

# **V Jornadas de Bioquímica y Biología Molecular**

## **RESUMENES CONFERENCIAS Y SIMPOSIOS**

Facultad de Ciencias, 1 y 2 de diciembre de 2006

**Comité Organizador (SBBM):**

C. Carmona, A. Calliari, E. Castillo, S. Batista, P. Esperón, A. Meikle, J. Monza,  
J.M. Souza, J. R. Sotelo

## **CONFERENCIA I. BIOLOGIA DE SISTEMAS**

Luis Acerenza

Laboratorio de Biología de Sistemas, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

Los organismos unicelulares más simples se caracterizan por una alta complejidad, basada principalmente en el intrincado entramado de interacciones de sus componentes, entre sí y con el ambiente. Es por esta razón que la cabal comprensión del fenómeno de la vida, incluyendo las transformaciones metabólicas que lo sustentan, requiere, además de los tradicionales métodos reduccionistas, la realización de estudios en sistemas completos, donde las redes de interacciones relevantes se encuentren intactas.

La Biología de Sistemas tiene como uno de sus principales fines el desarrollo de marcos conceptuales y procedimientos experimentales que permitan el estudio integrado de los procesos celulares. Para esto se han propuesto dos grandes tipos de estrategias: modulares y a escala genómica. Las estrategias modulares elaboran un marco formal donde el sistema se divide, in abstracto, en módulos definidos de acuerdo con las interrogantes que tenemos. Los experimentos se realizan en el sistema intacto, por lo que el análisis y los resultados obtenidos serían válidos para dicho sistema. Las estrategias a escala genómica, en cambio, despliegan toda la complejidad experimental relacionada con un tipo de información (por ejemplo, estequiometría de la red). El análisis se realiza sobre toda la información y los resultados obtenidos serían válidos para el sistema globalmente.

En la presentación, se describirán algunas de las estrategias modulares y a escala genómica más usadas en la Biología de Sistemas. Asimismo, se describirán contribuciones realizadas por nuestro laboratorio, en particular, resultados recientes relacionados con el Análisis Modular del Control Metabólico de sistemas sujetos a grandes cambios.

**CONFERENCIA II.F ROM GENOMICS TO PROTEOMICS IN AZOARCUS SP. STRAIN BH72, A N<sub>2</sub>-FIXING ENDOPHYTIC BACTERIUM.**

Federico Battistoni

*Azoarcus sp.* BH72, a Gram-negative, N<sub>2</sub>-fixing bacterium that belongs to the  $\beta$ -proteobacteria, was isolated from the endorhizosphere of Kallar grass, a pioneer plant on low fertility soils in the Punjab of Pakistan. Strain BH72 can supply nitrogen to the Kallar grass plant (Hurek et al. 2002); moreover it shows also a similar colonization pattern of rice roots in comparison to its original host (Hurek et al., 1994). These features make strain *Azoarcus sp.* BH72 a great model for bacteria-grass interaction studies.

In the present work three main topics, from genomics to functional genomic, were covered. The aim of the first part of this work was the characterization of an *Azoarcus sp.* BH72 bacterial artificial chromosome (BAC) library as well as the building of a physical map of strain BH72 chromosome. Both tools were used for an independent analysis of the genome structure in comparison to a shotgun library with small insert sizes, for contig assembly and gap closure of this shotgun library and for genome comparison analysis. The second main objective was the annotation and analysis of a part of the genome sequence. In particular, genes which belong to the COG categories “Ion Transporters and Metabolism”, and “Carbohydrates Transport and Metabolism”, were studied. This analysis revealed several highlights in the genome sequence, particularly in the iron metabolism, which can be used as a starting point in future studies. Finally, a functional genomic analysis of *Azoarcus sp.* BH72 grown under different conditions of N<sub>2</sub>-fixation was performed, using a differential-display proteomic approach. Proteomic patterns of strain BH72 N<sub>2</sub>-fixing cells, in pure- and co-culture with the endophytic fungus *Acremonium alternatum*, showed strongly significant differences. The identification of the major proteins showed that the nitrogen metabolism was very active in both conditions, as well as the carbon metabolism, which was adapted to the carbon sources available. Several membrane proteins were identified which most probably are involved in bacteria-fungus interaction, as well as in bacterial response to fungus metabolites. The results obtained contribute to a better understanding of the *Azoarcus sp.* BH72 physiology and ecology.

