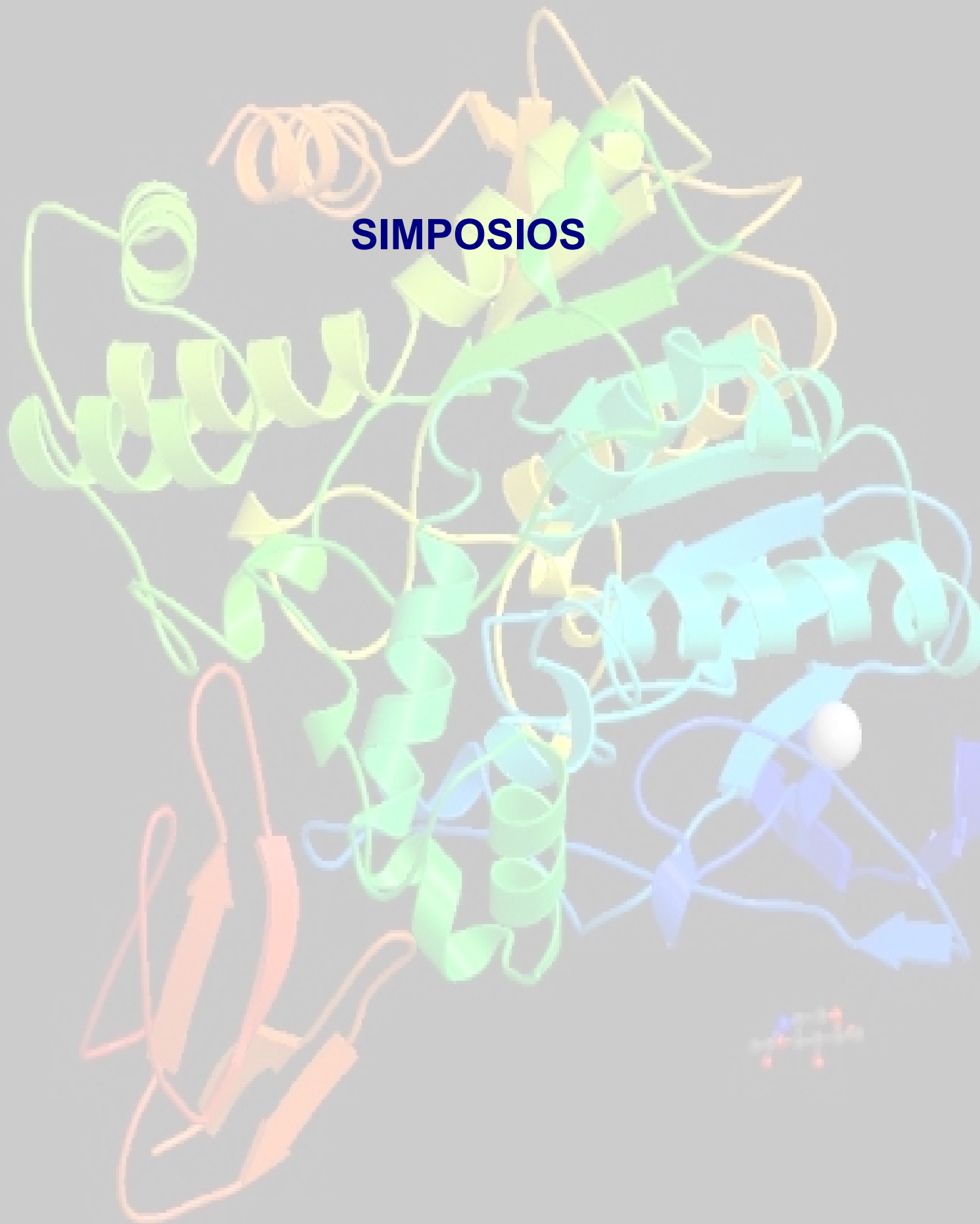
Facultad de Agronomía

Apoya



Equipamiento General e Insumos para Laboratorio

SIMPOSIOS



Simposio 1

Interacción Planta - Microorganismo

Moderadores: Alicia Arias y Margarita Sicardi

Mario Aguilar- Universidad Nacional de la Plata

“Factores genéticos y bioquímicos de *Rhizobium* requeridos para la tolerancia a estreses ambientales y la simbiosis”

Leticia Quagliotto - Departamento de Bioquímica, Instituto Clemente Estable (IIBCE)

“Producción de biomasa bacteriana y del antibiótico fenazínico de *Pseudomonas fluorescens* UP148 en diferentes medios y escalas de cultivo para la obtención de un inoculante de biocontrol en leguminosas forrajeras”

Marcos Montesano – Laboratorio de Biología Vegetal, Facultad de Ciencias (FC)

“Respuestas de defensa en papa inducidas por *Erwinia carotovora*”

Ariel Castro - Departamento de Producción Vegetal, Facultad de Agronomía (FA):

“Uso del análisis de QTL para el estudio de las relaciones entre resistencia en plántula y en planta adulta a roya estriada (causada por *Puccinia striiformis f.sp. hordei*) de cebada”

SIMPOSIO INTERACCIONES PLANTA-MICROORGANISMO

Moderadoras: Alicia Arias y Margarita Sicardi

En los últimos años se ha observado un gran interés a nivel mundial en el estudio de las interacciones planta-microorganismo, fundamentalmente con el objetivo de generar nuevos conocimientos básicos aplicables a los sistemas de producción sustentable.

Un ejemplo de interacción planta-microorganismo beneficioso es la simbiosis rizobio-leguminosa. El rizobio en el suelo debe soportar estreses ambientales; la tolerancia a esas condiciones adversas estaría relacionada con genes del metabolismo general de la célula. Mutantes en el gen *guaB* de *Rhizobium tropici* pierden la capacidad para crecer a altas temperaturas y son defectivos en su simbiosis con el hospedador *Phaseolus vulgaris*. Efectos de mutaciones en *guaB* sobre ésta y otras asociaciones indican que el requerimiento de ese gen está asociado al tipo de nódulo (M. Aguilar y col.).

Interacciones múltiples están implicadas en el control biológico empleando microorganismos asociados a las raíces. Una cepa nativa de *Pseudomonas fluorescens* aislada de *Lotus corniculatus* y antagonista de *Piheyium spp.* ha sido propuesta como modelo para la producción de un inoculante comercial para el control del damping-off (L. Quagliotto). Los aspectos relacionados con los mecanismos de defensa de las plantas frente a la presencia de un patógeno adquieren especial relevancia. Análisis de la respuesta de defensa de *Solanum tuberosum* inducida por la bacteria fitopatógena *Erwinia carotovora* son presentados por M. Montesano. Sus resultados incluyen identificación y caracterización de genes y moléculas señal que participan en la respuesta de defensa vegetal. Otro aspecto muy importante son las investigaciones dirigidas a la realización de mapeos genómicos en cebada de fuentes de resistencia a patógenos tales como la roya estriada (*Puccinia striiformis*). Resultados obtenidos recientemente abren nuevas posibilidades de aplicación del análisis de QTL y la selección asistida con marcadores para el desarrollo de genotipos resistentes (A. Castro y col.).

La finalidad de este Simposio es brindar la oportunidad de establecer vínculos entre grupos trabajando en diferentes aspectos de la interacción planta-microorganismo y fomentar la discusión de resultados de investigaciones realizadas en ecosistemas naturales y agrícolas, especialmente en áreas donde la información disponible es escasa.

FACTORES GENÉTICOS Y BIOQUÍMICOS DE RHIZOBIUM REQUERIDOS PARA LA TOLERANCIA A ESTRESSES AMBIENTALES Y LA SIMBIOSIS

Aguilar, O.M., Collavino, M., Muglia, C. y Riccillo, P.M.

Instituto de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina
aguilar@biol.unlp.edu.ar

Los microorganismos en general, y en particular las bacterias del suelo tales como los rizobios deben enfrentar situaciones ambientales adversas tales como la acidez, alta temperatura, y el estrés hídrico entre otras. Para enfrentarlas han desarrollado diversos mecanismos celulares que tratan de neutralizar los efectos adversos de esas condiciones extremas permitiéndoles así asegurar su persistencia. Otro grupo de bacterias patógenas también han desarrollado mecanismos muy especializados para superar barreras naturales y adversas en el hospedador, que les permiten acceder a nichos particulares y desarrollar enfermedades. Las enterobacterias patógenas pertenecientes a la especie *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* representan a este grupo.

En nuestros estudios sobre los determinantes de la tolerancia intrínseca a estreses ambientales en *Rhizobium tropici* hemos demostrado que dos genes pertenecientes al metabolismo general de la célula, son importantes para que *R. tropici* tolere las condiciones de bajos pHs y alta temperatura, respectivamente. Hemos demostrado que mutantes en el gen *guaB* de *R. tropici* – codifica para la inosina monofosfato deshidrogenasa de la vía de síntesis de guanina- pierden la capacidad para crecer a temperaturas altas y resultan defectivos en su simbiosis con el hospedador *P. vulgaris* (poroto). Los nódulos inducidos por estos mutantes presentan un desarrollo incompleto, los rizobios no son liberados desde el hilo de infección a la célula del nódulo. En ensayos de complementación del mutante con construcciones en las cuales la expresión del gen *guaB* se encuentra bajo el control de los promotores simbióticos *nodA*, *bacA* y *nifH* hemos demostrado que el requerimiento de un gen funcional *guaB* es necesario desde las etapas tempranas de la interacción con el hospedador. Además, se estudió el efecto de mutaciones en el gen *guaB* sobre otras asociaciones en que participan hospedadores distintos a *P. vulgaris*. Nuestros resultados indican que el requerimiento de *guaB* está asociado al tipo de nódulo: En aquellas leguminosas caracterizadas por formar nódulos indeterminados el fenotipo simbiótico es igual al de la cepa silvestre.

Por otro lado, estudiamos mutantes de *R. tropici* que han perdido la capacidad de sostener el crecimiento en medio ácido. El análisis molecular de estos mutantes defectivos demostró que la alteración reside en el *gshB* el cual codifica para la segunda enzima – la glutatión sintetasa - de

la vía biosintética del glutatión. Nuestros datos de niveles de K^+ y H^+ intracelulares parecen indicar que la incapacidad de sintetizar glutatión afectaría el mantenimiento de niveles superiores de K^+ intracelular requeridos en esas circunstancias fisiológicas que se encuentra mediado a través de “puertas” de salida de K^+ dependientes de glutatión. Hemos examinado el patrón de expresión del gen *gshB* en *R. tropici* y hemos encontrado que se encuentra activado por la acidez del medio y por otros factores estresantes tales como luz UV. Los datos del análisis de la región 5' - de *gshB* indicaron que la secuencia promotora muestra una alta similitud con promotores regulados en la respuesta SOS, y sugieren que el gen *gshB* formaría parte de una red de respuesta a estreses que provocan daños al ADN.

El significado de estos resultados dentro del marco de los progresos que experimenta el entendimiento de la regulación de la respuesta a estreses, tales como la participación de pequeños RNAs, serán objeto de discusión durante esta presentación.

PRODUCCIÓN DE BIOMASA BACTERIANA Y DEL ANTIBIÓTICO FENAZÍNICO DE *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* UP148 EN DIFERENTES MEDIOS Y ESCALAS DE CULTIVO PARA LA OBTENCIÓN DE UN INOCULANTE DE BIOCONTROL EN LEGUMINOSAS FORRAJERAS

Leticia Quagliotto

Laboratorio de Ecología Microbiana. IIBCE.

El control químico de fitopatógenos causantes de pérdidas en la producción de leguminosas forrajeras debidas a enfermedades de implantación, está limitado por la resistencia a pesticidas, los costos de aplicación y efectos adversos sobre el ambiente y la salud humana y animal. El control biológico se presenta como una tecnología innovadora, alternativa al uso de agroquímicos y no agresiva para el medio ambiente, válida en un sistema de control integrado y que puede ser rápidamente aplicada por los productores agropecuarios. Resultados previos utilizando tres cepas de *Pseudomonas fluorescens* demostraron su potencial para ser usadas en el biocontrol del damping-off producido por *Pythium* spp. en *Lotus* y alfalfa. La cepa UP148 produce un compuesto antifúngico derivado de la fenazina, cuya participación en su acción antagónica fue demostrada. La formulación de un producto basado en un agente de biocontrol debe ser compatible con los requerimientos del microorganismo y las prácticas agrícolas regulares. Su aplicación comercial es posible si la producción de biomasa bacteriana se hace a bajo costo. Por otra parte, el género *Pseudomonas* se caracteriza por la gran diversidad de sustratos que es capaz de utilizar. El objetivo de este trabajo fue utilizar *P. fluorescens* UP148 como modelo para la producción de un inoculante de aplicación comercial. Para ello, se evaluó el crecimiento en medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono y nitrógeno (sacarosa, glicerol, extracto de malta, extracto de levadura, suero de queso desecado, etc). El medio M2 (con sacarosa) promueve una producción de biomasa comparable a la de los medios estándares (KB o PPM) usados en el laboratorio. Se seleccionó este medio y, para estudios posteriores, se reemplazó sacarosa (M2S) por glicerol (M2G) para comparar el crecimiento bacteriano y la producción de antibióticos en ambos. Se realizó una prueba piloto creciendo la cepa UP148 en fermentador industrial conteniendo 10 L de medio, bajo agitación, temperatura y pH controlados. La producción de biomasa fue similar en todos los medios, observándose un sensible aumento del rendimiento cuando se usó glicerol. Ensayos duales en placas con *Pythium debaryanum* (Py) en presencia de *P. fluorescens* UP148 (Ps) mostraron crecimiento micelial hasta el borde en M2G o M2S, tanto en los controles como en presencia de *P.*

fluorescens UP148. En medio mínimo para *Pseudomonas* (MMPs) el crecimiento fue más lento cuando la bacteria estaba presente. En KB o PPM no se observó crecimiento del micelio, tanto para las placas inoculadas con la cepa UP148 como para los controles. Con 1 o 2 ml de sobrenadante de cultivos bacterianos en diversos medios incluidos en agar, se observó crecimiento de *P. debaryanum* en todos los casos, excepto en PPM. Utilizando cantidades de extractos orgánicos equivalentes a 10 o 5 ml de cultivos en KB, PPM o MMPs no hubo crecimiento de *Pythium*. Con un volumen equivalente a 10 ml de cultivo en M2G o M2S no se observó crecimiento micelial, pero sí cuando se utilizaron 5 ml. A partir de extracciones orgánicas de sobrenadantes de cultivos en los diferentes medios, sometidos a separación por HPLC de fase reversa, se obtuvo el antibiótico fenazínico producido por *P. fluorescens* UP148 en todos los casos. Cabe destacar, sin embargo, una producción mínima del compuesto en el medio M2S. Se realizaron ensayos en almácigas para determinar la protección de plántulas de *Lotus corniculatus* frente a la infección causada por *P. debaryanum* en condiciones controladas. Los tratamientos consistieron en la inoculación con *P. debaryanum* en presencia de la cepa UP148 crecida en cinco medios de cultivo, un control de germinación (sin Py, sin Ps) y un control de enfermedad (con Py, sin Ps). La variable evaluada fue el número de plantas emergidas a los 8, 10, 14, 16, 18 y 25 días después de la siembra. Resultados de un experimento mostraron que, 25 días después de la siembra, emergieron y permanecieron sanas el 23 % de las semillas inoculadas sólo con el patógeno. En presencia de UP148 previamente crecida en MMPs o M2S, no hubo diferencias significativas con el control de enfermedad. En los tratamientos PPM y M2G la inoculación con *Pseudomonas* mejoró el porcentaje de emergencia, aunque no significativamente (30 %). En el tratamiento KB las plantas sanas alcanzaron el 45 %. En este experimento la falta de efecto protector observada se explicaría por el bajo número de UFC/semilla en los inóculos iniciales. En los tratamientos MMPs o M2S el número de UFC/semilla resultó por debajo del valor aceptado como umbral para un biocontrol efectivo (10^6 UFC/semilla). En otro experimento realizado con la misma cantidad de inóculo en todos los tratamientos (10^6 UFC/semilla), el nivel de protección promedió el 25 %, siendo el número de plantas emergidas sanas significativamente mayor que en el control de enfermedad (10 %), en todos los casos. Los resultados obtenidos hasta ahora sugieren que el medio M2G es adecuado para la producción de biomasa bacteriana a escala industrial. En este medio se observó la producción del antibiótico fenazínico característico de la cepa UP148. El efecto protector de enfermedad es independiente del medio de cultivo utilizado para crecer el inóculo bacteriano y de la producción del antibiótico en el mismo.

RESPUESTAS DE DEFENSA EN PAPA INDUCIDAS POR *Erwinia carotovora*.

Marcos Montesano ^{1,2}

¹ Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay.

² Departamento de Biología Molecular-Unidad Asociada a Facultad de Ciencias, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable-Universidad de la República, Uruguay.

Las plantas perciben la presencia de patógenos a través de moléculas llamadas “elicitors”, las cuales derivan del patógeno o son producidas por su acción patogénica. Una vez percibido el patógeno, las plantas desencadenan una serie de reacciones bioquímicas las cuales activan y/o constituyen una respuesta de defensa. Estas respuestas bioquímicas inducidas incluyen: i) la biosíntesis de moléculas que actúan como señales de defensa (ej. etileno, jasmonatos, ácido salicílico) que regulan la expresión génica, ii) la inducción/represión de genes que actúan en diferentes escenarios del metabolismo celular (ej. biosíntesis de compuestos de pared celular, fotosíntesis), iii) la inducción de genes cuyos productos actúan directamente sobre el patógeno (ej. proteínas PR) o participan en la biosíntesis de compuestos tóxicos para el patógeno (ej. fitoalexinas). Los resultados a presentar muestran un estudio que analiza respuestas de defensa en *Solanum tuberosum* (papa) inducidas por la bacteria fitopatogénica *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, responsable de la enfermedad podredumbre blanda (soft rot). Los resultados incluyen i) la identificación y caracterización de genes nuevos que participan en respuestas de defensa vegetal, ii) la caracterización de genes PR durante la respuesta de papa a elicitors producidos por *E.c. carotovora*, iii) la caracterización de moléculas que actúan como señales de defensa en papa.

USO DEL ANÁLISIS DE QTL PARA EL ESTUDIO DE LAS RELACIONES ENTRE RESISTENCIA EN PLÁNTULA Y EN PLANTA ADULTA A ROYA ESTRIADA (CAUSADA POR *PUCCINIA STRIIFORMIS F.SP. HORDEI*) DE CEBADA

Castro, A.¹, Corey, A.², Chen, X.³, Fillichkin, T.², Hayes, P.M.², Johnson, M.⁴, Sandoval-Islas, S.⁵, Vivar, H.⁶.

¹Facultad de Agronomía, UDELAR; ²Oregon State University; ³ USDA, Washington State University; ⁴Montana State University; ⁵Colegio de Posgraduados, Chapingo; ⁶ICARDA/CIMMYT

La roya estriada de la cebada es una enfermedad que ha causado severas pérdidas en todo el mundo. La resistencia genética a esta enfermedad puede clasificarse en dos grandes grupos: a) resistencia en plántula, con reacción de hipersensibilidad, de tipo cualitativo y con especificidad racial, y b) resistencia en planta adulta, cuantitativa y sin clara especificidad racial. El primer tipo de resistencia presenta una mayor reducción en el desarrollo de la infección mientras que el segundo tipo presenta una mayor durabilidad teórica. El presente trabajo forma parte de un esfuerzo de mapeo genómico de fuentes de resistencia a roya estriada e introgresión de éstas a una base genética adaptada, con énfasis en resistencia en planta adulta. En este estudio se mapearon genes confirmando resistencia al estado de plántula en dos poblaciones de líneas dobles haploides de cebada en las cuales se había mapeado previamente resistencia en planta adulta. Una de las poblaciones (CB) se obtuvo de la cruce Cali-sib/Bowman, y la otra (SG) de la cruce Shyri/Galena. La población CB fue inoculada con un aislamiento correspondiente a la raza 24 (prevalente en las Américas), y la población SG con tres aislamientos definidos. La reacción en plántula en ambos casos se ajustó a una relación 3:1 (susceptible:resistente), lo que indica que dos genes son requeridos para la resistencia. Este resultado impide el mapeo directo de la resistencia utilizando la reacción como marcador. Al tratarse de una variable discreta los programas comunes de mapeo de QTL tampoco podían ser utilizados. Los efectos de QTL y los niveles de significación fueron estimados utilizando una combinación de procedimientos de mapeo de QTL y de análisis de regresión logística, tomando en cuenta la distribución binomial de la variable de respuesta. En la primera parte del análisis se detectaban regiones genómicas candidatas, las cuales eran utilizadas para realizar un análisis similar a un análisis de genes candidatos. Los genotipos de los marcadores que flanqueaban la región candidata eran utilizados como variables independientes (los recombinantes se eliminaron), obteniendo estimadores conservadores de los efectos de QTL. Dos QTL de resistencia, uno en el cromosoma 4H y otro en el cromosoma 6H, fueron mapeados en CB, y en ambos casos Cali-sib aportó los alelos de resistencia. En el caso de SG también se detectaron

dos QTL de resistencia, uno en el cromosoma 1H y otro en el 6H, con Shyri contribuyendo los alelos de resistencia. En el caso de SG (donde se testearon varios aislamientos) no se detectó interacción QTL x aislamiento. En ambas poblaciones los QTL se mapearon en las mismas regiones genómicas que se habían mapeado QTL de resistencia en planta adulta (Figura 1).

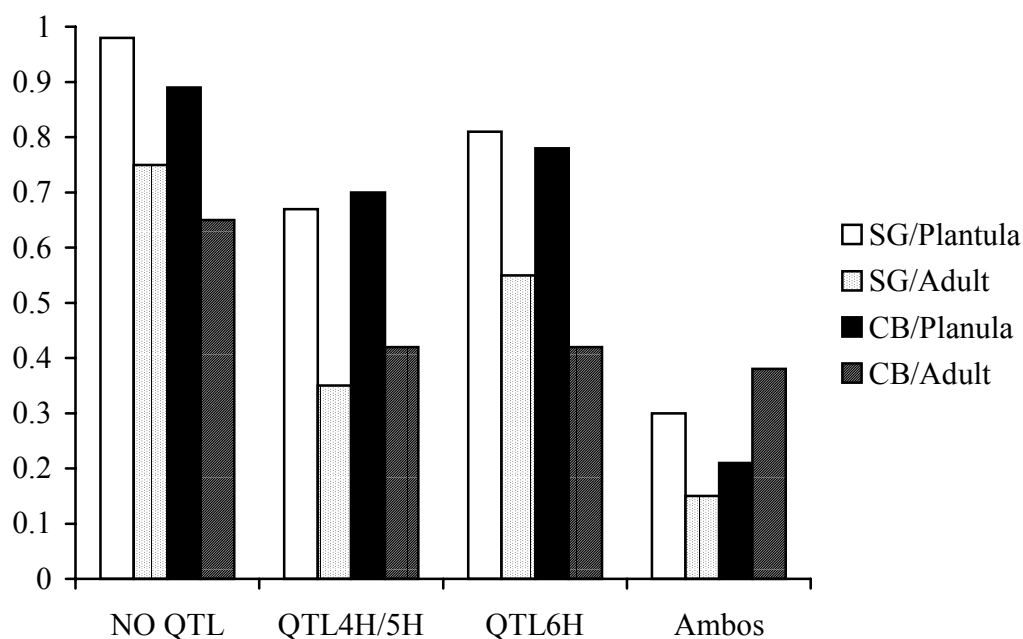


Figura 1. Medias minimo-cuadráticas de la probabilidad de ocurrencia de la enfermedad en plántula y severidad en planta adulta de acuerdo a la presencia o no de alelos resistentes en las regiones de QTL en los cromosomas 4H y 6H (CB), y 1H y 6H (SG).

En una segunda etapa de éste proyecto se desarrolló una pirámide de alelos resistentes con una población de 115 líneas dobles haploides obtenidas a partir de una cruce compleja que incluía la variedad Orca (proveniente de CB y con el QTL en el cromosoma 4H), la línea D1-72 (proveniente de SG y con el QTL de resistencia en el cromosoma 1H). El cruzamiento también incluía a la variedad adaptada y susceptible Harrington. La población fue evaluada fenotípicamente por infección en planta adulta en Toluca durante tres años, y por infección en plántula en invernadero con diferentes aislamientos de roya estriada. Las 115 líneas fueron caracterizadas genotípicamente con SSR capaces de discriminar entre padres en las regiones genómicas de interés. Los resultados confirmaron el efecto de las regiones analizadas en los

niveles de infección tanto en plántula como en planta adulta. En planta adulta los QTL se comportaron de manera aditiva (al igual que había ocurrido en las poblaciones de mapeo originales). Para resistencia en plántula, la presencia de alelos de resistencia en ambas regiones (cromosomas 1H y 4H) redujo significativamente la probabilidad de ocurrencia de la enfermedad (Figura 2). Los resultados obtenidos permiten ser razonablemente optimistas respecto a las posibilidades de aplicación del análisis de QTL y la selección asistida con marcadores para el desarrollo de genotipos resistentes. Por otra parte éstos resultados son las base de nuevos trabajos destinados a estudiar la genética de los mecanismos específicos de las resistencias cualitativas y cuantitativas.