## **SIMPOSIO I. ASPECTOS BIOQUÍMICOS DE LA NEUROPROTECCIÓN**

## **SIMPOSIO II. FISIOLOGÍA Y ECOLOGÍA MICROBIANA**

### **II. 1. EPIDEMIOLOGÍA Y PATOGENICIDAD DE *Paenibacillus larvae* EN URUGUAY**

Karina Antúnez

Lab. Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.  
karina@iibce.edu.uy

*Paenibacillus larvae* es el agente causal de la Loque Americana, una severa enfermedad que afecta a las abejas melíferas. El primer aislamiento en Uruguay fue en el 2000, a partir de abejas de Colonia y Paysandú. En el año 2003, en un relevamiento de su presencia en mieles de diferentes regiones de nuestro país, se encontró que está ampliamente distribuido, siendo la zona del litoral oeste la más afectada. Posteriormente, en un estudio epidemiológico realizado en base a una colección de aislamientos de diferentes zonas geográficas del país así como de Argentina, se encontró una alta similitud fenotípica y genotípica entre dichos aislamientos. Mediante rep-PCR se pudieron diferenciar dos genotipos circulantes en Uruguay, ambos ampliamente distribuidos: A (de distribución mundial, y presentado por el 60 % de los aislamientos) y C (presente exclusivamente en Argentina, y representado por el 40 % de los aislamientos uruguayos). Estos resultados, junto con el patrón de distribución de la bacteria en miel, confirman la idea que la principal ruta de entrada a Uruguay fue por el litoral oeste, desde Argentina, y desde allí se ha dispersado hasta ocupar gran parte del territorio nacional.

Además, se pudo comprobar que *P.larvae* produce durante su crecimiento una o más proteínas con actividad proteolítica, presuntamente implicadas en la degradación de tejidos larvales. Actualmente estamos trabajando en la identificación de estas proteínas. Estos resultados serán importantes a la hora de sentar las bases del diseño de una estrategia de control de la enfermedad en Uruguay.

## II. 4. APLICACION DE DIVERSAS ESTRATEGIAS PARA EL MONITOREO DE LA COMUNIDAD MICROBIANA EN UN SISTEMA DE TRATAMIENTO DE EFLUENTES"

Travers D., Etchebehere C., Menes J.

Departamento de Biociencias, Catedra de Microbiología, Facultad de Química- UDELAR

El vertido directo de los efluentes industriales hacia cursos de agua puede ocasionar serios problemas ambientales como la eutrofización. Es por ello que se implementan diversos sistemas para el tratamiento de efluentes antes de ser vertidos. En este caso se estudió un sistema de tratamiento biológico constituido por un reactor SBR (*sequencing batch reactor*) a escala de laboratorio (Reactor F), en el cual se realiza la remoción de carbono y nitrógeno alternando en el mismo tanque las etapas aerobia (nitrificación) y anóxica (desnitrificación).

El análisis de la comunidad microbiana de este reactor se abordó mediante el uso de distintas estrategias: técnicas moleculares (FISH, T-RFLP, clonado y secuenciado de los genes ARNr 16S *amoA* y *nirS*), y medidas de actividad respirométrica (nitrificante y heterótrofa) y desnitrificante.

Los resultados obtenidos a partir de las actividades medidas reflejaron los cambios de eficiencia de remoción de nutrientes dentro del reactor durante la operación. Estas técnicas sencillas podrían utilizarse para el control de sistemas reales donde el monitoreo permanente es menos habitual y mas costoso.