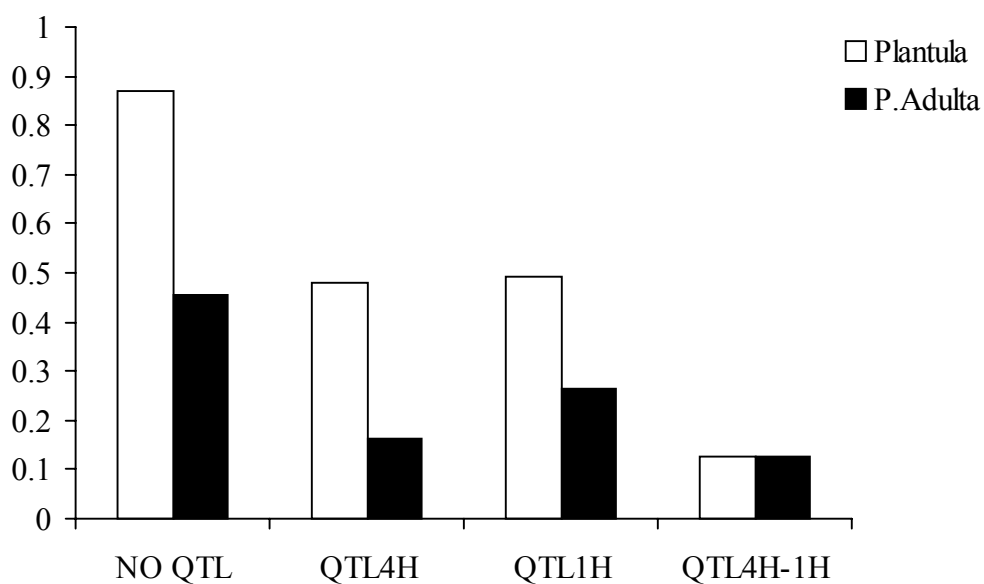


Figura 2. Medias minimo-cuadráticas de la probabilidad de ocurrencia de la enfermedad en plántula y severidad en planta adulta de acuerdo a la presencia o no de alelos resistentes en las regiones de QTL en los cromosomas 1H y 4H en la población de pirámides de alelos resistentes.

Simposio 2

Bioquímica y Biología Molecular de la Reproducción

Moderadores: Elsa Garófalo y Nibia Berois

Elize van Lier – Fisiología Animal, FA:

"Diferencias sexuales en la respuesta al estrés en ovinos: sensibilidad adrenal a los esteroides sexuales"

Celia Tasende – Departamento de Bioquímica, Facultad de Veterinaria (FV):

"Función luteal subnormal en ovinos: mecanismos moleculares"

Ana Meikle - Departamento de Bioquímica, (FV):

"Crecimiento embrionario y reconocimiento materno en bovinos"

Adriana Geisinger - Departamento de Biología Molecular, (IIBCE):

"Espermatogénesis en mamíferos: Identificación y caracterización de genes de expresión diferencial"

SIMPOSIO BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR DE LA REPRODUCCION

Moderadoras: Elsa G. Garófalo y Nibia Berois

El éxito de la reproducción depende de la coordinación de intrincados mecanismos de señales moleculares y complejos eventos celulares que llevan a la producción y emisión de gametos maduros y competentes en machos y hembras, al comportamiento sexual diferenciado para alcanzar la fecundación, al reconocimiento materno para el normal desarrollo del embrión y al comportamiento maternal y lactancia para la supervivencia del recién nacido. Las hormonas esteroideas gonadales (estrógenos y progesterona en hembras y testosterona en machos) son las señales moleculares más trascendentes en el desencadenamiento y control de los procesos reproductivos, tanto a nivel central Hipotálamo - Hipofisario como a nivel periférico en gónadas y tracto reproductivo.

Los esteroides sexuales actúan fundamentalmente a través de receptores nucleares, cuyos complejos hormona-receptor funcionan como factores de transcripción, regulando la expresión génica y ejerciendo el control del reloj celular en los diferentes órganos y tejidos involucrados en la reproducción. El mecanismo de acción de las hormonas sexuales constituye un excelente paradigma para la investigación y el análisis de la interfase entre eventos bioquímicos y de biología molecular y entre estos y cambios celulares y tisulares.

Teniendo en cuenta el enfoque anterior, en el presente simposio se discutirán aspectos bioquímicos y de biología molecular que están vinculados a la espermatogénesis, al comportamiento sexual diferenciado, al ciclo estral y función lutea subnormal y al reconocimiento materno de la preñez.

DIFERENCIAS SEXUALES EN LA RESPUESTA AL ESTRÉS EN OVINOS: SENSIBILIDAD ADRENAL A LOS ESTEROIDES SEXUALES

Elize van Lier

Departamento de Producción Animal y Pasturas, Facultad de Agronomía
vanlier@adinet.com.uy

El estrés provoca un efecto adverso sobre la reproducción en ambos sexos para la mayoría de las especies (1). Este efecto es diferencial ya que depende del sexo, aunque en rumiantes hay escasos reportes al respecto. Se ha propuesto que las diferencias sexuales en la función del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) son debidas, en parte, a los esteroides gonadales circulantes (2). Estos pueden ejercer sus efectos sobre diferentes niveles del eje HHA, siendo los efectos centrales (hipotálamo – hipófisis) los más aceptados. Hemos estudiado la respuesta adrenal – en términos de secreción de cortisol – a la Hormona Adrenocorticotropa (ACTH) en ovinos hembras y machos, enteros y castrados (3). La respuesta de la adrenal a la ACTH fue afectada por el sexo: las hembras secretaron más cortisol que los machos. El efecto de la gonadectomía sobre la respuesta a la ACTH fue inverso en los sexos; machos castrados aumentaron la secreción de cortisol y hembras castradas la disminuyeron comparado con los animales enteros (Fig. 1).

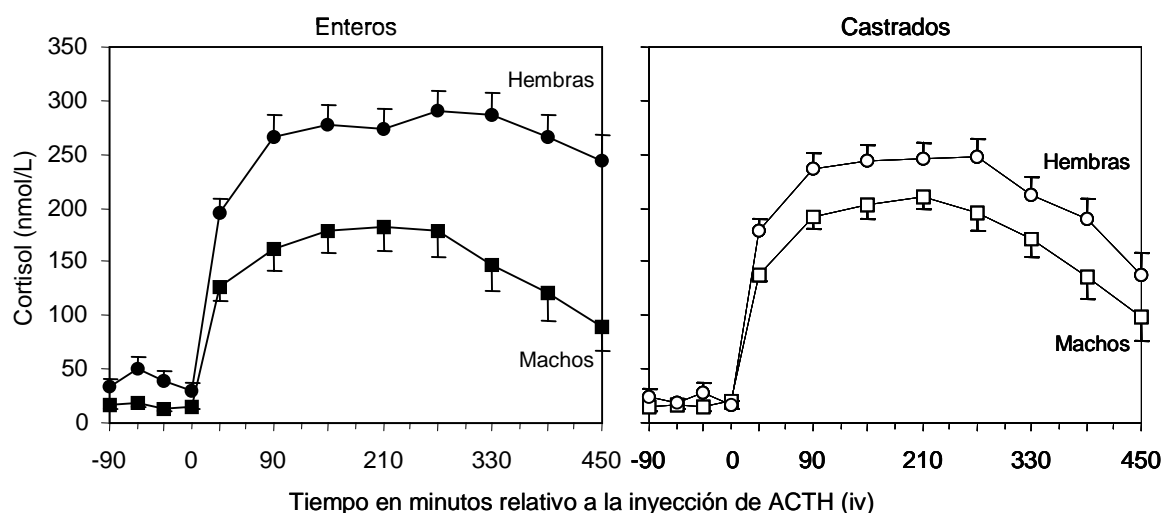
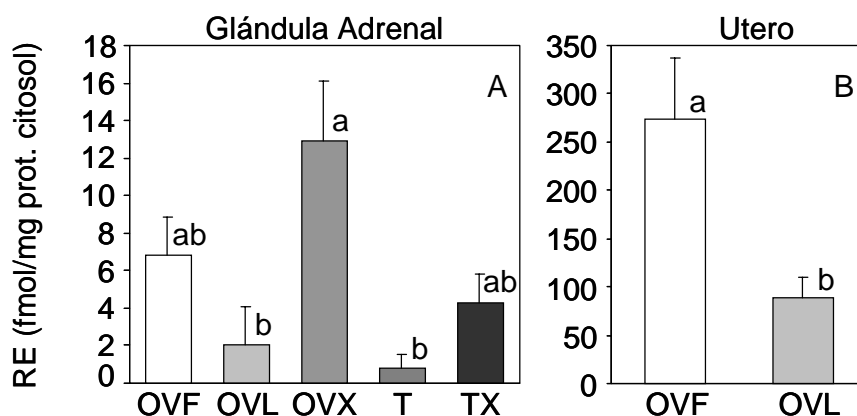


Figura 1: Niveles de cortisol (media \pm SEM) pre y post inyección de ACTH (iv) en ovinos machos y hembras, enteros y castrados (Ref. 3).

Esta secreción diferencial de cortisol de acuerdo al sexo y estado gonadal demuestra que las diferencias están dadas también a nivel periférico, ya que la ACTH actúa directamente sobre la corteza adrenal. Además, estos diferentes niveles de cortisol en los grupos estudiados estarían

dadas por los esteroides sexuales circulantes actuando directamente sobre la glándula adrenal. La respuesta tisular a una hormona está dada por la presencia de sus receptores específicos y no se han descrito los receptores de esteroides sexuales en la glándula adrenal ovina. En consecuencia caracterizamos el receptor de estrógenos (RE) por ensayos de unión (Fig. 2), inmunohistoquímica y su transcripto (mARN de RE α) por hibridización en solución (Fig. 3) en la glándula adrenal de ovinos. No se encontraron niveles detectables de receptor de



progesterona (RP) por ensayo de unión, pero se determinó el mRNA de RP por hibridización en solución (Fig. 4). No se pudieron determinar niveles detectables de PR y receptor de andrógeno por inmunohistoquímica.

Figura 2: Concentraciones de RE citosólico (media \pm SEM) en gándula adrenal (A) y útero (B) en ovinos. Ovejas en fase folicular (OVF), en fase luteal (OVL), y ovariectomizadas (OVX), carneros enteros (T) y castrados (TX) (a,b: $P < 0.05$) (Ref. 4).

Se encontró inmunotinción positiva a RE α tanto en la corteza adrenal como en la médula. Demostramos la presencia de RE en la glándula adrenal ovina y su concentración fue diferente entre sexos y estatus gonadal (Fig 2A). El patrón observado en la adrenal de las hembras sugiere una regulación similar a la del útero donde se observó una regulación en más por los estrógenos y en menos por la progesterona (Fig. 2B) (5,6). El incremento de RE en los animales gonadectomizados confirma que la expresión de RE en la adrenal está regulada por el ambiente esteroideo.

No se encontraron diferencias en los niveles de mARN de RE α en la adrenal (Fig. 3A). Pero en el útero, como era de esperar, RE α mARN fue mayor en las ovejas en fase folicular comparado con las otras ovejas (Fig. 3B) (5,6), lo que explica la diferencia en RE uterino entre las ovejas en fase folicular y luteal. Sin embargo, los niveles de RE α mARN en la glándula adrenal no explicaron las diferencias encontradas en RE entre grupos, por lo que las diferencias en el receptor probablemente sean debidas a factores post-transcripción o de reciclaje. Aunque la regulación de RE en la glándula adrenal parece depender de los esteroides sexuales como en el útero, la discrepancia entre la tasa de transcripción y el contenido de proteína de RE en la adrenal sugiere especificidad tisular para la regulación de RE.

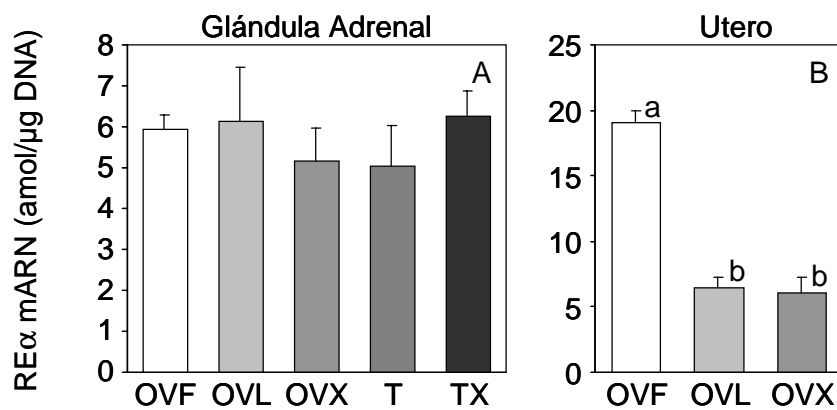


Figura 3: Concentraciones (media \pm SEM) de RE α mARN en la adrenal (A) y en el útero (B) de ovejas en fase folicular (OVF), en fase luteal (OVL), y ovariectomizadas (OVX), carneros enteros (T) y castrados (TX) (a,b: P<0.05) (Ref. 4).

Medimos PR mARN ya que es considerado como marcador de actividad estrogénica, al menos en el útero (7). La gonadectomía tuvo un efecto opuesto sobre los niveles adrenales de RP mARN en los dos sexos, disminuyendo los niveles en las ovejas ovariectomizadas y aumentándolos en los carneros castrados (Fig. 4A). En el útero, RP mARN fue mayor en las ovejas en fase folicular comparado con las otras ovejas (Fig. 4B) consistente con el aumento de la actividad estrogénica descrito previamente (8). Aunque no tan marcado como en el útero, el PR mARN adrenal tendía a ser mayor en las ovejas en fase folicular, sugiriendo una inducción de PR por estrógenos en la adrenal.

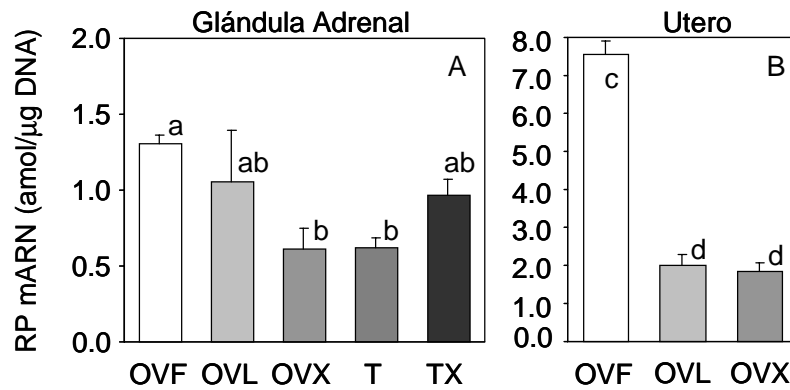


Figura 4: Concentraciones (media \pm SEM) de RP mRNA en la adrenal (A) y el útero (B) de ovejas en fase follicular (OVF), en fase luteal (OVL), y ovariectomizadas (OVX), carneros enteros (T) y castrados (TX) (a,b: $P < 0.1$; c,d: $P < 0.05$) (Ref. 4).

En resumen, hemos demostrado un efecto periférico del sexo y estado gonadal sobre la secreción de cortisol en ovinos. Sugerimos que esta respuesta diferencial de la adrenal depende en parte a una sensibilidad distinta – determinada por los contenidos de receptores – a los esteroides gonadales. Se han sugerido posibles mecanismos por los cuales estrógenos podrían afectar la esteroidogénesis adrenal: 1) influyendo la sensibilidad de la adrenal a ACTH, 2) aumentando en la disponibilidad de colesterol (precursor) al afectar la proteína de regulación aguda de la esteroidogénesis (StAR), y/o 3) estimulando las enzimas de síntesis de cortisol. Actualmente estamos investigando si podemos manipular la secreción de cortisol con los esteroides sexuales en modelos animales gonadectomizados.

- [1] Dobson H, Tebble JE, Smith RF, Ward WR. **2001** Is stress really that important? *Theriogenology* 55:65-73.
- [2] Handa RJ, Burgess LH, Kerr JE, O'Keefe JA. **1994** Gonadal steroid hormone receptors and sex differences in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Horm Behav* 28:464-476.
- [3] Van Lier E, Pérez-Clariget R, Forsberg M. **2003a** Sex differences in cortisol secretion after administration of an ACTH analogue in sheep during the breeding and non-breeding season. *Anim Reprod Sci*, 79:81-92.
- [4] Van Lier E, Meikle A, Bielli A, Åkerberg S, Forsberg M, Sahlin L. **2003b** Sex differences in oestrogen receptor levels in adrenal glands of sheep during the breeding season. *Dom Anim Endocr*, 25:373-387.

- [5] Rexroad CE Jr. **1981a** Estrogen and progesterone binding in the myometrium of the ewe. I. During the estrous cycle. *J Anim Sci* 53:1057-1069.
- [6] Rexroad CE Jr. **1981b** Estrogen and progesterone binding in the myometrium of the ewe. II. Regulation by estradiol and progesterone. *J Anim Sci* 53:1070-1076.
- [7] Clark JH, Peck EJ Jr. **1979** Control of steroid receptor levels and steroid antagonism. In: *Female sex steroids, receptors and function*. Gross F, Grumbach MM and Labhart A (eds). Springer Verlag, Berlin.
- [8] Spencer TE, Bazer FW. **1995** Temporal and spatial alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe. *Biol Reprod* 5:1527-1543.

RECONOCIMIENTO MATERNO DE LA PREÑEZ EN BOVINOS

Ana Meikle

Bioquímica, Facultad de Veterinaria
Email: anamei@adinet.com.uy

La vaca lechera de hoy es el producto de varias décadas de selección a favor de la habilidad de producir grandes volúmenes de leche (producción nacional 1991 - 2001: 730 a 1132 millones de litros, MGAP). Esto ha modificado el metabolismo del animal y el flujo de nutrientes a tejidos y órganos. La partición de nutrientes orientada hacia la glándula mamaria ha determinado que el sistema reproductivo sea relegado a un segundo plano con la consecuente disminución de la fertilidad del rodeo lechero a nivel mundial.

La causa más importante de la baja fertilidad en bovinos lecheros es la mortalidad embrionaria temprana. Cerca del 40 % de las preñeces fallan alrededor del momento del reconocimiento materno de la gestación (1), proceso por el cual se inhibe la regresión del cuerpo lúteo (luteólisis) y se mantiene la secreción de progesterona (Figura 1). La señal embrionaria es el interferon- τ (IFN- τ) que altera la expresión génica del endometrio y modifica la secreción de prostaglandina F 2α (PGF 2α) endometrial inhibiendo así la luteólisis. Se ha sugerido que la mortalidad embrionaria es la consecuencia de un diálogo molecular ineficiente entre el ambiente materno y el embrión, es decir, la madre no reconoce las señales embrionarias cuya finalidad es evitar la luteólisis y por lo tanto no se mantiene la preñez. El desarrollo de estrategias para disminuir la mortalidad embrionaria debe estar basado en la comprensión de las señales bioquímicas entre el concepto y la madre (mecanismos moleculares y celulares del reconocimiento materno de la preñez).

La luteólisis es la consecuencia de la retroalimentación positiva entre la secreción uterina de PGF 2α y la oxitocina hipofisiaria/luteal. El momento de la luteólisis está modulado por los estrógenos y la progesterona, principales reguladores de la función uterina. Los estrógenos estimulan la concentración endometrial de receptores de oxitocina, mientras que la progesterona los inhibe (2).

LUTEOLISIS

RECONOCIMIENTO MATERNO DE LA PREÑEZ

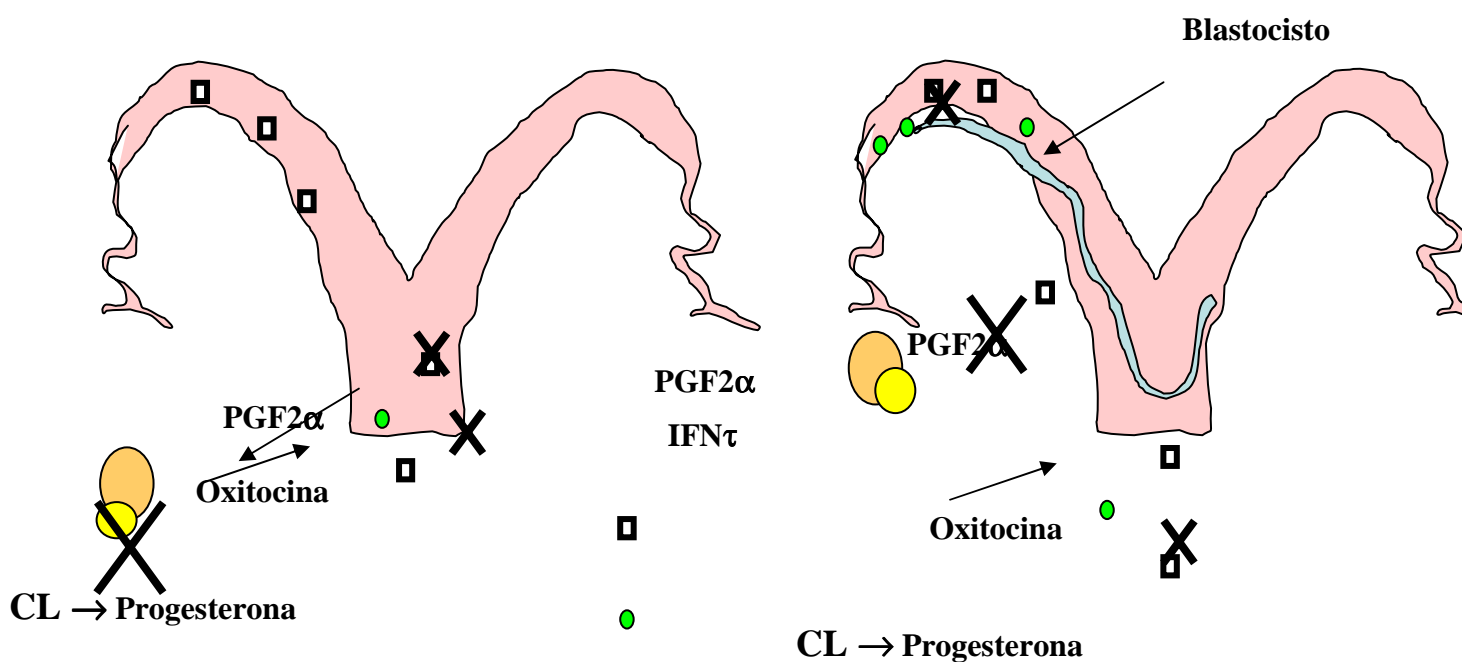


Figura 1. Esquema de mecanismo luteolítico vs reconocimiento materno de la preñez. Ver texto para la explicación. CL= cuerpo lúteo.

Los estrógenos y la progesterona actúan a través de sus receptores específicos (RE y RP respectivamente) cuya concentración varía a lo largo del ciclo estral. En la Figura 2 se muestra que las concentraciones de los transcritos de ambos receptores son altas alrededor del estro (Día 0), de acuerdo con el rol inductivo de los estrógenos sobre ambos receptores. Durante la fase lútea la progesterona inhibe la expresión de ambos receptores (3), haciendo al útero cada vez más refractario a subsiguientes acciones de progesterona. La pérdida de sensibilidad uterina a la progesterona permite la expresión de proteínas receptoras antes inhibidas, como lo son los receptores oxitocina endometriales. Esto llevaría al establecimiento del feedback positivo entre la oxitocina y la PGF2α que provoca la destrucción del cuerpo lúteo.

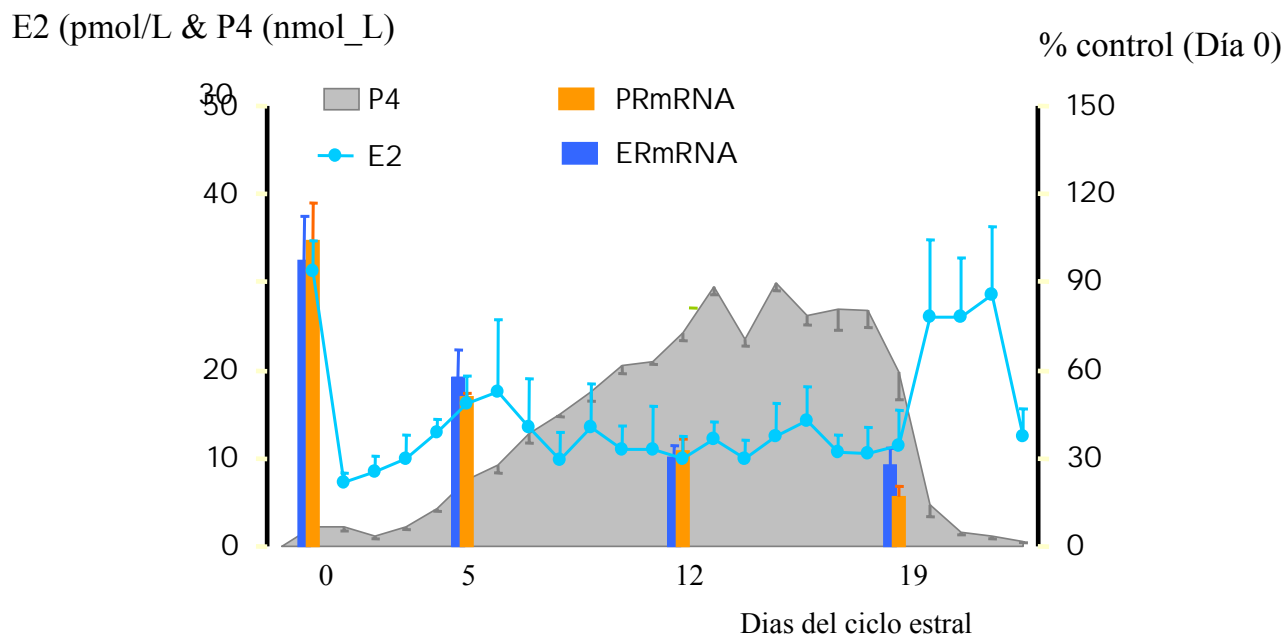


Figura 2. Concentraciones plasmáticas de estradiol (E2) y progesterona (P4) y los transcritos de receptor de estrógenos, progesterona (ERmRNA, PRmRNA). El contenido de transcritos se expresan como porcentajes del control (Día 0). (Ref 4).

La presencia del embrión modifica la expresión génica endometrial para evitar la luteólisis: disminuye los contenidos de RE mRNA, pero no modifica los de RP (5). Por otro lado, utilizando técnicas inmunohistoquímicas (6), se observó en el epitelio luminal -principal responsable de la secreción luteolítica de $\text{PGF2}\alpha$ -que las vacas preñadas presentaron más RP y menos RE (Figura 2). Los datos muestran que la acción del $\text{IFN-}\tau$ es de tipo celular específico. Además, la acción inhibitoria sobre el RE sería transcripcional, mientras que la regulación de RP sería posttranscripcional.

La disminución en las concentraciones de RE provocada por el embrión sería responsable de una menor sensibilidad uterina a la oxitocina que inhibiría la secreción de $\text{PGF2}\alpha$ (Figura 1). Esta acción del embrión se vería reforzada por mantener la expresión de RP que tiene una acción inhibitoria sobre los receptores de oxitocina.

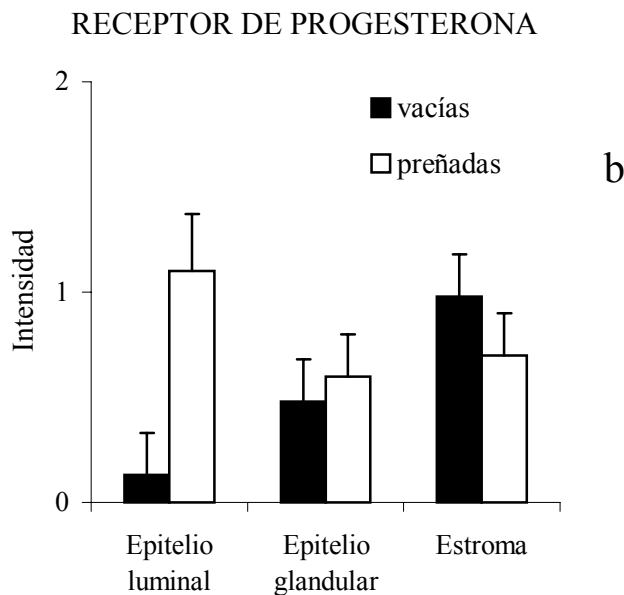
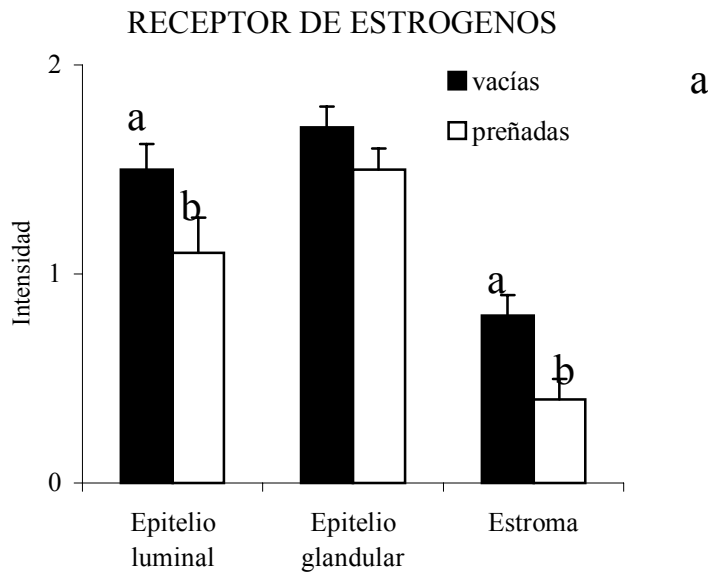


Figura 3. Determinación de Receptor de Estrógenos y de Progesterona por inmunohistoquímica medidos por intensidad de coloración específica en diferentes tipos celulares del endometrio de vacas ciclando (vacías) y preñadas. Diferentes letras difieren $P \leq 0.05$. (Ref 6)

El diálogo materno-embrionario es preciso; es imprescindible que el blastocisto pueda expandirse rápidamente (elongación) y así pueda enviar una señal al ambiente materno que evite la luteólisis (Figura 1). El blastocisto sufre una fase de alargamiento intenso: de una forma esférica de 3 mm al día 13 post ovulación a formas filamentosas de aprox. 25 cm al día

17. Si al día 17 la señal embrionaria no fue recibida por el útero, se provocará la luteólisis y el embrión no sobrevivirá. Actualmente estamos investigando los factores de crecimiento embrionario más importantes y el efecto del estado metabólico sobre la expresión génica uterina que puedan explicar las grandes pérdidas de preñez durante la gestación temprana.

Referencias

1. Thatcher WW, Guzeloglu A, Meikle A, Kamimura S, Bilby T, Kowalski AA, Badinga L, Pershing R, Bartolome J, Santos JEP. Regulation of Embryo survival in cattle. *Reproduction* 2003, Supplement N 61: 253-266.
2. Flint APF, Stewart HJ, Lamming PE, Payne JH. Role of the oxytocin receptor in the choice between cyclicity and gestation in ruminants. *J Reprod Fert* 1992, 45:53-58.
3. Clark JH, Mani SK. Actions of ovarian hormones. In: *The Physiology of Reproduction*. Ed: Knobil E, Neill JD. Raven Press Ltd. New York 1994, 1011-1059.
4. Meikle A, Sahlin L, Ferraris A, Masironi B, Blanc JE, Rodríguez-Irazoqui M, Rodríguez-Piñón M, Kindahl H, Forsberg M. Endometrial mRNA expression of estrogen and progesterone receptors and insulin-like growth factor-I (IGF-I) throughout the bovine estrous cycle. *Animal Reproduction Science*, 2001, 68:45-56.
5. Meikle A, Cavestany D, Sahlin L, Thatcher WW, Garofalo EG, Kindahl H, Forsberg M. The effect of pregnancy on sex steroid receptor mRNA endometrial expression and on 15-13-14ketodihydro-PGF₂ (PGFM) levels in heifers. *FAO/IAEA International Symposium on applications of gene-based technologies for improving Animal Production and Health in Developing countries* 2003: 28-31.
6. Medin J, Cavestany C, Cesar D, Perdomo E, Sartore I, Rubianes P, Ferraris A, Meikle A. Reconocimiento materno de la preñez: Receptores de estrógenos y progesterona en útero bovino. . XXXII Jornadas Uruguayas de Buiatría 2004:152-155.

ESPERMATOGÉNESIS DE LOS MAMÍFEROS: IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GENES DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL

Geisinger, A.^{1,2}, Rodríguez, R.², Cossio, G.^{1,2}, Capuano, A.² y Wettstein, R.²

¹ Unidad Asociada Biología Molecular (IIBCE), Fac. de Ciencias

² Departamento de Biología Molecular, IIBCE

La espermatogénesis es un complejo proceso de diferenciación terminal esencial para todas las especies con reproducción sexuada, que presenta rasgos muy particulares en comparación con las células somáticas. Durante la misma tienen lugar el apareamiento de los cromosomas homólogos y la segregación (que mantienen el número cromosómico de la especie), la recombinación meiótica (fuente fundamental de variabilidad genética), y la diferenciación del espermatozoide maduro (espermioogénesis).

Los conocimientos del tema a nivel molecular han provenido tradicionalmente del análisis de la meiosis de las levaduras. La información obtenida, sin embargo, ha resultado en general no extrapolable a los eucariotas superiores. Hoy en día se conocen algunas proteínas involucradas en la espermatogénesis de los mamíferos (por ejemplo, componentes estructurales de los complejos sinaptonémicos, y algunas proteínas implicadas en los cambios estructurales de la cromatina como cohesinas y condensinas). Sin embargo, los conocimientos de la espermatogénesis al nivel molecular siguen siendo muy escasos, especialmente en los organismos superiores. Esta escasez de conocimientos se debe en parte a las dificultades que presenta su estudio (como la imposibilidad de cultivar células de la línea germinal y dificultad para obtener células de un estadio específico en cantidad y pureza suficientes para realizar análisis moleculares). Las técnicas disponibles hoy día para producción de animales manipulados genéticamente ("knock-out", transgénicos, "knock-down", etc.) y el caudal de información proveniente de la secuenciación completa de genomas representan herramientas de enorme valor que permitirán el avance en la caracterización funcional de productos involucrados en la espermatogénesis.

El uso de una metodología apropiada para obtener poblaciones celulares de testículo altamente enriquecidas en diferentes estadios de la espermatogénesis (elutriación), combinada con técnicas de análisis de expresión génica diferencial, nos han permitido abordar el estudio de la espermatogénesis al nivel molecular. Como resultado de nuestro trabajo, al presente:

- Hemos identificado varios genes expresados diferencialmente durante la espermatogénesis de la rata (*Rattus norvegicus*). En particular, *Srsp1* codificaría la primera proteína nuclear

testículo-específica con tramo de homoserinas identificada hasta ahora, y cuya fosforilación podría hallarse involucrada en el transporte de proteínas al núcleo. Otro gen, *pecanex 1* (ver fig. 1), codifica una gran proteína con siete dominios de transmembrana, que podría ser un receptor de membrana plasmática en las células germinales; este tipo de receptores (7-TM) regula muchos procesos fisiológicos, constituyendo el principal blanco en investigación biomédica. Actualmente nos encontramos abocados a la caracterización funcional de los productos de estos dos genes, de modo de determinar su rol en el testículo normal y posible vinculación con patologías testiculares. Ensayos bioquímicos están siendo complementados con la implementación de los estudios de genética reversa por "knock-down" mediante interferencia de RNA (RNAi) *in vivo* con pequeños ARNs interferentes en el testículo (hemos sido el primer laboratorio nacional en incursionar en el uso de esta novedosa metodología en mamíferos; fig. 2).

Figura 1. A. Análisis de la expresión del gen *pecanex 1* en rata mediante Northern blots. La expresión sólo es detectable en el testículo adulto (Tt, TA) y fundamentalmente en la profase meiótica (C: espermatocitos paquiténicos), y no en otros tejidos o estadios del desarrollo. **B.**

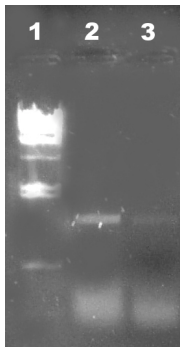


Figura 2. Silenciamiento de un gen de ratón mediante RNAi. El análisis de la inhibición se efectuó por RT-PCR. 1: marcador de peso molecular; 2: individuos inyectados con buffer PBS únicamente (control negativo de inhibición); 3: individuos inyectados con el siRNA específico para el gen.

- Disponemos de una colección de ADNc diferenciales de la espermiogénesis de la rata cuya caracterización nos proponemos emprender. En paralelo, hemos abordado estudios de expresión génica diferencial en las etapas tempranas de la meiosis de los mamíferos. A pesar de la importancia de estas etapas, en las que presumiblemente tiene lugar la transcripción de gran parte de los genes cuyos productos se hallan involucrados en el apareamiento y recombinación cromosómicos, las mismas suelen ser sumamente cortas y, por consiguiente, muy difíciles de estudiar; en consecuencia, los conocimientos disponibles a nivel molecular son casi inexistentes. Nosotros hemos demostrado que el cobayo (*Cavia porcellus*) presenta características únicas que lo hacen un modelo mamífero ideal para el estudio de las etapas tempranas de la meiosis (fig. 3). En el presente nos encontramos en la etapa de identificación de genes expresados específicamente en dichas etapas.

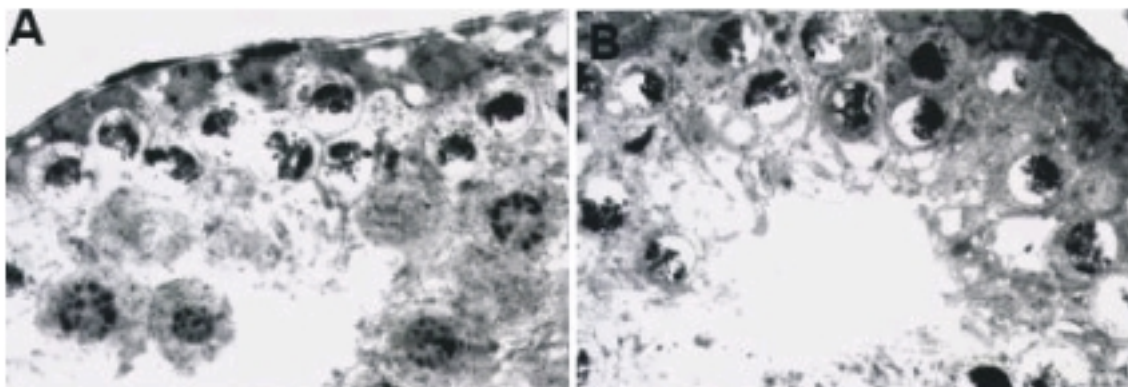


Figura 3. Cortes histológicas de túbulos seminíferos de cobayos juveniles. Se aprecia un número muy elevado de células en estadios meióticos tempranos.

Actualmente, en que los genomas de varias especies han sido ya secuenciados, se impone la caracterización funcional de los productos de los genes, para dar utilidad a la información genómica acuñada. Nuestro trabajo se enmarca en esa tendencia, en el convencimiento de que un mayor conocimiento de los productos involucrados en la espermatogénesis y de su modo de acción, resulta indispensable para la comprensión de las bases de una fuente tan importante de biodiversidad, y para el desarrollo de avances terapéuticos en relación con las patologías testiculares.

Simposio 3

Bioquímica de parásitos y de sus interacciones con células de mamífero

Moderadores: Beatriz Garat y Carlos Robello

Claudio Martínez – Sección Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias

“El gen con homeobox *Eghbx3/Stalker* participa en la morfogénesis temprana de la forma larvaria de *Echinococcus granulosus*”

Dolores Piñeyro – Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina

“Estudios estructurales y funcionales de una peroxiredoxina de *Trypanosoma cruzi*”

María Noel Alvarez - Departamento de Bioquímica y Centro de Investigaciones Biomédicas en Radicales Libres, Facultad de Medicina

“Difusión y toxicidad del peroxinitrito generado por macrófagos activados sobre *Trypanosoma cruzi*”

Lucía Piacenza - Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina

“Estrés Oxidativo como mediador de la Muerte Celular Programada en *T. cruzi*”

SIMPOSIO BIOQUÍMICA DE PARÁSITOS Y DE SUS INTERACCIONES CON CÉLULAS DE MAMÍFERO

Moderadores: Beatriz Garat y Carlos Robello

La Sectorial Bioquímica y Biología Molecular de la Sociedad Uruguaya de Biociencias convocó para este simposio de las 3eras jornadas a jóvenes investigadores próximos o recientemente doctorados del área de Parasitología Molecular. En el primer trabajo Martínez Debat estudia el gen con homeobox *Eghbx3/Stalker* y propone funciones para este factor en el desarrollo en *Echinococcus granulosus*. Los tres trabajos siguientes profundizan en el estudio de diferentes aspectos del estrés oxidativo en *Trypanosoma cruzi*. Piñeyro presenta la caracterización estructural y funcional de una peroxiredoxina que interviene en los mecanismos parasitarios de defensa antioxidante: la triparedoxina peroxidasa. Álvarez estudia la capacidad de especies altamente oxidantes como el peroxinitrito, que son producidas por macrófagos activados, de difundir y causar toxicidad sobre *T. cruzi*. Piacenza estudia la naturaleza del estrés oxidativo endógeno en epimastigotas que han sido expuestos a SHF, que sería responsable de la depolarización de la membrana interna mitocondrial conllevando a la muerte celular programada del parásito.

Entendemos que la distinción con un simposio para el área de Parasitología Molecular es un merecido reconocimiento a la larga y prolífica trayectoria de ésta área en nuestro país con grupos de investigación consolidados y altamente productivos en los diversos aspectos: epidemiológicos, clínicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares.

EL GEN CON HOMEBOX *EGHBX3/STALKER* PARTICIPA EN LA MORFOGÉNESIS TEMPRANA DE LA FORMA LARVARIA DE *ECHINOCOCCUS GRANULOSUS*.

Claudio Martínez Debat

Sección Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias, UdelaR
clau@fcien.edu.uy

Los genes con homeobox se encuentran presentes en todos los metazoarios, y sus productos están involucrados en el establecimiento y control de patrones morfológicos durante el desarrollo embrionario temprano. Asimismo, participan en la especificación de destinos celulares en etapas posteriores del desarrollo. La hidatidosis representa un problema sanitario a nivel mundial, y en el Uruguay constituye una zoonosis de carácter endémico. El agente etiológico de la enfermedad hidática es el platelminto cestode *Echinococcus granulosus*. En este trabajo, estudiamos la expresión de un gen con homeobox tipo NK-2 (*Eghbx3/Stalker*) en distintos estadios del parásito, encontrando que puede jugar un rol clave en la morfogénesis temprana del protoescólex (la forma larvaria metacesode). Su expresión, en característicos anillos que sugieren un proceso de difusión a partir de un evento focal inicial, está asociada a procesos de proliferación de la capa germinativa que darán lugar a la aparición de protoescólices. *Stalker* podría estar incluido entre los factores que determinan las opciones morfológicas en las larvas de los Cestodes, las cuales plantean interesantes problemas en relación a la determinación del número y la polaridad de los eventos de proliferación y diferenciación. En la tenia adulta, la expresión de *Stalker* aparece entre las ventosas y luego en la genitalia en maduración. Se discuten estos resultados en un contexto evolutivo general, enfatizando las aparentes homologías con otros sistemas modelo, y posibles estrategias de control del ciclo parasitario. Asimismo, presentamos aspectos novedosos acerca de la morfología durante las primeras etapas del desarrollo del protoescólex de *E. granulosus*. Realizamos un análisis de los eventos que llevan a la aparición de las estructuras visibles de la larva metacestode, presentando en detalle aspectos vinculados a la citodiferenciación y citoproliferación, y relacionándolos con la expresión de *Stalker*. Por último, discutimos la importancia del hallazgo de diversos genes con homeobox en un organismo que ocupa una posición filogenética clave para la comprensión de la evolución del plan corporal de los metazoarios.

ESTUDIOS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE UNA PEROXIREDOXINA DE *Trypanosoma cruzi*

Dolores Piñeyro

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina

Trypanosoma cruzi posee sistemas de defensa antioxidantes que son diferentes al de sus huéspedes mamíferos. En estos organismos la principal defensa contra el daño oxidativo es el sistema de detoxificación de hidroperóxidos dependiente del tripanotión. La remoción de hidroperóxidos dependiente de tripanotión en tripanosomátidos está catalizada por una cascada de tres oxidoreductasas: la tripanotión reductasa (una flavoproteína homóloga a la glutathion reductasa), la triparedoxina (de la familia de las tioredoxinas) y la triparedoxina peroxidasa (de la familia de las peroxiredoxinas). Estas enzimas actúan en concierto para mediar la transferencia de electrones a la peroxiredoxina, siendo el NADPH el dador inicial.

Los objetivos del trabajo de doctorado es el estudio de los mecanismos de adaptación al estrés de *Trypanosoma cruzi*. Realizamos el clonado, la expresión y purificación de la triparedoxina peroxidasa de *T. cruzi*, en forma activa y se cristalizó. La estructura de la TcTXNPx está resuelta en su forma reducida y activa, a una resolución de 2.8Å. La estructura de la enzima muestra que es un anillo compuesto de 5 dímeros, y este homodímero es esencial para su actividad enzimática. Asimismo, hemos estudiado la oligomerización dependiente del estado redox de la TcTXNPx.. Hemos realizado mutantes en las cisteínas involucradas en la catálisis, y comprobado que son esenciales para la actividad de la proteína. La caracterización de la TcTXNPx es muy interesante, debido a que podría ser un candidato para el desarrollo de nuevas drogas específicas contra este parásito.

Este trabajo fue financiado por CSIC (Universidad de la República) y Programa ECOS Sud (Uruguay-Francia).

DIFUSIÓN Y TOXICIDAD DEL PEROXINITRITO GENERADO POR MACRÓFAGOS ACTIVADOS SOBRE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Alvarez, M.N., Piacenza, L., Irigoín, F., Peluffo, G. y Radi, R..

Departamento de Bioquímica y Centro de Investigaciones Biomédicas en Radicales Libres, Facultad de Medicina, Universidad de la República

El *Trypanosoma cruzi*, agente causante de la enfermedad de Chagas, es un parásito unicelular que invade distintos tipos celulares en el huésped. Los macrófagos pueden jugar un rol importante en el control de la infección, cuando son expuestos a citoquinas de tipo Th1 (como interferón- γ o factor de necrosis tumoral- α). Este tipo de activación conduce a una inducción de la isoforma de la Oxido Nítrico Sintasa (iNOS) presente en los macrófagos, y también al aumento de la expresión de algunas de las subunidades que componen la NADPH-oxidasa (en particular gp91phox, p47phox y p67phox). Estas dos enzimas son las responsables de la síntesis de óxido nítrico (\bullet NO) y superóxido ($O_2^{\bullet-}$) que reaccionan a velocidad controlada por difusión para formar peroxinitrito ($ONOO^-$), especie muy oxidante considerada como uno de los mecanismos efectores de la respuesta inmune contra microorganismos invasores.

En nuestro trabajo estudiamos la capacidad del peroxinitrito generado por macrófagos activados de difundir dentro del *Trypanosoma cruzi* y ejercer citotoxicidad. Para ello utilizamos dos modelos de cocultivo, uno en el cual las células están separadas por una membrana semipermeable a una distancia fija entre ellas y el otro en el que los dos tipos celulares están en contacto. En ambos sistemas observamos por un lado la difusión del peroxinitrito generado por el macrófago, midiendo la oxidación de la dihidrorodamina (DHR) incorporada previamente al parásito, y por otro lado su toxicidad analizando la inhibición de la incorporación de timidina tritiada. Estos efectos no se observan cuando los macrófagos están generando solo \bullet NO o superóxido $O_2^{\bullet-}$. Los efectos del $ONOO^-$ fueron atenuados en presencia de bicarbonato, en acuerdo con el consumo extracelular del peroxinitrito por reacción directa con el CO_2 . En el modelo de mayor distancia entre los tipos celulares, el efecto de inhibición sobre la oxidación de fluoróforo intracelular o sobre la toxicidad fue mayor que cuando las células se encontraban en contacto. Para entender esto, se realizaron estudios *in vitro* del efecto del CO_2 sobre la toxicidad del peroxinitrito, usando distintas densidades de parásitos, lo que nos permite modificar las distancias promedio de difusión hasta alcanzar un blanco (a mayor densidad de células menor distancia de difusión). Ese estudio nos permite afirmar que a distancias menores de 5 μ m la difusión le compite a la reacción con el CO_2 , permitiendo que casi todo el peroxinitrito formado reaccione con los blancos celulares. El estudio de la

interacción de los macrófagos con la forma epimastigota del *T.cruzi* nos sirve como modelo para analizar el rol de los macrófagos activados en la toxicidad del peroxinitrito sobre la forma infectiva de este parásito.

ESTRÉS OXIDATIVO COMO MEDIADOR DE LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA EN *T. CRUZI*

Piacenza L, Irigoín F, Alvarez MN, Peluffo G y Radi R.

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República. Montevideo-Uruguay

En los últimos años han sido descritos diferentes tipos de Muerte Celular Programada (MCP) en parásitos pertenecientes a la familia de los kinetoplastídeos como *Trypanosoma cruzi*, *T. brucei* y *Leishmania spp.* Se cree que este fenómeno juega un rol importante en las complejas interacciones existentes entre estos parásitos y sus hospederos (insecto-mamífero), tanto en la adaptación como en la modulación de la respuesta inmune permitiendo establecer la infección. Los mecanismos moleculares involucrados en la inducción y ejecución del programa de muerte son poco conocidos. Datos previos de nuestro laboratorio mostraron que la exposición de epimastigotas de *T. cruzi* a SHF desencadena un proceso de MCP con características de apoptosis de eucariotas superiores el cual es inhibible por la presencia de óxido nítrico (NO) endógeno y exógeno. Por otro lado, se ha reportado recientemente la presencia de parásitos apoptóticos intracelulares, en macrófagos y células musculares, durante la fase aguda de la infección. En diferentes modelos de MCP se sugiere que la generación de un estrés oxidativo endógeno es responsable de la depolarización final de la membrana interna mitocondrial, proceso que lleva irreversiblemente a la muerte celular. La naturaleza del estrés oxidativo (aumento de oxidantes y/o disminución de antioxidantes) no se encuentra bien establecida. El objetivo de nuestro trabajo es definir las vías de inducción y ejecución del programa de muerte en *T. cruzi*.

La inducción de la MCP por SHF (mediada por la activación del complemento sobre la membrana parasitaria) produce un aumento rápido (+20%, < 1h) del potencial de membrana interna mitocondrial ($m\Delta\psi$) conjuntamente con una inhibición de la respiración celular. En estas condiciones, la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO) por parte de la cadena de transporte de electrones se ve favorecida. Efectivamente, la generación de ERO (evaluada por la oxidación de di-hidro-rodamina 123 y reducción NBT) aumenta en presencia del estímulo de muerte concomitantemente con la disminución (\cong 50%) de los niveles de dihidro-tripantonina ($T(SH)_2$) principal tiol de bajo peso molecular en estos tripanosomatídeos. La disminución en los niveles de $T(SH)_2$ y GSH son debidas no solo a oxidación sino también a la salida activa de las mismas hacia el espacio extracelular, proceso descrito en varios

modelos de MCP. Además, la actividad de la flavoenzima tripanotona reductasa dependiente de NADPH (responsable de la reducción de la tripanotona oxidada) se inhibe luego de la hora de exposición a SHF. Por último, se observó una activación ($\cong 5$ veces) de la ruta de las pentosas fosfato luego de 15 min de exposición a SHF compatible con la generación de estrés oxidativo en condiciones de MCP. A fin de determinar la naturaleza de la especie reactiva generada se utilizaron diferentes aproximaciones. Por un lado, se estudio la actividad de la enzima aconitasa (altamente sensible al radical superóxido, $O_2^{\cdot-}$) la cual se inhibe (20-40%) luego de 1h de exposición a SHF sugiriendo la generación mitocondrial de $O_2^{\cdot-}$. Por otro lado, se detectó $O_2^{\cdot-}$ mediante técnicas de resonancia paramagnética electrónica utilizando el atrapador de radicales 5,5'-dimetil-pirrolina-N-óxido (DMPO). En epimastigotas inducidos a MCP se detecta la señal del aducto DMPO-OH luego de 10 min de exposición a SHF. Niveles similares de oxidación de T(SH)₂ y GSH así como inhibición de aconitasa y tripanotona reductasa se obtuvieron utilizando el dador de $O_2^{\cdot-}$ endógeno 2,3-Dimetoxi-1-naftoquinona (DMNQ, 30 μ M, 5 μ M $O_2^{\cdot-}$ /min/parasito).

El proceso de MCP se inhibe por la presencia de diferentes antioxidantes como N-acetil-Cisteína (NAC), DMPO y NO sugiriendo que la generación de $O_2^{\cdot-}$ a nivel mitocondrial es una respuesta celular temprana implicada en la señalización del proceso de muerte.

Mesa Redonda

Estabilidad genómica: Estudios a nivel molecular y ambiental

Moderadores: Gustavo Folle, Deborah Keszenman y Carmen Candreva

Claudia Braida – Departamento de genética, Facultad de Medicina

“La distrofia miotónica tipo 1 como un modelo de estudio de las mutaciones dinámicas”

Mariela Di Tomaso - Depto. de Genética Toxicológica y Patología Cromosómica, IIBCE

“Distribución de sitios de fractura inducidos por etopósido y UV-C en el cromosoma X de CHO”

Nelson Bracesco – Departamento de Biofísica, Facultad de Medicina

“Exploración del efecto protector frente a radicales libres de los derivados de la uva (*Vitis vinífera* Cv.Tannat) y de la infusión de yerba mate(*Ilex paraguariensis*) en *Saccharomyces cerevisiae*”

Sandra Soria – Departamento de Biofísica, Facultad de Medicina

“Modelos de interrelaciones moleculares: Alcance y límites”

Sinthia Pagano - Laboratorio Biológico de la Dirección Nacional de Policía Técnica

“Análisis de las regiones hipervariables I y II del ADN mitocondrial en una muestra de la población uruguaya para su aplicación a la identificación forense humana”

MESA REDONDA: ESTABILIDAD GENÓMICA: ESTUDIOS A NIVEL MOLECULAR Y AMBIENTAL

Moderadores: Gustavo Folle, Deborah Keszenman y Carmen Candreva

Esta mesa Redonda tiene como objetivo presentar y discutir algunos aspectos básicos y aplicados relacionados con los factores y mecanismos involucrados en la inducción de cambios en el ADN que determinan la pérdida del delicado equilibrio que permite a la célula mantener la estabilidad del genoma.

Inicialmente se tratará la importancia de las estructuras alternativas del ADN en el origen de la inestabilidad genómica producida por mutaciones de carácter dinámico consistente en la expansión de trinucleótidos CTG•CAG en el caso de la distrofia miotónica. Asimismo, se presentarán las modificaciones observadas experimentalmente en las interacciones ADN-proteína a nivel de los repetidos.

Seguidamente, se analizará el papel que desempeñan los fenómenos de síntesis del ADN y de remodelación de la cromatina en la localización del daño genético inducido por agentes anti-topoisomerasa II en las regiones eucromáticas y heterocromáticas.

El efecto protector y/o modulador de productos naturales de origen vegetal a la acción deletérea de los radicales libres será presentado y discutido en la tercera exposición.

La cuarta presentación nos introducirá en la compleja red de acciones e interacciones entre los diferentes actores que operan en el mantenimiento de la estabilidad genómica, el control del ciclo celular y la inducción de muerte celular programada.

Finalmente, se analizará la aplicación de regiones hipervariables del ADN mitocondrial y del cromosoma Y humano como herramientas fundamentales para la identificación y discriminación de individuos en la investigación forense y el estudio de los procesos demográficos.

LA DISTROFIA MIOTÓNICA TIPO 1 COMO UN MODELO DE ESTUDIO DE LAS MUTACIONES DINÁMICAS

Braida, C.¹, Duhagon, M.², Garat B.², Monckton, D.G.³ y Tort, J¹.

¹ Dpto. Genética, Facultad de Medicina, UdelaR, Montevideo.

² Lab. Interacciones Moleculares, Facultad de Ciencias, UdelaR, Montevideo.

³ Division of Molecular Genetics, Institute of Biomedical and Life Sciences, The University of Glasgow, Glasgow, U.K.

Las mutaciones dinámicas, consistentes en la expansión de nucleótidos repetidos en el ADN representan un mecanismo novedoso de inestabilidad genética asociado con una serie de trastornos neurodegenerativos. Generalmente, estas secuencias son relativamente estables en individuos normales, pero si bajo ciertas circunstancias aumenta la cantidad de repetidos, estas regiones se vuelven dramáticamente inestables, mostrando una marcada tendencia a la expansión tanto en la línea germinal como somática. Un ejemplo es la Distrofia miotónica tipo 1 (DM1) causada por la expansión de repetidos CTG•CAG en la región 3' no traducida del gen *DMPK*.

DM1 es una enfermedad autosómica dominante, multisistémica, caracterizada principalmente por debilidad muscular y miotonía. Aún no está claro como la expansión de repetidos se vincula a los variables síntomas clínicos multisistémicos desarrollados en esta patología. Varias hipótesis intentan explicar cómo la expansión se asocia a la patología observada: haploinsuficiencia del gen *DMPK*, modificaciones en la expresión de genes contiguos, alteración de la cromatina y efectos patogénicos del ARN con repetidos CUG expandidos.

Si bien es evidente la importancia del número de repetidos en este tipo de enfermedades, aún no está claro como ocurre la expansión de éstos. Los modelos planteados involucran la formación de conformaciones estructurales distintas a la forma B del ADN durante procesos biológicos como transcripción, replicación y reparación. Las estructuras que se pueden formar consisten en una variedad de horquillas, triples hélices intramoleculares, cuádruples y apareamiento desfasado de hebras (S-DNA y SI-DNA). Existe una relación entre el aumento del número de repetidos y la estabilidad de estas estructuras alternativas formadas que se asocia con un aumento en la inestabilidad genética presente en estos trastornos.

Dada la importancia de la estructura secundaria en las regiones de repetidos, nos propusimos primeramente analizar la formación de isómeros estructurales en regiones de repetidos CTG•CAG presentes en distintos loci. Para ello, evaluamos la influencia del número de repetidos y el papel de las secuencias adyacentes (contenido en GC), comparando las regiones de *DMPK* y *HD* (asociado con la enfermedad de Huntington) que son muy inestables y presentan alto contenido en GC, con las regiones de *ERDA1* y *CTG18.1* (estables con bajo contenido en GC, no asociadas a una patología).

Evaluamos la capacidad de estos repetidos para formar estructuras alternativas a la forma B del DNA *in vitro*, mediante la amplificación por PCR seguida de la separación en geles de poliacrilamida nativos. Observamos una asociación entre el número de estructuras alternativas que se forman, el contenido en GC y la inestabilidad de las secuencias adyacentes. Cuanto mayor es la inestabilidad y el contenido en GC, mayor es el número de conformaciones alternativas. La capacidad del ADN de adoptar otras conformaciones no sería condición suficiente para causar las expansiones, dado que estas estructuras se forman tanto con un número de repetidos en el rango normal, como en las expansiones patológicas.

La asociación de proteínas particulares a estas estructuras podría estar en la base tanto del mecanismo de amplificación como de las alteraciones que conducen a la patología. Para profundizar en estos aspectos analizamos las interacciones ADN-proteína de la región de repetidos del gen *DMPK* mediante ensayos en geles de retardo, estudiando la influencia de la conformación del ADN, el número de repetidos y el tejido en estudio. Dada la heterogeneidad somática observada en las expansiones, utilizamos extractos de diferentes tejidos humanos, que se testaron con sondas conteniendo un número de repetidos CTG•CAG dentro del rango normal (22) y de la mutación (56), con o sin isómeros conformacionales.

Los estudios de interacciones ADN-Proteína revelaron que en hígado, músculo y corazón existen factores proteicos que reconocen e interactúan específicamente con la región de repetidos del gen *DMPK* con 22 y 56 repetidos en la forma lineal. Los ensayos de competición mostraron que la formación de estructuras alternativas de ADN en esta región impediría esta asociación. Demostramos que los factores proteicos interactuando con la región de repetidos no son las proteínas de reparación MSH2 y MSH3, e identificamos mediante ensayos de “UV-crosslinking” una proteína de 140 KDa presente en extracto nuclear hepático que interactúa con el fragmento lineal conteniendo 22 repetidos.

Los datos obtenidos apuntan a que las proteínas encontradas no intervendrían en la generación de la amplificación aunque su función se vería impedida por la aparición de estructuras alternativas en las regiones amplificadas.

DISTRIBUCIÓN DE SITIOS DE FRACTURA INDUCIDOS POR ETOPÓSIDO Y UV-C EN EL CROMOSOMA X DE CHO

Di Tomaso, M.V.¹, Martínez-López, W.^{1,2,3}, Folle, G.A.¹ y Palitti, F.³

(1) Depto. de Genética Toxicológica y Patología Cromosómica, IIBCE (Uruguay)

(2) Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, UDELAR (Uruguay)

(3) Depto. de Agrobiología y Agroquímica, Università degli Studi della Tuscia (Viterbo, Italia)

Se ha descrito que el ADN presenta una mayor vulnerabilidad a la acción de agentes clastogénicos durante la fase S y el período G2 del ciclo celular. Sin embargo, no se comprende cabalmente el papel que desempeñan los procesos de remodelación de la cromatina que tienen lugar durante estas etapas en la inducción y distribución del daño cromosómico en las regiones genéticamente activas (eucromatina) e inactivas (heterocromatina). Las topoisomerasas I y II cumplen una función esencial en el mantenimiento de la integridad de la molécula de ADN durante la replicación, reparación, transcripción, recombinación y remodelación de la cromatina mediante la inducción de cortes de simple (topoisomerasa I) o doble cadena (topoisomerasa II). Por otra parte, la topoisomerasa II constituye el componente mayoritario tanto de la matriz nuclear como del andamiaje cromosómico. Las drogas anti-topoisomerasa II son potentes inductores de aberraciones cromosómicas (AC). Su mecanismo de acción se basa en el bloqueo (“trapping”) del complejo clivable topoisomerasa II-ADN determinando la permanencia de rupturas de doble cadena en el ADN. La posibilidad de bloquear selectivamente el mecanismo de acción de la topoisomerasa II con agentes anti-topo II, ha permitido desarrollar un modelo de investigación para analizar la influencia de la síntesis del ADN en la distribución del daño genético inducido en regiones eucromáticas y heterocromáticas en líneas celulares de mamífero. En este sentido, se ha llevado a cabo el estudio de la distribución de lesiones cromosómicas a nivel del brazo corto (Xp, eucromático) y brazo largo (Xq, heterocromático) del cromosoma X de la línea celular CHO (hámster Chino) inducidas por etopósido (agente anti-topo II) y se han comparado los efectos observados con los producidos por la radiación ultravioleta (UV-C), un agente clastogénico dependiente de la fase S para la producción de AC.

Se marcaron células CHO cultivadas en medio McCoy 5A y 10% de suero fetal bovino con bromo-deoxi-uridina (BrdU; 30 µg/ml) durante el tratamiento con etopósido (10 y 20 µM; 40 min). En otra serie de experimentos se incorporó BrdU luego de la exposición de las células a UV-C (254 nm; 10 y 14 J). Los cultivos fueron tratados con colcemid (0.08 µg/ml) 2 h antes de

la recolección de las células a diferentes tiempos post-tratamiento realizándose extendidos cromosómicos de forma convencional. Se reveló la incorporación de BrdU mediante inmunomarcación con anticuerpos de ratón anti-BrdU y anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugada con FITC, a efectos de identificar las células en fase S temprana (Xp marcado), fase S tardía (Xq marcado) y G2 (X sin marcación). Se analizó la distribución de sitios de fractura cromosómica (SFC) inducidos por etopósido y UV-C en Xp y Xq. Las frecuencias de SFC observadas se compararon con las esperadas de acuerdo a las longitudes relativas de ambos brazos mediante el test de χ^2 .

En la fase S temprana (cuando replica Xp) los SFC inducidos por etopósido se concentraron en Xp (10 μ M: χ^2 9.3; 20 μ M: χ^2 13.4) mientras que los producidos por UV-C mostraron una distribución aleatoria. En fase S tardía (cuando replica Xq), los SFC inducidos por etopósido (10 μ M: χ^2 59.7; 20 μ M: χ^2 50.7) y UV-C (10 J: χ^2 21.8; 20 μ M: χ^2 11.9) se concentraron en Xq. Durante la fase G2 se observó que los SFC producidos por etopósido mapearon en relación a las longitudes relativas de Xp y Xq. Sin embargo, el análisis de la localización del daño cromosómico inducido por este agente en la fase G2 tardía (40 min antes de la mitosis) reveló una mayor frecuencia de SFC en Xp (10 μ M: χ^2 13.4; 20 μ M: χ^2 8.1).

La distribución observada de los SFC inducidos por etopósido y UV-C en el cromosoma X de CHO durante la fase S indicaría una influencia del proceso replicativo del ADN en la distribución del daño cromosómico. Las diferencias observadas en los valores del estadístico χ^2 (mayor significación con el inhibidor de la topoisomerasa II que con UV-C) sugieren la relevancia del proceso de remodelación de la cromatina asociado a la síntesis de ADN, donde la topoisomerasa II tendría un papel preponderante. La mayor frecuencia de SFC en Xp en la fase G2 tardía (etapa premitótica no replicativa), en la que predomina el proceso de compactación de la eucromatina (con la participación de la topoisomerasa II), sugiere la importancia de este proceso en la distribución de las lesiones cromosómicas inducidas por etopósido.

Financiado parcialmente por CSIC (UDELAR, Uruguay), PDT (DINACYT, Uruguay) y el Departamento de Agrobiología y Agroquímica, Università degli Studi della Tuscia (Viterbo, Italia)

EXPLORACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR FRENTE A RADICALES LIBRES DE LOS DERIVADOS DE LA UVA (*VITIS VINÍFERA* CV.TANNAT) Y DE LA INFUSIÓN DE YERBA MATE (*ILEX PARAGUARIENSIS*) EN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Bracesco, N.¹, Carrau, F.² y Nunes, E.¹

¹ Laboratorio de Radiobiología, Dpto. de Biofísica, LOBBM, Facultad de Medicina UdeLAR, Montevideo Uruguay.

² Sección Enología, Dpto. Tecnología de Alimentos, Facultad de Química UdeLAR, Montevideo Uruguay.

Ciertos tipos de agentes físicos y químicos pueden alterar la proliferación celular, fundamentalmente por sus efectos sobre el ADN, membranas y componentes de cascadas de transducción de señales, lo que resulta en retardos en el ciclo celular, lesiones letales (necrosis, apoptosis), mutagénicas y recombinogénicas. Algunos ejemplos de estos agentes son: radiaciones ionizantes y ultravioletas, hipertermia, radicales libres provenientes del metabolismo celular y del entorno.

Se investigaron los posibles efectos protectores y/o moduladores de la proliferación celular y de lesiones en el ADN de productos naturales, derivados de la uva (*Vitis vinifera*) y de la infusión de yerba mate (*Ilex paraguariensis*), frente a la acción del peróxido de hidrógeno, utilizando poblaciones haploides y diploides de *Saccharomyces cerevisiae* como modelo eucariota. Los resultados indican que la fracción sobreviviente disminuye en función de la dosis de peróxido de hidrógeno, en tanto que el número de dobles roturas del ADN y la frecuencia mutagénica aumentan en función de dicha dosis.

En presencia de los productos naturales utilizados, se observa un aumento significativo de la probabilidad de supervivencia al peróxido de hidrógeno, con disminución también significativa del número de roturas dobles a nivel del ADN, tanto en poblaciones haploides como en diploides. La frecuencia mutagénica espontánea no se modifica en presencia de los agentes naturales utilizados. Parte de los efectos observados pueden simularse utilizando altas concentraciones de α tocoferol.

Los resultados sugieren que los derivados de la uva y de la yerba mate podrían actuar como protectores a nivel del ADN y de otros blancos involucrados en la progresión del ciclo y en la muerte celular, ya sea por sus efectos antioxidantes y/o por modulación de mecanismos de reparación de ADN y mutagénesis.

MODELOS DE INTERRELACIONES MOLECULARES: ALCANCE Y LIMITES

Soria, S. y Nunes, E.

Departamento de Biofísica – Facultades de Medicina y Ciencias

sansors1@yahoo.es

Los modelos de interrelación molecular de sistemas biológicos hasta hoy publicados, probablemente son insuficientes para integrar toda la red de información y control, aún en el organismo más sencillo. Sin embargo, cada modelo puede aportar valiosa información que posiblemente conducirá a futuras investigaciones sobre:

- la tendencia de una vía metabólica hacia cierta interacción,
- formación de complejos -reclutamientos, inhibiciones o activaciones en cascada- y correspondiente dinámica,
- curso temporal y distribución espacial de controles moleculares (ej.: ubiquitinación, sumoilación),
- redundancia entre las vías involucradas en la supresión de la inestabilidad genómica,
- el cómo y cuándo de la elección de una vía apoptótica.

Los organismos vivos han desarrollado vías y mecanismos mediante los cuales regulan su estabilidad genómica. La molécula de ADN, cuya secuencia puede ser compartida en parte entre especies, es costosamente protegida, reparada y conservada en función de su eficiencia, a lo largo de la evolución. Por ejemplo, las lesiones que bloquean la replicación del ADN, conllevan al incremento de la inestabilidad genómica, por estancamiento de la horquilla de replicación. En *Saccharomyces cerevisiae*, frente a estas circunstancias, las helicasas *Srs2* y *Sgs1* juegan un papel clave en el control, amplificación de la señal, procesamiento y estabilización de la horquilla. Varios modelos, publicados recientemente, muestran que ambas enzimas se regulan estrictamente durante el ciclo celular y participan en la vía de activación “*checkpoint*” por daño al ADN. La información sobre la posible acción de estas enzimas, va integrándose lentamente a la red de interrelación entre vías de reparación ya existente, donde encontramos junto a *Rad6*, *Rad18*, *Rad17*, *Mec1*, *Rad51*, un elevado número de macromoléculas participantes. Dentro de las cascadas de amplificación de señales, se abren vías constitutivas y vías inducibles involucradas en la reparación del ADN, al compás del freno del ciclo celular y en la búsqueda de la restauración del control metabólico del ADN o de una vía apoptótica.

Se considera importante la profundización en modelos de control de la estabilidad genómica en diferentes especies, dado el creciente interés de su aplicabilidad a nivel biológico y médico.

Se agradece el apoyo de PEDECIBA.

ANÁLISIS DE LAS REGIONES HIPERVARIABLES I Y II DEL ADN MITOCONDRIAL EN UNA MUESTRA DE LA POBLACIÓN URUGUAYA PARA SU APLICACIÓN A LA IDENTIFICACIÓN FORENSE HUMANA

Sinthia Pagano Siepierski

Laboratorio Biológico de la Dirección Nacional de Policía Técnica

El objetivo primordial de este trabajo de tesis fue establecer las bases para la aplicación del análisis de la variación del ADN mitocondrial (ADNmt) y de seis microsátélites del cromosoma Y (DYS19, DYS385, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS393), para la resolución de casos de maternidad, paternidad y criminales en nuestro país. Para apoyar y respaldar esta base de datos fue necesario llevar a cabo, entre otros, un estudio antropológico profundo de la población uruguaya.

En la muestra poblacional de 120 individuos no relacionados por la vía materna para el estudio del ADNmt, fueron amplificados y secuenciados los segmentos HVI y HVII de la región control. Se observaron 107 secuencias diferentes de las cuales 97 son únicas. La diversidad genética combinada para las regiones HVI y HVII fue de 0.9970 y la probabilidad de coincidencia de dos perfiles genéticos mitocondriales en Uruguay es del 0,98%. Los cálculos estadísticos fueron realizados con el programa informático Arlequín ver. 2.000.

Basándose en los sitios variables se ha podido clasificar cada secuencia en los haplotipos comúnmente descriptos. El haplogrupo más común es el H que representa el 23% de las secuencias. Los haplogrupos K, U, J, T, C y B también ocurren con frecuencias relativamente altas, mientras que el resto de los haplogrupos se encuentran con frecuencias inferiores al 6%. De acuerdo al origen de los haplogrupos, esta muestra al azar de la población uruguaya está estructurada con un 58% de linajes europeos, un 34% de linajes nativos americanos y una contribución de origen africano considerablemente menor a las anteriores, del 8%. Los uruguayos de hoy conservan la marca genética de la colonización; la típica europea mezclada con la amerindia de la región sumándosele luego ancestros africanos.

El análisis de las 91 muestras masculinas uruguayas no emparentadas por la línea paterna con seis marcadores tipo STR de la región no homóloga del cromosoma Y, permite la

diferenciación de 76 haplotipos de los cuales 67 son únicos. La diversidad genética combinada de estos seis marcadores es de 0,9946 y la probabilidad de hallar dos perfiles idénticos es del 1.63%.

El análisis de mestizaje en las patrilíneas muestra una contribución masculina amerindia considerablemente más baja, a favor de los genes europeos, que en la matrilinea. Este mismo fenómeno que implica el cruzamiento de mujeres amerindias y africanas con hombres europeos, ha sido observado en la mayoría de los países latinoamericanos.

Dados los índices de diversidad obtenidos para los marcadores mitocondriales y de cromosoma Y investigados, se demuestra el poder de discriminación interindividual y por lo tanto su utilidad en genética forense. También quedó demostrado que las poblaciones de los distintos departamentos son homogéneas en cuanto a su ADNmt y microsatélites del cromosoma Y, por lo que puede utilizarse una única base de datos para todo el país.

Finalmente se concluye que la secuenciación mitocondrial y la tipificación de microsatélites del cromosoma Y constituyen herramientas fundamentales para la investigación forense rutinaria. Dado el excelente rendimiento que se obtiene en cuanto a discriminación e identificación, son un valioso instrumento de trabajo para la investigación pericial en el campo de la Genética Forense. Resultan ser además métodos fiables para el conocimiento de los procesos demográficos ocurridos en el continente.

A 3D ribbon diagram of a protein structure, likely a multi-domain protein, rendered in various colors (orange, green, cyan, blue, red) to distinguish different regions. The structure is complex, featuring numerous alpha-helices and beta-strands. A white sphere is visible on the right side of the structure. The word "POSTERS" is overlaid in the center of the image.

POSTERS

SESIÓN DE POSTERS 1:

Biología Vegetal, Interacción Planta-Microorganismo,
Microbiología y Biología Parasitaria

**MUERTE CELULAR PROGRAMADA EN *PHYSCOMITRELLA PATENS*:
CARACTERIZACIÓN DEL FENÓMENO Y ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE
METACASPASAS.**

Bentancor, M.¹, Ponce de Leó, I.², Oliver, J.P.², García, A.V.², Carballo, V.¹, Vidal, S.¹

1. Laboratorio de Biología Molecular Vegetal. Facultad de Ciencias – Universidad de la República.

2. Departamento de Biología Molecular. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

El fenómeno de muerte celular programada (MCP) está involucrado en múltiples etapas del ciclo vital de las plantas y forma parte de las estrategias defensivas o de tolerancia frente a factores de estrés biótico o abiótico. Sin embargo se conoce relativamente poco sobre sus mecanismos moleculares de regulación al compararlo con la MCP en animales. Existen varios genes reguladores de MCP en animales a los que no se ha encontrado homólogos de secuencia en plantas. Un tipo de estos genes, son los codificantes para caspasas, cuyos candidatos más probables a ser homólogos son los codificantes de metacaspasas, cuya función en plantas aún no ha sido dilucidada. Estudios bioinformáticos de nuestro grupo han permitido encontrar genes con alta homología a metacaspasas de plantas superiores en *Physcomitrella patens*. Esta planta, es la única hasta el momento en la cual se pueden efectuar *knockout* génicos, además de presentar múltiples características ventajosas como sistema vegetal modelo. Este proyecto tiene como objetivo principal el estudio de la regulación del fenómeno de MCP en *P. patens* a través de la producción de un mutante *knockout* de una metacaspasa. En primera instancia, nuestro grupo ha iniciado la caracterización de procesos de muerte celular en *P. patens* ante estrés osmótico y la inoculación con diferentes cepas de la bacteria fitopatogénica *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Paralelamente, se ha iniciado el clonado de genes destinados a servir como marcadores moleculares distintivos de MCP propia de senescencia y de respuestas defensivas, mediante los anticuerpos que se generen contra los productos de su expresión.

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UN MUTANTE DE *Arabidopsis thaliana* ALTERADO EN LA PERCEPCIÓN DE ABA POST-GERMINACIÓN

Berriel, V., Borsani, O. y Monza, J.

Departamento de Biología Vegetal, Unidad de Bioquímica, Facultad de Agronomía

El ácido abscísico (ABA) es una fitohormona clave en el crecimiento y desarrollo de la planta y germinación de la semilla. Durante el crecimiento vegetativo el ABA media respuestas adaptativas a varios estreses abióticos. En estado de semilla el ABA participa en vías de señalización específicas, y algunos de los componentes como *ABI3*, *ABI4* y *ABI5* corresponden a factores de transcripción. A diferencia de los cribados basados en germinar semillas en medios con ABA nosotros aplicamos ABA después de germinadas semillas mutagenizadas con EMS. Usando esta metodología aislamos un mutante de *Arabidopsis thaliana* en el ecotipo Landsberg *erecta* alterado en la percepción de ABA, al que denominamos *asil* (*abscisic acid seedling insensitive*). El cribado se realizó sembrando 145.000 semillas en placas sobre papel de filtro embebido en medio Murashige -Skoog (MS) dilución 1:4, al quinto día se sustituyó ese medio por una solución de MS 1:4 con ABA 40 μ M. Los posibles mutantes se identificaron por la capacidad de las plántulas de mantener los cotiledones verdes y por no presentar inhibición en su crecimiento. El mutante *asil* caracterizado en etapa de germinación es insensible a ABA en todas las concentraciones ensayadas (1, 3, 10 y 30 μ M), y se comportó como hipersensible en medios suplementados con NaCl (50-300 mM), manitol (100- 400 mM) y glucosa (2- 6% p/v). Los resultados obtenidos confirman la validez de esta metodología como una alternativa en el cribado e identificación de nuevos mutantes alterados en la sensibilidad frente a ABA.

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE GENES INDUCIDOS POR ESTRÉS OSMÓTICO Y ÁCIDO ABSCÍCO EN *PHYSCOMITRELLA PATENS*

Carballo V., Vidal S. y Welin B.

Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, Facultad de Ciencias. Montevideo.

El estrés generado en las plantas por factores ambientales como frío, sequía y salinidad, representan la primera causa de pérdida en los cultivos en el mundo. Estos factores, que tienen como componente común la deshidratación celular, activan respuestas a nivel molecular, celular y fisiológico. Los productos de los genes inducidos funcionarían tanto en la tolerancia al estrés como en las vías de señalización. La fitohormona ácido abscísico (ABA) cumple una función central en la respuesta al estrés abiótico. Para comprender los mecanismos de la tolerancia, es necesario dilucidar la función de los productos de los genes activados por factores de estrés. El musgo *Physcomitrella patens*, es un excelente sistema modelo para realizar estudios funcionales de proteínas vegetales ya que posee una alta frecuencia de recombinación homóloga, haciendo posible la aplicación de la genética reversa mediante la creación de mutantes *knockout*. Por otro lado, muchas de las proteínas estudiadas hasta el momento en plantas superiores, tienen homólogas en *P. patens*. Con el objetivo de identificar genes involucrados en la tolerancia al estrés osmótico en *P. patens*, se construyó una biblioteca de cDNA enriquecida en secuencias inducidas por estrés osmótico y ABA utilizando la técnica “suppression subtractive hybridization” (SSH). Se aislaron clones correspondientes a genes inducidos en condiciones de estrés, cuyo patrón de expresión fue analizado por northern blot. Se identificaron dos genes que se inducen fuertemente por manitol (estrés osmótico) y NaCl (estrés salino). Uno de ellos codifica para una proteína con alta similitud a la familia de las acuaporinas.

ANÁLISIS DE LAS α -DIOXIGENASAS EN LA RESPUESTA DE DEFENSA A PATÓGENOS EN EL MUSGO *PHYSCOMITRELLA PATENS*

Castro, A.¹, García, A.V.¹, Oliver, J.P.¹, Hamberg, M.², Gaggero, C.¹, Ponce de León, I.¹

¹ Departamento Biología Molecular – IIBCE, Montevideo, Uruguay

² Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Karolinska Institutet, Estocolmo, Suecia

Las α -Dioxigenasas (α -DOXs) son enzimas recientemente descubiertas que juegan un rol en la respuesta de defensa de las plantas superiores, mediante la generación de moléculas derivadas de lípidos (oxilipinas) que protegen a los tejidos de la muerte celular ocasionado por el patógeno. En este trabajo nos proponemos continuar el análisis de las α -DOXs en la planta inferior *Physcomitrella patens*, único modelo vegetal que permite estudios de genética reversa debido a su alta frecuencia de recombinación homóloga. A pesar del uso cada vez más frecuente de *P.patens* como planta modelo, no existe información sobre patógenos del musgo ni tampoco sobre sus mecanismos de defensa. Estudios recientes de nuestro laboratorio indican que el filtrado de cultivo (CF) de *Erwinia carotovora* (Ecc) produce daño y muerte celular en *Physcomitrella*. Análisis de secuencias revelaron la existencia de al menos un gen altamente homólogo a los genes α -*dox*, lo que permitió diseñar cebadores específicos para su amplificación. El patrón de acumulación de los ARNm de α -DOX revela una inducción en respuesta a tratamientos con CF de Ecc y también por superóxido.

Los perfiles de oxilipinas en las plantas tratadas con CF de Ecc revelan la existencia de actividad α -DOX en *Physcomitrella*, la cual es inducida por ácido araquidónico y utiliza como sustrato ácido palmítico. Los resultados obtenidos sugieren que esta enzima podría participar en la respuesta de defensa de *Physcomitrella* a patógenos. Con el objetivo de caracterizar la función de α -DOXs en *Physcomitrella*, hemos generado una construcción para obtener un mutante knock-out del gen α -*dox*.

ACUMULACIÓN DE PROLINA POR SÍNTESIS *DE NOVO* EN *LOTUS SP.* EN CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO

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

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

En condiciones de estrés hídrico las plantas acumulan osmolitos compatibles como prolina, entre otros. Entre las funciones asignadas a la prolina se encuentra la capacidad de actuar como defensa frente al estrés osmótico y como molécula capturadora de especies reactivas del oxígeno. Se ha propuesto que en condiciones de estrés osmótico o senescencia se incrementa la hidrólisis de proteínas. En este trabajo se evaluó en condiciones de estrés hídrico si la prolina deriva de la síntesis *de novo* o de la hidrólisis de proteínas, en las especies de interés agrícola *L. corniculatus* y *L. glaber*, y en el modelo *L. japonicus*. Cuando las plantas de las diferentes especies fueron sometidas a estrés hídrico, no se observaron cambios significativos en el contenido de aminoácidos totales, evaluados por reacción de ninhidrina o por derivatización con ortoftaldehído-HPLC. Todas las especies acumularon prolina en respuesta al estrés hídrico y que llegó a representar hasta el 10 % de los aminoácidos totales. No se encontraron cambios en el contenido de proteínas totales, ni tampoco en la actividad proteolítica, evaluada como capacidad de hidrolizar la azocaseína. Estos resultados indican que la síntesis de prolina en *Lotus sp.* proviene de la síntesis *de novo* que puede ser a partir de glutamato u ornitina.

OBTENCION DE CONSTRUCCIONES GÉNICAS PARA SU UTILIZACIÓN EN EL SILENCIAMIENTO DE LOS VIRUS DE TRISTEZA Y PSOROSIS DE LOS CÍTRICOS

Gallino J.P.¹, Pagliano, G.¹, Vidal, S.² y Welin, B.²

¹ Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Agronomía.

² Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, Facultad de Ciencias.

La citricultura en Uruguay es un importante rubro de exportación no tradicional que llega a los más importantes mercados del mundo ocupando una superficie total de 21.000 hás.

Los virus de Tristeza (CTV) y Psorosis (CPsV) de cítricos son los agentes virales de mayor incidencia en los cultivos de cítricos de nuestro país. En las plantas infectadas se observan bajos rendimientos e incluso muerte prematura dependiendo de la cepa viral. El silenciamiento génico es un fenómeno conservado caracterizado por la degradación específica del ARN desencadenada por la presencia de ARN de doble hebra en la célula. En plantas el silenciamiento génico constituye un mecanismo natural de defensa contra virus. El presente trabajo se encuentra en el marco del proyecto “*Producción de citrus resistentes a Tristeza y Psorosis mediante silenciamiento génico*”. Para ello se aislaron secuencias parciales de la cápside de ambos virus y se generaron construcciones génicas consistentes en el clonado de las secuencias virales específicas en orientaciones sentido-antisentido, interrumpidas por un intron vegetal. La transformación de plantas con este tipo de construcciones génicas ha demostrado ser altamente eficiente en cuanto a porcentajes obtenidos de silenciamiento génico y resistencia a virus en otras especies vegetales. En una etapa posterior se transformarán portainjertos de citrus con dichas construcciones, y se evaluará su grado de resistencia a CTV y CPsV, así como su capacidad de transmitir la señal de silenciamiento a nivel sistémico.

ESTUDIO DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN RESPUESTAS DE DEFENSA A PATÓGENOS EN LA PLANTA *PHYSCOMITRELLA PATENS*: GRADO DE CONSERVACIÓN ENTRE MUSGOS Y PLANTAS SUPERIORES

García, A.^{1,2}, Bentancor, M.¹, Karayekov, E.¹, Ponce de León, I.², Vidal, S.¹

¹Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, Facultad de Ciencias, UdelaR.

²Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

En los últimos años se ha puesto al descubierto un importante grado de conservación entre los sistemas de defensa de plantas y animales, los cuales avalan la teoría de un origen evolutivo común de los mismos. NPR1, una proteína similar en secuencia al regulador de la inmunidad innata y adaptativa animal IkappaB, cumple un rol central en la defensa vegetal, siendo un componente esencial en la vía de señalización de la hormona ácido salicílico (AS). El musgo *Physcomitrella patens* surgió recientemente como un modelo vegetal ideal para estudios evolutivos y de funcionalidad de genes mediante genética reversa, dada su facilidad para generar mutantes *knockout* y su posición basal en la escala evolutiva. La secuenciación de gran parte de su transcriptoma, así como datos sin publicar de nuestro laboratorio, han revelado que esta planta presenta un gran número de genes con homología de secuencia a los genes involucrados en defensa en plantas superiores. Recientemente, clonamos un gen de *P.patens* con alta similitud de secuencia a *NPR1*. Actualmente, estamos analizando su patrón de expresión frente al tratamiento de plantas con AS y patógenos. Paralelamente, se está generando una construcción génica para la transformación de *P. patens*, con el objetivo de obtener un mutante *knockout* para este gen. El fenotipo del mutante será caracterizado en relación a la expresión de genes regulados por AS. Como marcadores moleculares de esta vía de señalización, se analizarán secuencias de *P. patens* correspondientes a genes inducidos por AS, identificados mediante la técnica “Suppression Subtractive Hybridization”.

DINÁMICA DEL NITRÓGENO EN EL CULTIVO DE ARROZ: EFECTO DE UN INHIBIDOR DE LA NITRIFICACIÓN

Gonnet S.¹, Fernández A.², Tarlera S.², Irisarri P.¹, Paolino G.², Travers D.², Arrarte G.¹ y Berriel V.¹

¹ Laboratorio de Bioquímica. Departamento de Biología Vegetal. Facultad de Agronomía.

² Cátedra de Microbiología. Facultad de Química.

El nitrógeno suele ser una de las limitantes para el crecimiento de la planta de arroz. Se estima además que se pierde entre el 10 y el 65% del fertilizante aplicado al cultivo. El nitrógeno del suelo puede perderse por formación de N₂O vía nitrificación o desnitrificación, en forma de nitrato por lixiviación o por volatilización de amonio. En Uruguay no se conocen totalmente los procesos fundamentales que gobiernan el destino del nitrógeno y su disponibilidad para la planta en sistemas irrigados de arroz y esto es esencial para aumentar la eficiencia de uso del nitrógeno y mantener la calidad del suelo. Se estima que los procesos microbianos de nitrificación y desnitrificación en el suelo producen alrededor del 70% del N₂O contenido en la atmósfera. Este gas tiene efecto invernadero y sus emisiones han aumentado a medida que la fertilización en la agricultura se extiende. Se ha propuesto el uso de inhibidores de la nitrificación para reducir las pérdidas de nitrógeno por desnitrificación y disminuir la emisión de N₂O. Estudios previos realizados en invernáculo mostraron que la actividad nitrificante del suelo disminuía con el fertilizante comercial ENTEC que contiene 3,4-dimetilpirazolfosfato (DMPP) que inhibe la amonio oxidasa. A partir de estos resultados se está realizando un ensayo a campo en INIA-Treinta y Tres para investigar el impacto del uso del DMPP en la fertilización nitrogenada sobre las emisiones de N₂O y las velocidades de nitrificación-desnitrificación, así como las poblaciones microbianas usando NMP y otras técnicas como T-RFLP.

Este trabajo está financiado por CSIC Proyecto 276, IFS e INIA Treinta y Tres.

CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA Y FENOTÍPICA DE LA MUTANTE *ExbD* DE *Herbaspirillum seropedicae* Z67.

Rosconi, F.²; Souza, E. M.⁴; Platero, R.²; Carbó, N.¹; González, M.²; González, C.¹; Batista, S.¹; Gill, P. R.³ and Fabiano, E.

¹Depto. Bioquímica, ²Lab. Ecología Microbiana, IIBCE; ³Lab. Tecnología Molecular, Fac. Ciencias. Montevideo, Uruguay. ⁴Depto. de Bioquímica e Biología Molecular, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Brasil.

Herbaspirillum seropedicae es una β -Proteobacteria capaz de fijar nitrógeno atmosférico y promover el crecimiento de plantas de arroz. Con el fin de estudiar los sistemas de captación de hierro y evaluar su contribución a la promoción del crecimiento vegetal, se realizó una mutagénesis generalizada de la cepa *H. seropedicae* Z67 con el transposón *miniTn5gus-o-gfp*. Las mutantes fueron seleccionadas según su incapacidad de expresar o internalizar sideróforos (compuestos quelantes de hierro). Uno de los mutantes seleccionados contenía el mini-transposón insertado en el gen *exbD*, que codifica para una proteína de membrana citoplásmica que, junto a los productos de *tonB* y *exbB*, es responsable de la internalización de los sideróforos al espacio periplásmico. Con relación a la cepa salvaje, el mutante mostró sobre acumulación de sideróforos en placas de medio CAS y menor crecimiento en medios con baja disponibilidad de hierro. Estudios de expresión génica demostraron que la expresión de *exbD* estaba regulada negativamente por este metal. La actividad del complejo enzimático nitrogenasa fue indetectable en la mutante *H. seropedicae* Z67 *exbD* cuando la cepa se creció en presencia del quelante de hierro dipiridilo 50 μ M, revertiéndose este fenotipo por agregado de sulfato ferroso. Los resultados obtenidos indican que la disponibilidad de hierro afecta el proceso de fijación de nitrógeno.

CARACTERIZACIÓN DE β -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE) EN AISLAMIENTOS DE *Salmonella enterica* SEROVAR DERBY.

Cordeiro, N. F.¹, García, V.¹, Betancor, L.¹, Bado, I.¹, Schelotto, F.¹, Ayala, J.² y Vignoli R.¹

¹ Dpto. de Bacteriología y Virología. Facultad de Medicina, Instituto de Higiene Universidad de la República.

² Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. CSIC-UAM España.

La producción de BLEE es el mecanismo de resistencia a oxy-iminocefalosporinas mas relevante en enterobacterias. Durante los años 2000-2002 realizamos un relevamiento para determinar la prevalencia de infección por *Salmonella sp.* en la población avícola Uruguaya. De 41 aislamientos de *S. Derby*, dos presentaron BLEE según normas NCCLS. Nos propusimos caracterizar dicho mecanismo de resistencia. Dichos aislamientos mostraron resistencia a ceftazidima, CIM=32 μ g/ml reduciéndose 64 veces al agregarle 4ug/ml de clavulanato (NCCLS). Se realizó extracto crudo sobre crecimiento ON en caldo LB mediante sonicación, determinandose punto isoelectrico (pI) en gel de poliacrilamida de amplio rango (Mathew et al). La actividad enzimática

revelada por método iodométrico con ampicilina 500ug/ml, arrojó pI~ 5,4. A partir de plásmidos obtenidos por lisis alcalina se transformó una cepa receptora *E.coli* J53 azida resistente, mostrando cepas salvajes y transformantes un plásmido de aproximadamente 9 kb. De acuerdo al pI, se realizaron sobre éstos, PCRs utilizando primers para *bla*PER-2 y la familia TEM, obteniéndose amplicones de 1076 pb con los primers *bla*TEM.

La mayoría de estas β -lactamasas genera fragmentos de 760 y 316 pb al digerirlos con *Pst*I. Los amplicones digeridos mostraron 3 fragmentos (1076, 760 y 316 pb), y los plásmidos otros tres (5, 3 y 0,7 Kb). Las PCRs para TEM sobre los 2 fragmentos plasmidicos mayores fueron positivas. La no digestión con *Pst*I es compatibles con *bla*TEM-116 (que ya hemos detectado en aislamientos de EPEC) sugiriendo la presencia de al menos 3 copias de genes tipo *bla*TEM en un pequeño plásmido de 9kb.

UNA NUEVA SUBFAMILIA DE LEUCIL AMINOPEPTIDASAS CONSERVADAS EN METAZOARIOS

Acosta, D. (2), Cancela, M. (2), Rinaldi, G. (1), Roche, L. (1), Carmona, C. (2) y Tort, J. (1)

(1) Departamento de Genética, Facultad de Medicina, UDELAR

(2) Unidad de Biología Parasitaria, Instituto de Higiene, Facultad de Ciencias, UDELAR

Las leucyl aminopeptidasas (LAP) son metalo-enzimas que catalizan el clivaje del aminoácido aminoterminal de una proteína, siendo fundamentales en el recambio proteico de las células. Las LAP están presentes en eubacterias, arqueobacterias y eucariotas y han sido agrupadas en la familia M17 por la base de datos de peptidasas MEROPS. La enzima activa es homohexamérica, con monómeros formados por un dominio catalítico C-terminal y un dominio globular N-terminal globular que participa en la multimerización. Las LAP han sido analizadas por su potencial como blancos de drogas y candidatos a vacunas antiparasitarias, obteniéndose resultados muy promisorios (casi 90% de protección) contra *Fasciola hepatica* en ovinos. Recientemente obtuvimos el clon completo de esta enzima expresado en un sistema bacteriano. Cuando comparamos esta secuencia a otras peptidasas de la familia M17, nuestra secuencia fue incluida consistentemente en un grupo diferente de las LAP de vertebrados. Este cluster incluye secuencias de insectos, nemátodos y platelmintos. Realizamos exhaustivas búsquedas en bases de datos y detectamos secuencias parciales homólogas de los diversos subgrupos de LAP. Consistentemente las LAP se dividen en tres sub-familias, dos de ellas ya identificadas, y una nueva que incluye las secuencias de helmintos parásitos. Encontramos ortólogos a las LAP de vertebrados en, cnidarios, insectos y moluscos, pero no en nematodos o platelmintos. Sin embargo, los posibles ortólogos a las secuencias de platelmintos corresponden a secuencias de cnidarios, artrópodos, nemátodos, anélidos y cordados como *Ciona intestinalis* o peces, pero no en humanos o ratón. La búsqueda en genomas completos confirma la existencia de tres genes ancestrales de LAP en metazoarios, con pérdidas selectivas de ellos en diversos linajes. De fundamental relevancia es el hecho de la ausencia de ortólogos a las LAP parasitarias en sus huéspedes definitivos. Predicciones de estructura secundaria de miembros de la nueva subfamilia muestran que comparten la estructura general de los miembros de la familia M17; el dominio C-terminal está bien conservado, y pese a la baja conservación de secuencia, el dominio N-terminal parece plegarse de modo similar a las enzimas bacterianas y de mamíferos. Identificamos motivos conservados que caracterizan a esta subfamilia, los que pueden considerarse característicos del grupo. Se discute la relevancia de estos resultados desde la perspectiva del control de las enfermedades parasitarias.

NUEVOS DERIVADOS DE *N*-ÓXIDO COMO AGENTES TRIPANOSOMICIDAS. GENERACIÓN DE RADICALES LIBRES Y EFECTO SOBRE LA RESPIRACIÓN CELULAR PARASITARIA

Boiani, L.^a, Boiani, M.^a, Cerecetto, H.^a, González, M.^a, Hernández, P.^a, Merlino, A.^a, Porcal, W.^a, Denicola, A.^b, Olea-Azar, C.^c, Gutierrez, M.^d, Morello, A.^d, Maya, J.D.^d

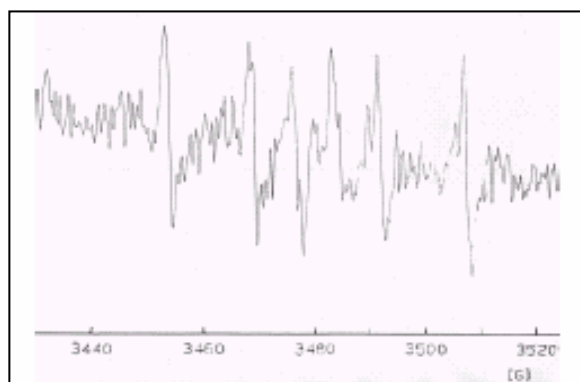
^a Lab. de Química Orgánica, Facultad de Ciencias-Facultad de Química, and

^b Lab. de Físicoquímica Biológica, Facultad de Ciencias, UdelaR, Iguá 4225, 11400 Montevideo, Uruguay.

^c Dpto. Química Inorgánica y Analítica, Facultad de Ciencias Química y Farmacéutica, and

^d Programa Farmacología Molecular y Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago de Chile, Chile. E-mail: amerlino@adinet.com.uy

Dos nuevas series de derivados de *N*-óxido, benzofuroxano y benzimidazol, han sido sintetizados y evaluados frente a *T. cruzi*, forma epimastigota de la cepa Tulahuen. Estos productos son el resultado de la modificación estructural de líderes, de ambas familias de compuestos, previamente identificados por nuestro grupo ^(1,2).



Dado que los mismos se desarrollaron como potenciales generadores de radicales libres en la célula parasitaria, decidimos confirmar biológicamente este fenómeno utilizando dos tipos de aproximaciones. Por un lado, se estudió el efecto en el consumo de oxígeno parasitario por exposición de *T. cruzi* a derivados de los *N*-óxidos (en ausencia y en presencia de cianuro). Por otro lado, se estudió, utilizando espectroscopia de EPR (Figura), la capacidad de los *N*-óxidos en formar radicales libres intraparasitariamente.

Con estos datos ha sido posible conocer algunos requerimientos estructurales para mejorar la actividad de futuros compuestos a desarrollar.

⁽¹⁾ *Benzo[1,2-c]1,2,5-oxadiazole N-Oxide Derivatives as Potential Antitrypanosomal Drugs. Structure-Activity Relationships. Part II.* G.Aguirre, H.Cerecetto, R.Di Maio, M.González, W.Porcal, G.Seoane, A.Denicola, M.A.Ortega, I.Aldana, A.Monge-Vega. *Archiv. Pharmazie*, 2002, 335, 15.

⁽²⁾ *Novel Antiprotozoal Products: Imidazole and Benzimidazole N-Oxide Derivatives and Related Compounds.* G.Aguirre, M.Boiani, H.Cerecetto, A.Gerpe, M.González, Y.Fernández, A.Denicola, C.Ochoa de Ocariz, J.J.Nogal, D.Montero, J.A.Escario. *Archiv. Pharmazie*, 2004, 337, 259. FONDECYT (Chile), PEDECIBA, *Apojado por Dinacyt - Fondo Clemente Estable y CSIC.*

PERFIL DE EXPRESIÓN DE TETRATIRIDIOS SOMETIDOS A DEPRESIÓN METABÓLICA

Canclini, L., Ehrlich, R y Esteves, A.

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

Mesocestoides corti -cestode ciclofilidio- si bien no constituye un problema sanitario, se ha tomado como modelo alternativo para el estudio de la biología de cestodes parásitos. Entre sus ventajas se destaca su fácil manejo en el laboratorio y la posibilidad de obtener su diferenciación sexual y asexual *in vitro* bajo condiciones relativamente sencillas, que lo perfilan como un organismo de utilidad para estudios de expresión génica diferencial vinculada a procesos biológicos. La depresión de la tasa metabólica es una importante estrategia de supervivencia de organismos sometidos a ambientes variables. El objetivo central del presente trabajo es iniciar la caracterización de vías metabólicas en platelmintos parásitos sometidos a condiciones hipometabólicas. El estudio molecular del metabolismo de estos parásitos es muy escaso pudiendo constituir una fuente importante de moléculas claves, posibles blancos de drogas o vacunas. Centramos así nuestra atención en la implementación de técnicas globales que nos permitan evidenciar cambios en los perfiles de expresión, en respuesta a diferentes estímulos. Previamente, hemos puesto a punto el marcado metabólico de tetratiridios, las formas larvarias del platelminto parásito *M. Corti*, y su análisis en geles bidimensionales. Las larvas extraídas de ratones infectados experimentalmente fueron deprivados de nutrientes, sometidos a stress térmico y de pH. Se analizó el perfil de expresión en cada situación a través de electroforesis en geles bidimensionales teñidos con nitrato de plata y auto-radiografiados. Por otro lado, las proteínas mayormente expresadas se enviaron para su identificación por espectrometría de masa MALDI-TOF. En una próxima etapa, y con el objetivo de identificar los genes involucrados en los cambios de los perfiles observados se implementarán técnicas sustractivas.

Este trabajo ha sido financiado por CONICYT

CISTATINA DE *FASCIOLA HEPATICA*: PURIFICACIÓN, CLONADO Y EXPRESIÓN FUNCIONAL DE ADNc

Cappetta, M. (1) Cancela M. (1, 2) , Iburguren S. (3), Condon B. (4), Dalton J.P. (4), Salinas G. (3), Díaz A. (3) and Roche L. (1)

- (1) Departamento de Genética, Facultad de Medicina, UDELAR.
- (2) Unidad de Biología Parasitaria Facultad de Ciencias / Instituto de Higiene, UDELAR.
- (3) Cátedra de Inmunología Facultad de Química / Instituto de Higiene, UDELAR.
- (4) School of Biotechnology, Dublin City University, Ireland.

Las cistatinas son inhibidores naturales que regulan la actividad de las cisteín proteasas de la familia de la papaína (catepsinas) en los metazoarios. Las catepsinas L1 y L2 del parásito trematodo *F hepatica* constituyen las principales proteínas secretadas por los parásitos adultos y se les atribuye un papel fundamental en la nutrición, invasión y evasión de la respuesta inmune del mamífero huésped definitivo (ganado ovino, bovino y hombre). Se buscaron cistatinas de *F hepatica* que regulen la actividad de las cisteín proteasas endógenas y que también podrían modular la respuesta inmune del huésped como se observó en los nematodos parásitos. Se aisló una proteína termoestable de aproximadamente 10 kDa de extractos de adultos usando cromatografía de actividad con carboximetil-papaína-sefarosa (elución a pH 11.5) que mostró potente actividad inhibitoria de papaína, catepsina B bovina, catepsina L1 y L2 de *F hepatica*. Paralelamente se aisló un ADNc de adultos usando RACE 5' y RACE 3' con primers degenerados diseñados a partir de regiones conservadas. Este ADNc codifica para una molécula que contiene las región QVVAG característica de inhibición de las proteasas de la familia de la papaína, un péptido señal y 6 residuos de cisteína. Como en otras cistatinas de invertebrados, se observan una mezcla de características presentes de las dos subfamilias de vertebrados. La región codificante, incluyendo el péptido señal se clonaron en un vector de expresión de *S. cerevisiae*, se identificó actividad inhibitoria de papaína, catepsina L1 y L2 de *F hepática* en el medio de cultivo de las levaduras.

ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE DERIVADOS DE 5-NITROINDAZOL CON ACTIVIDAD TRIPANOSOMICIDA. COMPORTAMIENTO ELECTROQUÍMICO Y EFECTO SOBRE LA RESPIRACIÓN CELULAR PARASITARIA

Cerecetto, H.^a, Gerpe, A.^a, González, M.^a, Olea-Azar, C.^b, Maya, J.D.^c, Morillo, A.^c, Ochoa de Ocáriz, C.^d, Arán, V.J.^d

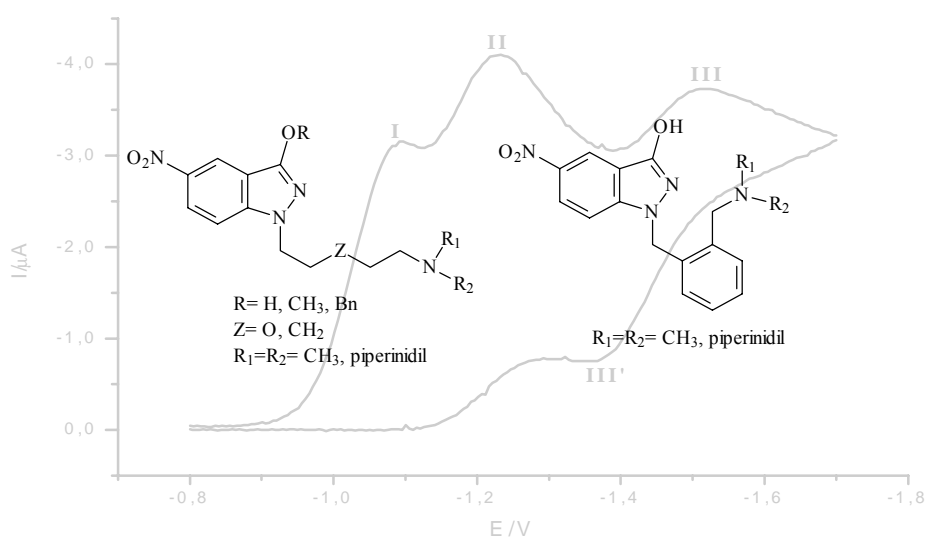
^a Lab. de Química Orgánica, Facultad de Ciencias-Facultad de Química, UdelaR, Iguá 4225, 11400, Montevideo, Uruguay.

^b Dpto. Química Inorgánica y Analítica, Facultad de Ciencias Química y Farmacéutica,

^c Dpto. de Farmacología Clínica y Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago de Chile, Chile.

^d Instituto de Química Médica, CSIC, Madrid, España. E-mail: alegerpe@adinet.com.uy

Una serie de trece nuevos derivados de 5-nitroindazol han sido sintetizados y evaluados frente a *T. cruzi*, forma epimastigota y trypomastigota de la cepa Brener. Tres de dichos derivados presentaron muy buena actividad tripanosomicida frente a la forma epimastigota⁽¹⁾ y cuatro derivados frente a la forma trypomastigota.



Como forma de preparar nuevos derivados más activos se llevan a cabo estudios que permitan dilucidar el mecanismo de acción biomolecular de esta familia de compuestos. Dada la presencia de un grupo nitro en la estructura de los mismos se plantea estudiar la similitud del mecanismo de acción tripanosomicida con el mecanismo de Nifurtimox, fármaco de referencia que posee un grupo nitro en su estructura. Para ello se estudia: el efecto de los compuestos sobre la respiración de *T. cruzi*, en ausencia y presencia de anión cianuro; la capacidad de formación de radicales libres intraparasitariamente, utilizando espectroscopia de EPR; y el comportamiento electroquímico, mediante voltametría cíclica de barrido lineal. Así, es posible evidenciar que los productos más activos muestran una importante inhibición de la respiración

del parásito *in vitro*, sin evidencia de la formación de especies radicales (ausencia de señales en EPR).

⁽¹⁾ Arán, V.J.; Ochoa, C.; Boiani, L.; Buccino, P.; Gerpe, A.; González, M.; Denicola, A.; Montero, D.; Nogal, J.J.; Gómez-Barrio, A.; Uzqueta, A.; López de Ceraín, A.; Piro, O. **Synthesis and Biological Properties of New 5-Nitroindazole Derivatives.** *Bioorg. Med. Chem., en prensa.*

FONDECYT (Chile), AECI (España), Proyecto de colaboración CSIC (España)-UdelaR

ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA DEL GEN *EgGST* DE *Echinococcus granulosus*

Chalar, C.¹, Fernández, C.², Zaha, A.³ y Fernández, V.²

¹Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias;

²Cátedra de Inmunología, Facultad de Química

³Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, UFRGS.

Las Glutation S- transferasas (GSTs) son proteínas multifuncionales que están codificadas por una familia multigénica presente en todos los organismos aerobios. Constituyen un sistema destacado de protección celular catalizando reacciones de conjugación con el glutatión reducido (GSH) y uniéndose a ligandos hidrofóbicos. Son inducidas por xenobióticos, asignándoseles un papel en el desarrollo de resistencia a drogas lo que ha despertado el interés en el estudio de la regulación génica de su expresión. En helmintos parásitos, las GSTs son un sistema clave de detoxificación y han sido consideradas como blancos atractivos para la intervención quimio y/o inmunoterapéutica en las infecciones causadas por ellos. Varias GSTs de helmintos han sido caracterizadas bioquímica y molecularmente, existiendo numerosos ADNc descritos aunque son pocas las secuencias genómicas analizadas. Con anterioridad, aislamos y caracterizamos el ADNc de una GST inducible por fenobarbital del parásito helminto *Echinococcus granulosus* (*EgGST*) de gran similitud con *EMGST1* de *E. multilocularis*, habiendo encontrado que ambas GSTs están filogenéticamente relacionadas con las de clase mu de mamíferos. Con el objetivo de comenzar a diseccionar los mecanismos moleculares de la expresión de *EgGST* y su inducción por xenobióticos, en este trabajo presentamos el clonado del gen *EgGST* y el estudio de su estructura. Se analiza asimismo, el gen *EMGST1* y genes ortólogos de parásitos relacionados.

ACTIVACIÓN DEL FACTOR XII DE LA COAGULACION POR EL METACESTODO DE *E. granulosus*.

Ferrari, M.I.¹, Denicola, A.² y Ferreira, A.M.¹

¹Cátedra de Inmunología (Facultad de Ciencias/Facultad de Química), Montevideo; ²Unidad de Físicoquímica Biológica, Facultad de Ciencias, Montevideo.

Este trabajo investigó la interacción del metacestodo de *E.granulosus* (quiste hidático,QH) con el factor XII (fXII) de la vía intrínseca de la coagulación, una cascada enzimática que también promueve inflamación. Es interesante porque la inflamación contribuye a la defensa del hospedero frente a la infección, y su control se asocia con la sobrevivencia del parásito. La vía intrínseca puede iniciarse por activación del fXII tras su unión a superficies cargadas negativamente; este fenómeno podría ocurrir sobre el QH dado que su pared contiene *myo*-inositol hexakisfosfato ($InsP_6$), una molécula polianiónica. Se analizó la capacidad de QH de unir y activar el fXII incubando ($110\mu M Zn^{2+}$, $37^\circ C$, $22hs$) fXII comercial con QHs carentes de $InsP_6$ (por tratamiento con EDTA, QH_{InsP_6-}) y QHs controles (QH_{InsP_6+}), y determinando la cantidad y el grado de activación del fXII retenido sobre los QHs. Aproximadamente el 50% del fXII se removió en forma activa de QH_{InsP_6+} , pero no de QH_{InsP_6-} . También se comprobó que la sal cálcica de $InsP_6$ puede unir fXII. Además, la capacidad del QH de activar fXII se estudió incubando QH_{InsP_6+} en plasma y midiendo en éste la generación de actividad fXIIa y la actividad fXII remanente por ensayos fluorimétricos. Los QH_{InsP_6+} generaron niveles apenas detectables de fXIIa en plasma, pero provocaron un descenso en la actividad fXII remanente del plasma proporcional al número de QHs utilizados (3 veces para 3QH/80 μ Lplasma), sugiriendo que el QH posee una capacidad limitada de activar el fXII. Ensayos fluorimétricos y remoción del $InsP_6$ con fitasa se utilizarán para establecer la contribución del $InsP_6$ a esta capacidad.

EgGST, UNA GST DE *Echinococcus granulosus*, Y EL METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS

Pascovich, L.¹, Harispe, L.^{1,2}, Fraga, R.¹, Chalar, C.² y Fernández, V.¹

¹Cátedra de Inmunología, Facultad de Química

²Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias

Las glutatión S-transferasas (GSTs) constituyen una familia de proteínas multifuncionales inducibles por xenobióticos e involucradas en la detoxificación celular de componentes citotóxicos y genotóxicos. En helmintos parásitos las GSTs adquieren especial relevancia debido a que estos organismos presentan escasos mecanismos de detoxificación alternativos. Han sido descritas formas citosólicas y secretadas de estas enzimas en *Fasciola* spp y *Schistosoma* spp. En *Echinococcus* spp la actividad GST fue inicialmente descrita en el citosol de la forma larvaria de *E. granulosus*. En nuestro laboratorio, recientemente se clonó y caracterizó un gen de *E. granulosus* que codifica para una GST inducible por Fenobarbital (EgGST). Además, se produjo la proteína recombinante (EgGSTr) que presentó una actividad específica de $3000 \pm 258 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína. La caracterización bioquímica y la determinación de los territorios de expresión de esta GST podría contribuir al entendimiento de la relación entre el hospedero y el parásito aportando eventualmente, elementos que permitan el control de la infección. En este sentido, en este trabajo se presentan las propiedades de la EgGSTr enzimáticamente activa, estableciendo su patrón de especificidades con segundos sustratos y su sensibilidad a distintos inhibidores, incluyendo moléculas anti-helmínticas. Se presentan asimismo, los estudios realizados para determinar la localización de la expresión parasitaria de EgGST y las consecuencias de la inhibición *in vitro* de la actividad GST.

TcRBP17: UNA NUEVA PROTEÍNA DE UNIÓN AL ARN DE Trypanosoma cruzi

Pérez, L.¹, Duhagon, M. A.¹, Robillo, C.², Williams, N.³ y Dallagiovanna, B.¹ y Garat, B.¹

¹Laboratorio de Interacciones Moleculares, Facultad de Ciencias, ²Laboratorio de Inmunología Básica, Facultad de Medicina, Facultad de Ciencias. UdelaROU, ³Department of Microbiology, SUNY-Buffalo. USA.

lperez@fcien.edu.uy

El ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* involucra diferentes estadios transcurriendo en dos huéspedes (vertebrado e invertebrado). Los tripanosomátidos regulan la expresión génica principalmente a nivel post-transcripcional. En trabajos anteriores presentamos la obtención de una proteína de unión al ARN (Tc17) cuyo PM estimado es 17 kDa. Ensayos de Southern blot mostraron que esta proteína está codificada por un gen de copia única. Obtuvimos la proteína recombinante Tc17-GST y a partir de ella la proteína Tc17. Generamos también un anticuerpo policlonal anti Tc17 en conejo. Para realizar estudios fenotípicos, construimos el plásmido pTexTc17 con el cuál transfectamos *T. cruzi*. Mediante ensayos de Western-blot se verificó que los transfectantes sobreexpresan la proteína Tc17. Estudios preliminares en parásitos recién seleccionados, indican que esta sobreexpresión se acompaña de una mayor tasa de crecimiento y un aumento importante en la tasa de diferenciación a tripomastigotas (40%). Curiosamente, los transfectantes mantenidos en cultivo dejan de presentar este fenómeno y dejan de poseer una cantidad de Tc17 detectable por Western blot.

El estudio funcional de Tc17 está en curso. Para ello abordamos dos estrategias, la primera de ellas, consiste en identificar proteínas conocidas que interaccionen con Tc17, para lo cual se esta poniendo a punto la técnica de inmunoprecipitación y “pull down” de proteínas. Por otro lado, se pretende conocer el ARN blanco de esta proteína también usando técnicas de inmunoprecipitación y “pull down” de ARN, los ARN capturados serán amplificados y marcados con fluoróforos para ser hibridados en un microarray.

APROXIMACIONES MOLECULARES AL ESTUDIO DE INTERACCIONES PROTEINA-PROTEINA EN *T. CRUZI*

Smircich, P.¹, Duhagon, M.A.¹, Pérez, L.¹, Ciganda, M.¹, Williams, N.², Dallagiovanna, B.¹, Garat, B.¹

¹-Laboratorio de Interacciones Moleculares, Facultad de Ciencias. Montevideo.

²-Department of Microbiology, SUNY-Buffalo. USA

El conocimiento de las interacciones entre las diversas proteínas celulares es fundamental para la comprensión del funcionamiento celular. Dada su importancia se han desarrollado diversas metodologías que permiten detectar estas interacciones proteicas e identificar las moléculas participantes. Estas técnicas pueden subdividirse en dos grandes grupos: las metodologías basadas en ensayos de unión *in-vitro* (ej. pull-down, crosslinking, coimmunoprecipitación) y las moleculares que detectan complejos formados *in-vivo*. Dentro de estas últimas encontramos los estudios de doble híbrido en levadura que permiten evaluar interacciones que se están produciendo *in-vivo* entre la proteína problema y un péptido conocido; y la técnica de TAP-TAG que permite purificar por cromatografía de afinidad los complejos completos previamente formados *in-vivo* por la proteína de interés. Se conoce muy poco sobre la regulación de la expresión génica en *Trypanosoma cruzi*. Nuestro grupo está estudiando dos proteínas de este parásito involucradas en este proceso. Tc38 fue identificada como una proteína de unión a repetidos de dinucleótidos (TG)_n, mientras que la proteína Tc17 posee un dominio característico de unión al ARN. En este trabajo nos planteamos la identificación, por metodologías moleculares, de proteínas que formen parte de complejos junto con Tc38 y Tc17, esperando así contribuir a la dilucidación de la función de las mismas en *T. cruzi*.

SESIÓN DE POSTERS 2:

Endócrino – Reproductor, Neurociencias, Biología del Desarrollo
y Radicales Libres

NIVELES DE TRANSCRIPCIÓN DE RECEPTORES DE ESTRÓGENOS EN ÚTEROS DE OVINOS CON FASES LUTEAS SUBNORMALES

Acuña, S.^{1*}, Tasende, C.^{1,2}, Rodríguez-Piñón, M.¹ y Garófalo, E.¹

Área Bioquímica¹, Departamento de Biología Molecular y Celular, Facultad de Veterinaria, Montevideo-Uruguay y Clinical Chemistry², Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden. *saap22@adinet.com.uy

El tratamiento a ovinos en anestro estacional con múltiples microdosis de GnRH provoca fases lúteas subnormales (FLSN). El mismo tratamiento con progesterona (P₄) previa provoca fases lúteas normales (FLN). El objetivo fue determinar los niveles uterinos de transcritos del receptor de estrógenos (ARNm-RE α) en ovinos con FLSN. Se utilizaron 22 ovejas Corriedale adultas en anestro estacional. Para inducir FLN, se realizó un tratamiento con P₄ y GnRH (grupo control, n=11) y para inducir FLSN un tratamiento solo con GnRH (grupo FLSN, n=11). Al día 1 de finalizada la administración de GnRH se sacrificaron 6 animales de cada grupo y al día 5 se sacrificaron 5 de cada grupo. El tejido uterino fue homogeneizado y se extrajeron los ácidos nucleicos totales, cuya concentración se determinó por espectrofotometría. La determinación de ARNm-RE α uterino se realizó por hibridización en solución con sondas radioactivas específicas para ovinos. Los niveles de ARNm-RE α fueron comparados por ANOVA test y considerando significativo p<0.05. Los niveles fueron expresados en porcentaje (%), $X \pm SEM$) en relación al FLN. En el grupo FLSN, los niveles de ARNm-RE α uterinos fueron significativamente mayores al día 5 que al día 1 (p<0.05). No se encontraron diferencias significativas entre los días 1 y 5 en el grupo control (FLN). Al día 5, el grupo FLSN presentó mayores niveles de ARNm-RE α que el grupo control (p<0.05). Los resultados encontrados demuestran que en las ovejas con FLSN existe un mecanismo transcripcional de inducción de la expresión de RE α no observado en ovejas con FLN.

SEMAFORINAS EN EL ÚTERO Y SU REGULACIÓN POR EL ESTRÓGENO

Bianchimano, P., Richeri, A. y Brauer, M.M.

Laboratorio de Biología Celular, I.I.B.C.E., Montevideo.

Las semaforinas son una familia de glicoproteínas secretadas, transmembranosas o ancladas a la membrana plasmática que incluye 30 miembros, todos los cuales comparten un dominio SEMA extracelular de aproximadamente 500aa. A nivel del sistema nervioso, estas moléculas han sido implicadas en la determinación de la polaridad neuronal, el guiado axónico, la fasciculación y ramificación de los axones, así como también en la formación de las sinapsis. Las semaforinas han mostrado ser potentes inhibidores para el crecimiento de los axones simpáticos, siendo capaces de repelerlos de territorios neurales y no-neurales inapropiados, tanto durante el desarrollo como en la vida adulta. Estos antecedentes posicionan a las semaforinas como candidatos interesantes en relación a la completa pérdida de nervios simpáticos que se observa en el útero en respuesta a la exposición prolongada a niveles elevados de estrógeno. En el presente trabajo analizamos la expresión de semaforinas en el útero de la rata y su regulación por el estradiol utilizando métodos inmunohistoquímicos asociados a estudios densitométricos. En condiciones de bajo estrógeno (rata prepuber) observamos que la señal para SEMA se encontraba fundamentalmente circunscripta al epitelio endometrial y sus glándulas. Luego del tratamiento prepuberal crónico con estradiol, esta señal aumentó significativamente y se hizo evidente en el miometrio. Estos resultados apoyan la idea de que la denervación simpática del útero inducida por los estrógenos está vinculada con el aumento de señales fuertemente repulsivas para los nervios simpáticos en el efector y señalan a las semaforinas como una de las señales inhibitorias presentes en el útero estrogenizado.

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS EN EL CERVIX DE OVEJAS EN ANESTRO ESTACIONAL TRATADAS CON PROGESTERONA Y GnRH

Rodríguez-Piñón M., Tasende C., Puime P. y Garófalo E.G.

Bioquímica, Facultad de Veterinaria, Montevideo-Uruguay. marodri@adinet.com.uy

Se investigó la regulación de la expresión del receptor de estrógenos (RE) en cervix craneal y caudal de ovejas en anestro estacional inducidas a ovular, midiendo las concentraciones de RE α -ARNm por hibridización en solución y de RE por ensayos de unión. De los dos subtipos de RE reportados (α y β) el RE α es predominante en cervix. Se realizaron dos experimentos donde se indujo la ovulación de ovejas en anestro estacional administrando Progesterona y GnRH, con sus controles respectivos. El cervix se extrajo 1 día (experimento 1) y 1 o 5 días (experimento 2) luego del tratamiento. Los datos se analizaron por ANOVA con un nivel de significación $P < 0.05$. Un día luego del tratamiento la concentración de RE α -ARNm aumentó respecto a los controles en ambas zonas cervicales. El tratamiento con P disminuyó la concentración de RE α -ARNm y de RE en la zona craneal. Los niveles de RE α -ARNm y de RE en la zona craneal fueron más altos al día 1 que al día 5 luego del tratamiento. El aumento de los niveles de RE α -ARNm, pero no los de RE, sugiere la existencia de mecanismos post-transcripcionales de regulación de la expresión de RE. La disminución de las concentraciones de RE α -ARNm y RE en el cervix craneal sugiere mecanismos transcripcionales de inhibición de la expresión del gen de RE.

Financiación: CIDEF-Fac. de Veterinaria, PEDECIBA-Ministerio de Educación y Cultura.

EFFECTO DE LA SUBNUTRICIÓN SOBRE LA SENSIBILIDAD UTERINA A LA PROGESTERONA Y A LOS ESTRÓGENOS EN OVINOS

Sosa, C.¹, Viñoles, C.¹, Forsberg, M.², Valares, J.A.³, Forcada, F.³, Abecia, A.³, Meikle, A.¹

¹Facultad de Veterinaria, Uruguay. E-mail: cecis@adinet.com.uy.

²Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden

³Dpto de Producción Animal, Universidad de Zaragoza, España

Para que la preñez se establezca el embrión debe evitar la luteólisis que ocurre alrededor del Día 14 postovulación. En ese proceso participan las hormonas esteroideas actuando a través de sus proteínas receptoras. Se ha demostrado que la subnutrición afecta la supervivencia embrionaria. En este trabajo se testeó la hipótesis de que esto podría deberse a alteraciones en la sensibilidad uterina a estas hormonas. Se determinó el efecto de la subnutrición sobre los niveles plasmáticos y uterinos de progesterona (P_4) y estradiol (E_2), y la expresión endometrial de los transcriptos del receptor de estrógenos (RE) y de progesterona (RP) al momento esperado de la luteólisis (Día 14 postovulación) en ovejas subnutridas (Grupo B) y ovejas controles. El Grupo B presentó mayores concentraciones plasmáticas de P_4 y E_2 que el grupo control, lo cual puede ser explicado por una menor depuración hepática de las hormonas esteroideas en las ovejas subnutridas. No se observaron diferencias en el contenido endometrial de P_4 y esto concuerda con resultados similares encontrados previamente al Día 10. El contenido endometrial de E_2 tendió a ser mayor en el Grupo B ($P=0.06$). El grupo control presentó una mayor concentración uterina de transcriptos de RE y RP que el Grupo B. Alteraciones en la expresión génica de los RE y RP al Día 14 podrían explicar las fallas en el establecimiento de la preñez y en la supervivencia embrionaria en ovejas subnutridas.

SENSIBILIDAD A LA APOPTOSIS EN CELULAS DE CRISTALINO BOVINO: INFLUENCIA DE LA FORMA CELULAR Y DEL SISTEMA DE FILAMENTOS INTERMEDIOS

Arocena, M. y Arruti, C.

Laboratorio de Cultivo de tejidos, Sección Biología Celular, Facultad de Ciencias, Montevideo

Como etapas iniciales de este estudio, estamos analizando efectos de la acrilamida sobre células del epitelio de cristalino bovino (células BEL). La acrilamida, conocido agente neurotóxico, provoca el colapso de los filamentos intermedios alrededor del núcleo. Este efecto es específico, pues ni los filamentos de actina ni los microtúbulos se ven afectados en la mayoría de los tipos celulares estudiados. Las células BEL expresan vimentina como único tipo de filamento intermedio citoplasmático. En células BEL adheridas a vidrio, el tratamiento con acrilamida 5mM por cuatro horas produce un marcado cambio de forma: las células se redondean y en su periferia se observan ya sea unas pocas prolongaciones o una extensiva arborización. La vimentina aparece colapsada en la región perinuclear y en las prolongaciones. Inesperadamente, se observaron grandes alteraciones en los filamentos de actina. Las fibras de stress, presentes en abundancia en células control, desaparecen de las células tratadas, en las que la señal de actina fibrilar se reduce a acúmulos periféricos. Este efecto es reversible, las células transferidas a un medio sin acrilamida recuperan su morfología normal en menos de veinticuatro horas. Tratamientos con acrilamida entre una y cuatro horas sugieren que las alteraciones comienzan antes en la actina que en la vimentina. Por otro lado, en células adheridas a sustratos de gelatina, la acrilamida parece producir cambios más rápidos que en células adheridas sobre vidrio. En cambio, cuando las células se tratan con acrilamida durante el proceso de adhesión, los efectos demoran más en aparecer.

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA DISTROFIA MIOTÓNICA TIPO 1 EN URUGUAY

Braida, C., Almada, R., Smircich, P., Raggio, V., y Rodríguez, M. M.

Departamento de Genética, Facultad de Medicina, UdelaR

La Distrofia miotónica tipo 1, una enfermedad multisistémica, constituye el tipo de distrofia muscular más frecuente del adulto. Está originada por una mutación en el gen *DMPK*, que se transmite de manera autosómica dominante, observándose el fenómeno de anticipación (aumento de la severidad y/o inicio más temprano de los síntomas en las sucesivas generaciones). La mutación consiste en un aumento del número de trinucleótidos CTG repetidos en la región 3' no traducida del gen. Los individuos normales presentan entre 5 y 35 repetidos, y en los afectados se expanden hasta de cientos a miles. En el Departamento de Genética de la Facultad de Medicina, se realiza el diagnóstico molecular de esta patología mediante la amplificación de la región de repetidos por PCR. Se determina el número de repetidos mediante electroforesis en geles de agarosa, y transferencia tipo Southern Blot no radiactiva. Se analizaron 70 individuos, provenientes fundamentalmente de las Policlínicas de Genética del Departamento y del Instituto de Neurología, habiéndose encontrado 25 familias y 45 pacientes portadores de la mutación causante de la Distrofia miotónica tipo 1, entre los cuales 4 casos presentan la forma congénita. En todos los casos existe una correlación entre la manifestación clínica y la presencia de la mutación. El estudio molecular es una herramienta fundamental para el diagnóstico de certeza de esta patología que permite brindar asesoramiento genético a los pacientes y posibilita el estudio de familiares asintomáticos con riesgo de ser portadores de la patología.

PRODUCCIÓN Y DIFUSIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) DESDE FIBRAS AFERENTES PREMOTORAS EN EL NÚCLEO MOTOR DEL TRIGÉMINO (NMT) DEL COBAYO

Fernández Alvarez, A.¹, Gómez, L.², Budelli, R.², Abudara, V.¹

¹ Depto. de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República

² Sección Biomatemáticas, Facultad de Ciencias, Universidad de la República

El NO es neurotransmisor anterógrado en el NMT. Las únicas fuentes neurales nitrérgicas son fibras premotoras (presinápticas) que contienen la NOSintasa neuronal (NOSn). La detección de NO en el NMT indicará síntesis de NO en dichas fibras. Las motoneuronas trigeminales carentes de NOSn constituyen un blanco postsináptico. La distancia de difusión del NO depende del tamaño de la fuente generadora. Numerosos estudios en el SNC, consideran al soma neuronal como fuente nitrérgica. Contrastando, nuestro modelo considera a fibras nitrérgicas (0,6-1,6 μ m), como fuente generadora, ergo: ¿será el NO producido ante la activación de fibras delgadas *in vivo*, suficiente para alcanzar un grupo de motoneuronas trigeminales en concentraciones biológicamente efectivas? Empleamos rodajas vivas de tronco cerebral de cobayo, que incluyen el NMT pero no somas de origen de las fibras nitrérgicas. Detectamos NO intracelular (fluoróforo DAF 2-DA y microscopía) en motoneuronas marcadas retrógradamente. Diseñamos un software para procesar las imágenes. En situación basal, detectamos rodajas, (a) sin NO, (b) conteniendo NO en (b₁) somas y (b₂) estructuras granulares y fibra-símiles próximas a motoneuronas. En presencia de alto K⁺, el curso temporal del cociente fluorescencia relativa/área (unidades arbitrarias) en las motoneuronas, muestra un aumento transitorio (encendido-apagado) con latencias al pico que difieren entre células. Los máximos alcanzados fueron de mayor amplitud y latencia que los observados en situación control. Ocasionalmente, el avance de un frente de fluorescencia recorre el campo enfocado. La detección de fluorescencia en las motoneuronas, evidencia que el NO producido en fibras delgadas activadas simultáneamente, es suficiente para difundir e ingresar a dichas células.

REGULACIÓN A LARGO PLAZO DE HEMICANALES POR FGF-1 EN ASTROCITOS ESPINALES

Garré, J.¹, Retamal, M.³, Cassina, P.², Sáez, J.³ y Abudara, V.¹

¹ Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República

² Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

³ Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago 8331010, Chile

Estudios recientes indican que hemicanales, presentes en la superficie celular y formados por seis subunidades proteicas denominadas conexinas (Cxs), se abren y participan en la señalización autócrina-parácrina al permitir la liberación al medio extracelular de moléculas de señalización como ATP. En astrocitos espinales, el factor de crecimiento fibroblástico ácido (FGF-1) genera un fenotipo neurotóxico y reactivo. Observamos que la membrana plasmática de dichos astrocitos permite el pasaje de trazadores de permeabilidad de hemicanales de uniones en hendidura (UH), como DAPI, bromuro de etidio y amarillo de Lucifer (el índice de captación, es 0,12 a los 20min, 0,32 a las 7h y cae progresivamente hasta 0,08 a las 40h). A las 4h o más de tratamiento la captación de trazadores es sensible a bloqueadores de canales de UH (octanol y ácido 18 α -glicirretínico) e insensible a antagonistas de canales purinérgicos (ATPoxidado y suramina), pero a las 2h es sensible a antagonistas de canales ionotrópicos de ATP, ATPoxidado/suramina, e insensible al octanol. Los datos funcionales a las 7h de tratamiento (máxima captación), coinciden con el aumento en los niveles de hemicanales de Cx45 (80%) detectados por biotilización de proteínas de superficie y posterior análisis por *immunoblot*. El FGF-1 aumenta además los niveles totales de Cx43 (27%) y Cx45 (80%) y aumenta la inmunoreactividad intracelular difusa de ambas Cxs. Proponemos que, primero la apertura de canales ionotrópicos de ATP y luego de hemicanales formados por Cx43 y/o Cx45 permitiría que los astrocitos liberen más moléculas de señalización durante su transformación al fenotipo reactivo.

LOCALIZACIÓN DE LA ENZIMA CU,ZN-SOD HUMANA EN AXONES MOTORES EN UN MODELO ANIMAL TRANSGÉNICO DE ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA (ELA)

Sotelo Silveira, J.^{1,2}, Horjales, S.¹, Cota, G.¹, Baraibar, M.³, Battistoni, J.³, Señorale, M.¹, Marín, M.¹, Ehrlich, R.¹, Barbeito, L.².

¹ Secc. Bioquímica, Facultad de Ciencias

² Depto. Neurobiología Celular y Molecular, IIBCE.

³ Lab. de Inmunotecnología, Cat. Inmunología Fac Ciencias-Fac. Química.

La agregación citoplásmica de proteínas se asocia a la patogénesis de diversas enfermedades neurodegenerativas. En particular, la agregación de formas mutadas de la enzima Cu, Zn-superóxido dismutasa (SOD1) se asocian a la muerte progresiva de motoneuronas en formas familiares de ELA. El mecanismo involucrado podría comprometer las mitocondrias en neuronas motoras. En el presente trabajo hemos estudiado la distribución subcelular de la SOD1 humana en el territorio axonal y su asociación a otros componentes celulares, en ratas que expresan el transgen la mutación G93A (hSOD1-G93A) y que desarrollan parálisis al 3er mes de vida. Para ello se ha producido y utilizado un anticuerpo policlonal específico para la SOD1 humana, anticuerpos anti-porina, nitrotirosina, tubulina, así como YOYO-1. La preparación utilizada para estudiar el axoplasma de las motoneuronas afectadas fueron “wholemounds” axonales aislados mediante microdissección a partir de raíces ventrales de ratas asintomáticas transgénicas para hSOD1 G93A de 65 días. A diferencia de los axones sensitivos y motores normales, observamos que la hSOD1 se dispone en acúmulos esféricos a intervalos regulares a lo largo de los axones motores afectados. Los mismos colocalizan con marcadores mitocondriales (anti porina y YOYO-1) y con inmunoreactividad para la nitrotirosina. A su vez, la distribución de tubulina no presenta alteraciones. Estos resultados resaltan aspectos no explorados de esta patología que indican la presencia de alteraciones axonales localizadas, de desarrollo temprano, con posibles implicancias en la generación de ELA.

N-T-BOC L-TIROSINA TERT-BUTIL ÉSTER (BTBE): SONDA HIDROFÓBICA PARA EL ESTUDIO DE LAS REACCIONES Y DIFUSIÓN DEL PEROXINITRITO EN MEMBRANAS Y LIPOPROTEÍNAS

Bartesaghi, S.¹, Romero, N.¹, Trujillo, M.¹, Batthyány, C.¹, Zhang, H.², Joseph, J.², Kalyanaraman, B.² y Radi, R.¹

¹ Dpto. de Bioquímica y Centro de Investigaciones Biomédicas en Radicales Libres, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

² Medical College of Wisconsin, Wisconsin, USA

El peroxinitrito (ONOO^-) es un agente oxidante capaz de interactuar con compartimentos hidrofóbicos biológicamente relevantes. Durante estas interacciones puede descomponerse para dar radicales secundarios ($\cdot\text{OH}$, $\text{CO}_3^{\cdot-}$ y $\cdot\text{NO}_2$) los cuales son capaces de participar en procesos de oxidación y nitración de lípidos y proteínas. Estos estudios están dirigidos a caracterizar los mecanismos de nitración de tirosina mediados por peroxinitrito en compartimentos hidrofóbicos tales como liposomas, membranas y lipoproteínas, mediante la utilización de un análogo hidrofóbico de la tirosina, BTBE el cual se puede nitrar y dimerizar por radicales derivados del ONOO^- .

Los estudios de incorporación en membranas de glóbulos rojos muestran que se incorporan 1×10^7 moléculas de BTBE / glóbulo rojo, cuando se incuban a 50 % v/v en buffer isotónico pH 7,4 durante 30 min a 45°C en presencia de BTBE (10 mM). La adición de ONOO^- a los glóbulos rojos con BTBE pre-incorporado resulta en la formación de NO_2 -BTBE y en la inhibición de la nitración de proteínas de membrana del glóbulo rojo dependiente de ONOO^- . El BTBE también fue incorporado a lipoproteínas de baja densidad (LDL) (10-20 moléculas de BTBE / partícula de LDL) y la adición de ONOO^- resultó en la nitración del análogo de tirosina. En suma, estos resultados demuestran que el BTBE puede a) difundir e incorporarse a compartimentos hidrofóbicos pre-formados b) es una sonda que puede ser utilizada para seguir procesos oxidativos dependientes de especies reactivas del nitrógeno en membranas, liposomas y lipoproteínas y c) puede interferir en reacciones radicalares en estructuras lipofílicas.

LA PEROXIRREDOXINA DE GLÓBULO ROJO HUMANO DESCOMPONE PEROXINITRITO CATALÍTICAMENTE A EXPENSAS DE TIOLES

Manta, B. y Denicola, A.

Laboratorio de Físicoquímica Biológica, Facultad de Ciencias y Center for Free Radical Research, Universidad de la República, Montevideo.

Las peroxirredoxinas (Prx) son enzimas antioxidantes dependientes de tioles que reducen peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y peróxidos orgánicos a expensas de tiorredoxina, triparredoxina u otros tioles. Los glóbulos rojo humanos (GR) poseen una Prx de 22 kDa la cual es la segunda proteína más abundante del citosol luego de la hemoglobina. En los GR, que están más expuestos a estrés oxidativo que otros tipos celulares debido a la abundancia de hemo y oxígeno, esta Prx aparece como una primera línea de defensa contra agentes oxidantes como ser el peroxinitrito, producto de la reacción entre el anión superóxido y el óxido nítrico formados en el endotelio en respuesta a situaciones de estrés oxidativo. El peroxinitrito es un potente oxidante que puede difundir a través de las membranas de los GR, resultando en daño oxidativo y comprometer su funcionalidad. En los últimos años se ha demostrado que la Prx presentan actividad “peroxinitrito-reductasas”, siendo esta actividad encontrada en Prx bacterianas y recientemente en una Prx humana. En este trabajo purificamos la 2-Cys Prx de GR humano, mediante tres pasos cromatográficos. La Prx purificada reduce catalíticamente H_2O_2 así como peroxinitrito a expensas de tioles. La reacción determina la formación de nitrito y la dimerización de la enzima, en una reacción directa con una constante de segundo orden de $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, como pudimos determinar por espectroforometría con accesorio de flujo detenido. La Prx es capaz de proteger a la hemoglobina de la oxidación por peroxinitrito, indicando un rol en las defensas antioxidantes del GR.

INACTIVACIÓN DE LA ACONITASA MITOCONDRIAL POR PEROXINITRITO.

Tórtora, V.; Radi, R.; y Castro, L.

Departamento de Bioquímica y Centro de Investigaciones Biomédicas en Radicales Libres, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

La mitocondria es el principal sitio dónde se generan especies reactivas del oxígeno a nivel intracelular. El óxido nítrico (NO) producto de las óxido nítrico sintasas, se produce o difunde hacia la mitocondria. Superóxido (O_2^-) y NO reaccionan produciendo peroxinitrito (ONOO^-), molécula altamente oxidante y nitrante. La aconitasa mitocondrial (aconitasa_m), enzima del ciclo de Krebs, contiene un centro hierro-azufre cúbico en su sitio activo. El O_2^- reacciona rápidamente con la aconitasa_m ($k \approx 1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), llevando a la liberación del Fe lábil del centro Fe-S, con pérdida de actividad. Modelos celulares y animales revelaron que la aconitasa_m es también inactivada por NO . En modelos animales de sepsis y diabetes se detectó nitración en la aconitasa_m. Este trabajo muestra que preparaciones altamente puras de aconitasa_m recombinante de corazón de chanco, se inactivan rápidamente por ONOO^- ($\text{IC}_{50} \approx 15 \text{ } \mu\text{M}$ ONOO^- para $3.2 \text{ } \mu\text{M}$ aconitasa). La presencia de CO_2 favorece la inactivación (30% y 12% de actividad remanente para $1.6 \text{ } \mu\text{M}$ aconitasa, $5 \text{ } \mu\text{M}$ ONOO^- , respectivamente), indicando que el anión nitrosoperoxocarboxilato y/o los radicales derivados (CO_3^- y NO_2) reaccionan rápidamente con la enzima. La pérdida de actividad por ONOO^- implica la liberación del Fe lábil, ya que la misma puede revertirse totalmente por la incubación con Fe^{2+} y un agente reductor en condiciones anaeróbicas, y que los sustratos protegen a la enzima de la inactivación. El ONOO^- es también capaz de nitrar la enzima, tal como se detectó por western blot anti-nitrotirosina; la nitración de la enzima por $1\text{-}30 \text{ } \mu\text{M}$ de ONOO^- no impidió su reactivación.

CELENERAZINA COMO UN INDICADOR DE LA FORMACIÓN DE SUPERÓXIDO Y PEROXINITRITO, EN SISTEMAS QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS.

Valez V.¹, Cassina, A.M.¹, Quijano, C.¹, Tarpey M.², Freeman, B.² y Radi, R.¹

¹Departamento de Bioquímica y Centro de Investigaciones Biomédicas en Radicales Libres, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

²University of Alabama at Birmingham, Birmingham, USA.

El desarrollo de nuevas sondas quimioluminiscentes, es una gran herramienta para la detección de radicales libres dada su corta vida media. En este estudio evaluamos la eficacia de la celenterazina como sonda para la detección de anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y peroxinitrito ($ONOO^-$) en sistemas químicos y enzimáticos, como también en mitocondrias y células. Estudios iniciales en partículas submitocondriales (SMP), y en sistemas celulares (BAECs) mostraron que su incubación con la sonda resultaba en un salto (overshoot) en la emisión de luz de la celenterazina y esto era compatible con la formación de $ONOO^-$. Estos experimentos mostraron que en principio, la celenterazina podía utilizarse como sonda para detectar $O_2^{\cdot-}$ y $ONOO^-$, pero estudios espectrofotométricos de la oxidación de celenterazina por $ONOO^-$, indicaron que esta sonda podía reaccionar con los productos de descomposición del $ONOO^-$.

De hecho, análisis de cinética rápida (stopped flow), mostraron que la celenterazina y el $ONOO^-$, no tienen una reactividad directa. El objetivo de este trabajo es delucidar que especies estarían involucradas en la oxidación de la celenterazina en estos sistemas, el mecanismo de oxidación y determinar si ésta oxidación sigue una ruta quimioluminiscente o una ruta oscura.

SESIÓN DE POSTERS 3:

Mutagénesis y Reparación del ADN, Onco-farmacología,
Biotecnología, Marcadores genéticos y bioquímicos y Química
teórica

ANÁLISIS DE LAS FUNCIONES DE LAS PROTEÍNAS DE CONTROL DEL CICLO CELULAR RAD17 Y CHK1 DE *S. CEREVISIAE* EN LA REPARACIÓN DE ROTURAS DE DOBLE CADENA DEL ADN INDUCIDAS POR BLEOMICINA EN CÉLULAS EN DISTINTAS FASES

Candreva, E.¹, Keszenman, D.¹, Bracesco, N.¹, Soria, S.¹, Sanchez, A.¹, Dell, M.¹, Siede, W.², Nunes, E.¹

¹Dpto. de Biofísica, Facultades de Medicina y Ciencias, UDELAR

²Dept. of Cell Biology and Genetics, University of North Texas Health Science Center, Fort Worth, Texas, USA

Los puntos de control del ciclo celular responden a lesiones en el ADN y las proteínas involucradas actúan en red en funciones de reparación, que incluyen regulación transcripcional y fosforilación. Se analizaron cepas mutantes diploides *chk1Δ/chk1Δ* y *rad17Δ/rad17Δ* y la correspondiente salvaje isogénica, en fases exponencial y estacionaria. Muestras celulares se expusieron a bleomicina (0.5-3 μg/ml, 1.5h, 30° C) o a radiación gamma (0-1000 Gy). El ADN se aisló en bloques de agarosa y la separación cromosómica se realizó por electroforesis con campos pulsados. Las muestras se procesaron inmediatamente después del tratamiento y luego de incubación en YPD o PBS a 30°C. En las cepas salvaje y *chk1* se observó fraccionamiento del ADN y reparación de las dobles roturas de ADN, luego del tratamiento e incubación en YPD o PBS, en correlación con un aumento de la sobrevivencia. Por el contrario, *rad17Δ* fue deficiente en la reparación, observándose degradación cromosómica dependiente de las dosis, luego de irradiación o tratamiento con bleomicina. La capacidad de reparación de *chk1* podría explicarse por la regulación redundante de la transición metafase-anafase. El posible sensor dependiente de Rad17 es esencial para múltiples funciones de control del ciclo. La deficiencia en la reparación en *rad17Δ* en fases exponencial y estacionaria indica una acción directa de Rad17p en la reparación de roturas dobles, independiente del retardo en el ciclo celular. Para definir esta función en forma más precisa e identificar componentes inducibles se bloqueó la síntesis proteica con cicloheximida. Se constataron componentes inducibles y constitutivos.

Se agradece a NIH/Fogarty (International Research Collaboration Award TW01189), a Lourdes Blanc y a PEDECIBA.

CHALCONAS COMO INDUCTORAS DE ENZIMAS DETOXIFICANTES DE FASE II

Cabrera, M.¹, Cerecetto, H.¹, Falchi, G.¹, González, M.¹, Sagrega, G.¹, Simoens, M.¹,
Fernández, M.^{1,3}, Celano, L.², Thomson, L.²

¹ Dpto. Química Orgánica, Facultad de Ciencias-Facultad de Química;

² Lab. Enzimología, Facultad de Ciencias, UdelaR;

³ Unidad de Bioterio y Lab. Experimentación Animal, IIBCE. Iguá 4225 Montevideo 11400.

La quimioprevención del cáncer involucra la prevención, retraso, o reversión de los procesos de carcinogénesis a través de la ingesta de alimentos o agentes farmacéuticos. Uno de los principales mecanismos de protección contra la carcinogénesis es la inducción de enzimas involucradas en el metabolismo de carcinógenos, particularmente enzimas detoxificantes de fase II como glutatión *S*-transferasa (GST) y quinona reductasa (QR). Estudios en animales indican que la inducción de enzimas de fase II es condición suficiente para obtener quimioprevención y puede ser lograda por la administración de diversos productos naturales y sintéticos. En nuestra búsqueda de nuevos agentes quimiopreventivos se desarrollaron chalconas, flavonas y flavononas que poseen diferentes sustituyentes en posición 2,3,4 ó 2',4' o ambas cubriendo un amplio rango de propiedades fisicoquímicas, haciendo posible futuros estudios de correlación estructura-actividad. En este trabajo se estudió la inducción de GST y QR hepáticas en ratas *Sprague Dawley* por administración diaria, vía intragástrica, de 3.0 ó 4.5 mg/200g de producto durante tres semanas. Se encontró una correlación entre los compuestos fuertemente inductores de QR y GST con aquellos que presentaban mayor actividad antitumoral en estudios previos de este grupo. Por consiguiente, estos compuestos parecen ser buenos agentes quimiopreventivos.

APROXIMACIÓN AL MECANISMO DE ACCIÓN DE PROFÁRMACOS ANTITUMORALES DERIVADOS DE *N,N'*-DIÓXIDO DE FENAZINA: ESTUDIO DE AFINIDAD CON ADN

Cerecetto, H.^a, González, M.^a, Lavaggi, M.L.^a, Azqueta, A.^b, López de Ceráin, A.^b, Monge, A.^b y Bruno, A.M.^c

^a Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química-Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

^b Centro de Investigaciones en Farmacobiología Aplicada, Universidad de Navarra, Pamplona, España

^c Departamento de Química Orgánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

Una serie de profármacos antitumorales, selectivos para hipoxia, derivados de 2(3)-amino y 2(3)-hidroxi-5,10-dióxido de fenazina 7(8)-sustituidos fueron desarrollados y evaluados frente a células V79. Los profármacos combinan dos tipos de farmacóforos: por un lado, un sistema biorreducible –la función *N*-óxido- y por otro lado una estructura plana –el sistema fenazina- que interaccione con el ADN. La interacción electrostática entre el *N*-óxido y los fosfatos de ADN es repulsiva, mientras que en su forma reducida es atractiva (*Figura 1*).

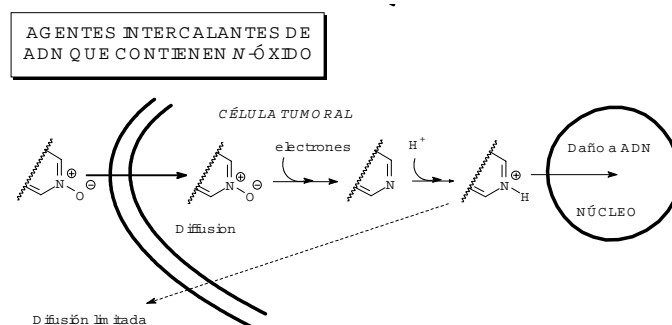


Figura 1- Mecanismo propuesto para agentes intercalantes de ADN en hipoxia

Para conocer el mecanismo de acción de los compuestos se estudia, en primera instancia, el grado de interacción con ADN. Así, se determina mediante espectroscopia de absorción UV el grado de afinidad de los profármacos y sus derivados reducidos. Los resultados muestran en general una baja afinidad de los profármacos y un grado de afinidad medio de algunos de los derivados reducidos. Ciertos derivados mostraron una particular modificación del espectro UV atribuible a la interacción de los orbitales π del ligando con los de las bases del ADN (*Figura 2*).

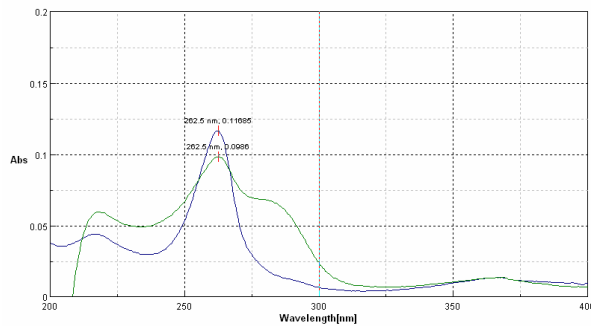


Figura 2-Espectro UV de un derivado de 2(3)-hidroxifenazina.

Agradecimientos: AMSUD-PASTEUR

ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS PRETEÑIDOS EN GELES DE AGAR-AGAR/BORATO: UN PROTOCOLO SIMPLIFICADO.

Britos, L.*[‡], Goyenola, G.[‡] y Umpiérrez-Oroño, S.[‡]

Grupo de Capacitación, Área Ciencias de la Naturaleza

[‡] Centro Regional de Profesores del Sur (Atlántida) y * del Centro (Florida)

Se presenta un método simple y económico de extracción de ADN y análisis electroforético desarrollado con fines educativos. En base a protocolos clásicos empleados en los laboratorios de investigación, se han hecho las modificaciones necesarias para prescindir de reactivos y equipamientos costosos o que impliquen riesgos injustificados (acrilamida: bisacrilamida, agarosa, TBE, TAE, bromuro de etidio, transiluminador UV). De este modo, la actividad puede ser realizada en el marco de educación media y formación docente. La propuesta hace énfasis además en la posibilidad de un abordaje interdisciplinario entre las asignaturas de biología, física y química. Se propone además un diseño pedagógico que integra dicha actividad experimental con otras estrategias, para introducir y discutir los aspectos metodológicos del Proyecto Genoma Humano. Por último, el protocolo experimental puede ser utilizado total o parcialmente en el contexto educativo universitario.

DESARROLLO LOCAL DE UNA VACUNA CONTRA *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* : INMUNOGENICIDAD INDUCIDA POR *S. PNEUMONIAE* INACTIVADO ADMINISTRADO POR VÍA INTRANASAL.

Estévez, V., Rial, A., Chabalgoity, A.

Laboratorio de Investigación en Vacunas, Departamento de Desarrollo Biotecnológico, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, UdelaR.

Streptococcus pneumoniae es el primer agente causal de neumonía en todo el mundo y la emergencia de cepas resistentes a la penicilina y otros beta-láctámicos enfatiza la importancia de su prevención usando vacunas. Las vacunas existentes presentan problemas de falta de inmunogenicidad en poblaciones de riesgo, ó costos excesivos imposible de ser adsorbidos por nuestros sistemas de salud. Existen estudios que sugieren que sería más efectiva la estimulación directa de la respuesta inmune pulmonar utilizando la ruta intranasal, dado que allí se encuentran los tejidos linfoides asociados a nasofaringe, bronquios y laringe. Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio sugieren que la formulación coloidal de antígenos bacterianos es efectiva en la generación de inmunidad específica a nivel de las vías respiratorias y sistémico. En este trabajo se evaluó la respuesta inmune inducida por una cepa rugosa de *S. pneumoniae* inactivada por calor, y por la misma cepa inactivada formulada como coloide, en un modelo murino de administración intranasal. Se demostró que la administración intranasal de ambas formulaciones es capaz de inducir anticuerpos séricos específicos contra lisado de neumococo, del tipo IgG luego de dos dosis administradas a intervalos de una semana, y del tipo IgA luego de tres dosis. También se observaron anticuerpos IgG e IgA, en suero, específicos contra la proteína neumolisina, uno de los factores de virulencia más importantes del neumococo. Por otro lado, se observó la producción local de anticuerpos IgA específicos contra lisado de neumococo y contra neumolisina, en lavados broncoalveolares realizados ocho semanas luego de la quinta dosis. En ningún caso se observó respuesta de IgA específica en heces. Estos resultados confirman que la ruta intranasal induce fuertes respuestas de anticuerpos específicos, tanto a nivel sistémico como local en las vías respiratorias. Los datos sugieren además que el uso de bacterias inactivadas formuladas como coloide y administradas por esta vía, puede representar una alternativa costo-efectiva para el desarrollo de una vacuna local contra *S. pneumoniae*.

DETECCIÓN DE OGM'S (ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS) EN MAÍZ Y HARINA DE MAÍZ

Furest, L., Pereira, C., Marín, M. y Martínez, C.

Sección Bioquímica. Piso 3 Ala Norte, Facultad de Ciencias, UdelaR, Uruguay.

El creciente desarrollo de tecnologías que permiten la modificación genética de ciertos organismos para conferir características que no poseerían en su contexto nativo ha llevado a la producción de alimentos derivados de Organismos Genéticamente Modificados (OGM's). Esta explosión tecnológica y científica se ha visto acompañada por un creciente interés de la población en general en materia de inocuidad alimentaria. Los consumidores exigen el acceso a la información acerca de los alimentos que consumen. Existe entonces la impostergable necesidad de desarrollar y poner a punto las metodologías que permitan la detección de OGM's, no solamente para ajustarlos a los marcos regulatorios vigentes, sino también para comenzar a comprender el efecto de éstos en la alimentación y salud humana.- El objetivo principal de este trabajo es la puesta a punto de métodos moleculares para detectar de manera sencilla, reproducible, económica y eficiente la presencia de OGM's en alimentos. En este trabajo se muestran los resultados obtenidos en la detección directa en maíz y productos derivados. La estrategia experimental se basa en detectar el promotor 35S del Virus Mosaico de la Coliflor (*35S CaMV promoter*) utilizado en la mayoría de las construcciones genéticas en plantas, mediante la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

ESTRATEGIA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS UBIQUITINADAS

Palacios, F.*, Miraballes, I., Battistoni, J., Greif, G.* , Señorale, M.* , Marin, M. *

*Sección Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias; †Laboratorio de inmunotecnología, Cátedra de Inmunología, Facultad de Ciencias-Facultad de Química.

La ubiquitinación es el proceso por el cual determinadas proteínas de células eucariotas son marcadas por unión covalente a moléculas de ubiquitina para su degradación específica por la vía del proteosoma. La ubiquitinación cumple funciones biológicas esenciales controlando procesos tales como la regulación del ciclo celular, el crecimiento y proliferación celular, la inducción de la respuesta inflamatoria y la presentación de antígenos asociada a moléculas del MHCI. En relación al plegamiento *in vivo* de proteínas, la ubiquitinación cumple un rol esencial asegurando que proteínas mal plegadas sean rápidamente degradadas. En este contexto nuestro interés es identificar proteínas ubiquitinadas en diferentes condiciones fisiológicas y estudiar las variaciones del perfil global de estas proteínas. Concretamente el objetivo de este trabajo fue producir anticuerpos anti-ubiquitinas que permitan, a partir de mezclas complejas, identificar y purificar proteínas ubiquitinadas. Los anticuerpos se obtuvieron inmunizando un conejo con ubiquitina bovina conjugada a seroalbúmina. A partir del suero obtenido, los anticuerpos fueron purificados por cromatografía de afinidad, utilizando una columna de ubiquitina unida a sepharosa. La especificidad de los anticuerpos se analizó por Western Blot. Con el propósito de aislar proteínas ubiquitinadas a partir de extractos celulares, se preparó una columna de afinidad, inmovilizando los anticuerpos mencionados a CNBr sepharosa. Se ensayó la purificación de proteínas ubiquitinadas con este sistema, utilizando un extracto proteico de *Trypanosoma cruzi*. Las proteínas eluidas de la cromatografía está siendo analizada por espectrometría de masa para determinar la eficiencia de este sistema para la purificación de proteínas ubiquitinadas.

HERRAMIENTAS PROTEÓMICAS PARA EL ESTUDIO DE DIVERSIDAD ENTRE CEPAS DE SALMONELLA ASOCIADAS A ENFERMEDAD TRANSMITIDA POR ALIMENTOS

Rodríguez, M.A. ¹, Betancor, L. ^{1,2}, Pereira, M. ^{1,2}, Chabalgoity, J.A. ¹

¹Dept. Desarrollo Biotecnológico

²Dept. Bacteriología y Virología, Facultad de Medicina, Universidad de la República del Uruguay.

Salmonella es el agente mas frecuente de enfermedad transmitida por alimentos en nuestro pais, siendo el serovar Enteritidis el que predomina en los aislamientos reportados. Nuestro grupo ha demostrado que las cepas involucradas en enfermedad humana poseen factores de patogenicidad ausentes en cepas aisladas de alimentos. Para avanzar en la comprensión de los factores implicados en la patogénesis de *Salmonella*, este trabajo apunta al diseño y optimización de herramientas proteómicas utilizadas para comparar cepas. Una forma de estudiar proteomas bacterianos es el análisis por espectrometría de masa de bacterias intactas. Estos espectros de las células enteras reflejan las proteínas de la bacteria, y en particular la fracción de las mismas que es soluble en ácido y que tiene un peso molecular bajo. Sin embargo, generalmente la información de los espectros de bacterias enteras no es suficiente para definir biomarcadores que reflejen la heterogeneidad genética dentro de un mismo serotipo. Para detectar posibles biomarcadores de patogenicidad en cepas de *Salmonella* Enteritidis, nuestra estrategia se basa en comparar los espectros de extractos crudos de proteínas conteniendo subconjuntos del proteoma. Los resultados indican que estos patrones de expresión proteica reflejan diferencias en cepas con patrones genéticos únicos (no presentes en cepas humanas) y con resistencia a antibióticos betalactámicos.

IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO DE CONJUGACIÓN Y PURIFICACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE GLICOCONJUGADOS

Suarez, N., Franco- Fraguas, L., Massaldí, H., Ferreira, F.

Laboratorio de Carbohidratos y Glicoconjugados, Departamento de Desarrollo Biotecnológico/DQO. Facultades de Medicina / Química. Instituto de Higiene, C.P 11600, Montevideo, Uruguay. Cátedra de Bioquímica, Facultad de Química, Montevideo, Uruguay

Las vacunas a polisacárido disponibles contra *S. pneumoniae* son inefectivas en algunos grupos etáricos; sin embargo, sus conjugados con proteínas adecuadas dan origen a antígenos T-dependientes, capaces de generar inmunidad protectora a toda la población. Un método clásico de conjugación de polisacáridos a proteínas es la introducción de grupos isocianato por acción del bromuro de cianógeno. Sin embargo, ésta reacción presenta serios inconvenientes para su aplicación generalizada. Un método de conjugación alternativo consiste en el empleo de Tetrafluorborato de 1-ciano-4-(dimetilamino)-piridinio (CDAP) en sustitución del bromuro de cianógeno. El presente trabajo describe una metodología optimizada de conjugación del polisacárido capsular de *S. pneumoniae* serotipo 14 (PS14) a albúmina de suero bovino (BSA) y la purificación del producto por columnas hidrofóbicas de Sephadex LH-20. La purificación de los antígenos conjugados por éste sistema permite la obtención en un paso del producto puro, libre de PS14 no conjugado lo que tiene una incidencia directa en la actividad inmunológica del producto. La pureza de los productos obtenidos fue controlada por determinación de proteínas, carbohidratos, SDS-page e inmunoelectroforénesis y empleados para la inmunización de ratones, demostrándose estadísticamente la generación de altos títulos de IgG y una respuesta T-dependiente.

DIAGNÓSTICO DE ESPECIES DE ZORROS MEDIANTE MÉTODOS NO INVASIVOS

Cosse, M.¹, Cabrera, M.J.¹, Maldonado, J.E.² & González, S.¹

¹ División Citogenética-IIBCE -UA Facultad de Ciencias Av. Italia 3318 11600 Montevideo-Uruguay
mcosse@iibce.edu.uy

² Genetics Program, NMNH, Smithsonian Institution. 3001 Connecticut Ave. NW., Washington, DC 20008 USA

Para establecer la importancia de ciertas áreas para la conservación de la fauna silvestre es necesario desarrollar técnicas rápidas y efectivas que permitan determinar la presencia de especies de interés. El objetivo de este trabajo fue evaluar la presencia de dos especies de zorro que se encuentran distribuidas en el Uruguay, con técnicas no invasivas (zorro de monte *Cerdocyon thous* y zorro de campo *Pseudalopex gymnocercus*). Para ello hemos establecido un sistema de determinación taxonómica molecular a partir de la extracción de ADN de fecas basado en PCR-RFLP. Para este fin se diseñaron cebadores, analizando el banco de secuencias de nuestro laboratorio, que amplifican un pequeño fragmento (232pb) de la región de control de ADNmt. Este fragmento tiene la característica de tener un sitio de corte para la enzima de restricción Spe I presente sólo en *Cerdocyon thous*. La técnica consiste en: 1) extracción de ADN de fecas; 2) amplificación del fragmento de ADNmt por PCR; 3) digestión del producto amplificado con la enzima Spe I; y 4) electroforesis en un gel de agarosa al 3% con la cual se determina la especie en función del patrón de bandas observado: una banda de 232 pb corresponde a *Pseudalopex gymnocercus* y dos bandas de 68 y 164 pb a *Cerdocyon thous*.

Financiado: Neotropical Fund Cleveland Metro Parks

PREVALENCIA DE POLIMORFISMOS FARMACOGENÉTICOS DEL CITOCROMO P450 (CYP) 2C9 EN LA POBLACIÓN MONTEVIDEANA.

Echarte, L.; Greif, G.; Sanguinetti, C.; Tucci, P.

Facultad de Ciencias, Dpto. Bioquímica y Biología Molecular, Montevideo, Uruguay.

El citocromo P450(CYP) 2c9 es una monooxigenasa que hidroxila alrededor del 16% de las drogas de uso corriente. Metaboliza xenobióticos, incluidos la S- Warfarina, tolobutamida y fenitoína, los cuales si hay una falla metabólica en la actividad de CYP2C9 puede causar dificultades en el ajuste de la dosis así como toxicidad. Se han identificados polimorfismos de cambio de un nucleótido en el gen de CYP2C9 que determinan fenotipos metabólicos sustentando las diferencias interindividuales y étnicas observadas. Entre las poblaciones caucásicas solo las variantes CYP2C9*2 y CYP2C9*3 son significativas y como la población montevideana actual desciende principalmente de europeos decidimos investigar la prevalencia de estos polimorfismos en una muestra representativa de esta ciudad. Para ello utilizando el banco de ADN creado por el Depto. de Citogenética, IIBCE se realizó la genotipificación de 105 individuos por PCR-RFLP empleando el Kit CYP2C9 duplex (ATGen). Las frecuencias alélicas obtenidas de CYP2C9*2 y CYP2C9*3 fueron de 0.10 y 0.07 respectivamente, similares a los valores hallados en poblaciones caucásicas. Este estudio muestra que la presencia de los polimorfismos analizados es significativa en Montevideo, por lo que sería conveniente caracterizar genotípicamente a aquellos pacientes a los que se les prescribirán alguna de las drogas metabolizadas por CYP2C9 ya que podían ser un riesgo por provocar reacciones adversas/toxicidad cuando los pacientes son portadores de tales polimorfismos.

LA MUTACIÓN C677T DEL GEN MTHFR ES MÁS FRECUENTE EN INDIVIDUOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2 QUE EN LA POBLACIÓN GENERAL

Gascue, C.¹, Mimbacas, A.^{1,2}, Soto, E.³, Javier, G.⁴, Vitarella, G.⁴, Ferrero, R.⁵, Sanguinetti, C.⁶, Cardoso, H.¹

¹Dpto. Citogenética, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Mdeo, Uruguay

²Dpto. Citogenética, Unidad Asociada, Inst. de Biología, Fac. de Ciencias, Mdeo, Uruguay

³Cardiología, Centro de Asistencia del Sindicato Médico de Uruguay (CASMU)

⁴Unidad de Diabetes, CASMU

⁵Medicina General, CASMU

⁶ATGen, Montevideo, Uruguay

El riesgo cardiovascular se encuentra aumentado en personas con Diabetes Mellitus tipo 2 (DMT2) debido a factores de riesgo no totalmente conocidos. La hiperhomocisteinemia ha surgido como un nuevo riesgo para las complicaciones de estos pacientes. La enzima MTHFR juega un papel importante en el metabolismo de la homocisteína; deficiencias en su actividad se asocian con hiperhomocisteinemia. Existe una variante de esta enzima (mutación C677T) cuya actividad es reducida. Debido a que los pacientes con esta mutación poseen predisposición a desarrollar hiperhomocisteinemia, se ha sugerido como un riesgo genético para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Objetivo: Realización de un estudio sobre la posible relación de la mutación C677T del gen MTHFR con la DMT2. Materiales y Métodos: Se analizaron genéticamente 41 individuos con diagnóstico de DMT2 que se atienden en el Centro de Asistencia del SMU (CASMU), Montevideo. Se realizó la técnica de PCR-RFLPs para la detección del genotipo de cada individuo. Se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas, y éstas fueron comparadas con las esperadas con respecto a la población general de Montevideo. Resultados: Las frecuencias genotípicas y alélicas encontradas en los pacientes fueron significativamente diferentes a las esperadas si hubiese homogeneidad con la población general. La frecuencia del alelo T y del genotipo TT es mayor ($p < 0.05$ y $p < 0.01$) en el grupo de DMT2. Conclusiones: La mutación C677T es más frecuente en diabéticos. Esta podría estar actuando como un factor más para la alta incidencia de patología cardiovascular que se observa en la DMT2 de nuestra población.

ACTIVIDAD COLINEASTERASA CEREBRAL EN PECES COMO BIOMARCADOR DE EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS

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

¹ 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.

² Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo

La inhibición de la actividad colinesterásica normalmente presente en el sistema nervioso central de los organismos acuáticos es internacionalmente considerada un biomarcador útil de la exposición a plaguicidas organofosforados (OP), compuestos utilizados de forma intensiva en fruticultura, y que pueden determinar graves intoxicaciones agudas y crónicas en prácticamente todos los seres vivos. Sin embargo, en nuestro país no existe un rango aceptado de normalidad de los niveles colinesterásicos en peces autóctonos. A fin de evaluar la contaminación con OP presentes en la Cañada del Dragón (Melilla) se determinó la actividad colinesterasa en homogenatos de cerebro por el método espectrofotométrico de Karlsson *et al.* (1984) a 324 nm. Este método tiene como ventaja sobre el de Ellman *et al.* (1961) que la hemoglobina sanguínea no interfiere con la medida enzimática. En ejemplares de *Bryconamericus iheringi* colectados en estaciones de muestreo (EM) 2 y 3, y de *Astyanax fasciatus* de EM3 de Cañada del Dragón, la actividad fue mayor en diciembre que en setiembre, aunque en EM3 esa diferencia no es significativa. En ambos muestreos se detectó una disminución significativa (Student's test; $p=0,00063$) en la actividad enzimática en *Bryconamericus iheringi* de EM3 respecto a EM2. Los datos parecen indicar que existe contaminación por OP en dicho recurso hídrico, y que la misma responde a una contaminación de tipo crónica. En bioensayos de laboratorio se observó que los *A. fasciatus* expuestos a 0.01 mg/l de azinfos-metil, el OP más usado en la cuenca, necesitan un período mayor a 10 días para recuperar la actividad colinesterasa original.

ESTUDIO DE LAS BASES MOLECULARES DE LA HIPOALFALIPOPROTEINEMIA

Vital, M.², Esperón, P.^{1,2}. y Stoll, G.M.¹

1- Comisión Honoraria para la Salud Cardiovascular. Laboratorio de Genética Molecular.

2- Cátedra de Biología Molecular, Facultad de Química. Montevideo.

El bajo HDL es uno de los factores de riesgo aterogénico mejor conocidos y forma parte de las dislipemias más comunes generadoras de enfermedades cardiovasculares en la población occidental. En este trabajo se aborda el estudio de las bases genéticas de las hipoalfalipoproteinemias con alto factor de riesgo para la enfermedad coronaria .

La Apo A1 es la apolipoproteína más importante del HDL constituyendo el 70 % de su masa proteica. El locus es uno de los candidatos más importantes para estudiar la variabilidad genética de los niveles de HDL. Una causa más rara, de deficiencia de HDL se debe a mutaciones en el transportador ATP Binding Casette 1 (ABCA1). Ambas moléculas parecen tener un papel clave en el transporte reverso del colesterol, desde las células periféricas hacia el hígado y otros tejidos. En la población estudiada (pacientes de la policlínica de Genética Cardiovascular del Hospital de Clínicas) se seleccionaron 25 pacientes con hipoalfalipoproteinemia o colesterol HDL bajo con concentraciones menores de a 35 mg/dL y se determinó la secuencia de exones seleccionados en ambos genes candidatos. Se reporta una mutación consistente en un cambio G2007C en el exón 4 de la ApoA1 lo que implica un cambio del codón 143 Arg->Pro que segrega con un muy bajo LDL y en una familia con aterosclerosis coronaria prematura. Corresponde a una mutación en un sitio altamente conservado de la secuencia de ApoA1. La mutación puntual encontrada no ha sido descrita anteriormente, y resulta un fuerte candidato como causante de una hipoalfalipoproteinemia familiar con características de transmisión dominante.

EFFECTOS DEL ENTORNO SOBRE LA BARRERA Y REORGANIZACIÓN ELECTRÓNICA EN LA MIGRACIÓN 1,2-NH₃ DEL SUSTRATO DEL SISTEMA ETANOLAMINA-AMONIOLIASA/B₁₂

Machado, M. y Coitiño, E. L.

Laboratorio de Química Teórica y Computacional, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, UdelaR. Iguá 4225, esq. Mataojo, Montevideo 11400, URUGUAY

La etanolamina-amonioliasa (EAL) es un enzima bacteriano que cataliza la transformación de 2-aminoetanol en acetaldehído y amoníaco en presencia de un corrinóide, la co-enzima B₁₂. En la primer etapa el co-factor rompe un enlace Co-C generando un radical capaz de abstraer H del 2-aminoetanol, para formar un radical 2-aminoetanolil que experimenta una migración 1,2 del grupo amino a través de un mecanismo aún no completamente definido, del cual se sabe que la velocidad de la etapa limitante corresponde a una barrera de activación de ~15 kcal/mol en condiciones fisiológicas. Estudios *in vacuo* realizados por Schwarz [1] y Radom [2] aportan evidencia inicial a favor de un mecanismo compatible con tal barrera, en el que residuos enzimáticos del enzima facilitarían el proceso mediante protonación parcial del grupo NH₂ concertada con deprotonación parcial del grupo OH (proceso *push-pull*). No obstante la polaridad del medio en el que transcurre el proceso puede tener un efecto significativo sobre su barrera y cinética, desconociéndose aún la estructura 3D del enzima y su sitio activo, la misma no ha sido considerada en los modelos empleados.

En este trabajo se realiza el primer análisis B3LYP/6-31G(d) con modelos continuos de polaridad variada ($\epsilon = 1.92, 4.90, 10.36, 20.70, 24.55, 32.63$ y 78.39) examinando el efecto del entorno sobre la estructura electrónica de las especies involucradas (densidades de spin, cargas atómicas y orbitales localizados), energética y cinética de la migración 1,2 bajo dos escenarios: a) protonación total del NH₂ migrante [1a]; y b) protonación-deprotonación parcial asistida por imidazol y acetato [2,1b]. Los resultados obtenidos muestran que la barrera aumenta con la polaridad del medio, diferenciándose dos zonas donde la sensibilidad al cambio es marcadamente diferente. Las constantes de velocidad TST y su dependencia con la temperatura fueron calculadas con el programa POLYRATE.

[1] a) Semialjac, M.; Schwarz, H. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 8974-8983; b) *ibíd*, *J. Org. Chem.* 2003, 68, 6967-6983.

[2] Wetmore, S. D.; Smith, D. M.; Bennett, J. T.; Radom, L. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 14054-14065

INDICE DE AUTORES

A

Abecia, A.	79	Bianchimano, P.	77
Abudara, V.	82, 83	Bentancor, M.	54, 60
Acosta, D.	64	Betancor, L.	63, 98
Acuña, S.	76	Boiani, M	65
Almada, R.	81	Boiani, L	65
Arán, V.J.	68	Borsani, O.	55, 58
Arocena, M.	80	Bracesco, N.	90
Arrarte, G.	61	Braida, C.	81
Arruti, C.	80	Brauer, M.M.	77
Ayala, J.	63	Britos, L	94
Azqueta, A.	92	Bruno, A.M.	92

B

Bado, I.	63
Baraibar, M.	84
Barbeito, L.	84
Bartesaghi, S.	85
Batthyány, C.	85
Batista, S.	62
Battistoni, J.	84, 97
Berriel, V.	55, 61

C

Cancela, M.	64, 67
Canclini, L	66
Candрева, E.	90
Cappetta, M.	67
Carballo, V.	54, 56
Carbó, N.	62
Cabrera, M.	91, 100

Cardoso, H.	102	Duhagon, M. A.	73, 74
Carmona, C.	64	Díaz A.	67
Cassina, A.M.	83, 88		
Cassina, P.	83	E	
Castro, A.	57	Echarte, L.	101
Castro, L.	87	Eguren, G.	103
Celano, L.	91	Ehrlich, R.	66, 84
Cerecetto, H	65, 68, 91, 92	Esperón, P.	104
Chabalgoity, A.	95	Esteves, A.	66
Chabalgoity, J.A.	98	Estévez, V.	95
Chalar, C	70, 72		
Ciganda, M.	74	F	
Coitiño, E. L.	105	Fabiano, E.	62
Condon B.	67	Falchi, G.	91
Cordeiro, N. F.	63	Fernández A.	61
Cosse, M.	100	Fernández Alvarez, A.	82
Cota, G.	84	Fernández, C.	70
		Fernández, M.	91
D		Fernández, V.	70, 72
Dalton J.P	67	Ferrari, M.I.	71
Dallagiovanna, B.	73, 74	Ferreira, A.M.	71
Dell, M.	90	Ferreira, F.	99
Denicola, A.	71, 85	Ferrero, R.	102
Díaz, P.	58	Forcada, F.	79

Forsberg, M.	79
Fraga, R.	72
Franco- Fraguas, L.	99
Freeman, B.	88
Furest, L.	96

G

Gaggero, C.	57
Gallino, J. P.	59
Garat, B.	73, 74
García, A.V.	57, 60, 63
Garófalo, E.	76, 78
Garré, J.	83
Gascue, C.	102
Gerpe, A.	68
Gill, P. R.	62
Gómez, L.	82
Gonnet S.	61
González, C.	62
González, M	62, 65, 68, 91, 92
González, S.	100
Goyenola, G.	94
Greif, G.	97, 101
Gutierrez, M.	65

H

Hamberg, M.	57
Harispe, L.	72
Hernández, P.	65
Horjales, S.	84

I

Ibarguren S.	67
Irisarri P.	61

J

Javier, G.	102
------------	-----

K

Karayekov, E.,	60
Keszenman, D.	90

L

Lavaggi, M.L.	92
López de Ceráin, A.	92

M

Machado, M.	105
-------------	-----

Maldonado, J.E.	100
Manta, B.	85
Marín, M.	84, 96, 97
Martínez, C.	96
Maruri, A.	103
Massaldi, H.	99
Maya, J.D.	65, 68
Meikle, A.	79
Merlino, A.	65
Mimbacas, A.	102
Miraballes, I.	97
Monge, A.	92
Monza, J.	55
Morello, A.	65
Morillo, A.	68

N

Nunes, E.	90
-----------	----

O

Ochoa de Ocariz, C.	68
Olea-Azar,	65, 68
Oliver, J.P.	54, 57

P

Pagliano, G.	59
Palacios, F.	97
Paulino G.	61
Pascovich, L.	72
Pereira, C.	96
Pereira, M.	98
Pérez, L.	73, 74
Pistone, G.	103
Platero, R.	62
Ponce de León, I.	54, 57, 60
Porcal, W.	65
Puime P.	78

Q

Quijano, C.	88
-------------	----

R

Radi, R.	87, 88
Raggio, V.	81
Retamal, M.	83
Rial, A.	95
Richeri, A.	77

Rinaldi, G. 64
Robello, C. 73
Roche, L. 64, 67
Rodríguez, M.A. 98
Rodríguez, M. M. 81
Rodríguez-Ithurralde, D. 103
Rodríguez-Piñón, M. 76, 78
Romero, N. 85
Rosconi, F. 62

S

Sáez, J. 83
Sagrada, G. 91
Salinas G. 67
Sanchez, A. 90
Sanguinetti, C. 101, 102
Schelotto, F. 63
Señorale, M. 84, 97
Siede, W. 90
Simoens, M. 91
Soria, S. 90
Sosa, C. 79
Sotelo Silveira, J. 84

Soto, E. 102
Souza, E. M. 62
Smircich, P. 81, 74
Stoll, G.M. 104
Suarez, N. 99

T

Tasende, C. 76, 78
Tarlera S. 61
Tarpey M. 88
Thomson, L. 91
Tort, J. 64
Tórtora, V. 87
Travers, D. 61
Tucci, P. 101

U

Umpiérrez-Oroño, S. 94

V

Valares, J.A. 79

Valez V.	88
Vidal, S.	54, 56, 59, 60
Vignoli R.	63
Viñoles, C.	79
Vital, M.	104
Vitarella, G.	102

W

Welin, B.	56, 59
Williams, N.	73, 74

Z

Zaha, A.	70
Zhang, H.	85