Las herramientas moleculares utilizadas permitieron identificar las especies nitrificantes y desnitrificantes mas abundantes presentes y explicar parcialmente los cambios en la eficiencia de remoción de nutrientes. Esta comunidad se mantuvo estable durante toda la operación del reactor; sin embargo la comunidad de bacterias totales (por el estudio del ARNr 16S) sufrió grandes cambios en su estructura.

## II. 2 OXIDACIÓN BIOLÓGICA DE METANO EN ARROZALES DE URUGUAY

L. Ferrando, S. Tarlera.

Cátedra de Microbiología – DEP BIO, Facultad de Química – UdelaR

El cultivo de arroz irrigado es una de las mayores fuentes biológicas de emisión de metano, gas con importante efecto invernadero. Las bacterias oxidantes de metano (metanótrofas) desempeñan un papel fundamental en la regulación de la emisión de este gas a la atmósfera ya que oxidan aeróbicamente el metano generado en este ecosistema. Estas bacterias se encuentran en las interfases aerobias–anaerobias (rizósfera e interfase suelo–agua), donde están disponibles tanto el oxígeno como el metano.

En este trabajo se realizó un estudio polifásico de la comunidad metanótrofa presente en este ecosistema, combinando metodologías clásicas (recuentos, aislamientos y ensayos de actividad metanótrofa potencial) con métodos moleculares (T-RFLP, clonado del gen *pmoA* y estudio filogenético) para el análisis de la composición y diversidad de esta comunidad.

El número de metanótrofas obtenido por Número Más Probable fue similar para ambas interfases ( $10^4$ - $10^5$  g dw<sup>-1</sup>) y la actividad metanótrofa potencial se encontró entre 0.5 y 4.0  $\mu$ moles de CH<sub>4</sub>/g dw.h.

Se asignaron los picos obtenidos en el T-RFLP mediante restricción *in silico* de las secuencias obtenidas en el clonado del gen *pmoA*.

El análisis filogenético basado en el gen *pmoA* realizado para rizósfera e interfase suelo-agua reveló que los clones analizados para ambas interfases pertenecen mayoritariamente a las metanótrofas *Tipo I* (géneros *Methylobacter*, *Methylomonas*, *Methylomicrobium*) observándose diferencias estructurales en los géneros dominantes en cada zona. La mayor parte de las cepas aisladas, en cambio, se encuentran filogenéticamente relacionadas a las metanótrofas *Tipo II* (géneros *Methylosinus* y *Methylocystis*).

La utilización de distintas metodologías resultó complementaria, logrando superar los sesgos de cada método individual.

## II. 5. EVALUACIÓN DE *PSEUDOMONAS* FLUORESCENTES NATIVAS COMO PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO DE LA ALFALFA Y BIOCONTROLADORAS DE ENFERMEDADES DE IMPLANTACIÓN

Yanes, M. L.<sup>1</sup>, A. Arias<sup>1</sup> y N. Altier<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Lab. Ecología Microbiana. IIBCE. Av. Italia 3318. CP11600. Montevideo, Uruguay.

<sup>2</sup>Protección Vegetal INIA-Las Brujas. Uruguay. [marialis@iibce.edu.uy](mailto:marialis@iibce.edu.uy)

La alfalfa (*Medicago sativa* L.) es una leguminosa forrajera de gran importancia para productores lecheros e invernaderos intensivos. Frente a condiciones ambientales desfavorables para una rápida emergencia y establecimiento de las plantas, se observa una alta incidencia de *damping-off* causado por patógenos del suelo. El control biológico de dichos patógenos mediante *Pseudomonas* fluorescentes puede ser una alternativa promisoría dentro de un programa de manejo integrado de plagas. Una colección de *Pseudomonas* fluorescentes nativas, aisladas de rizósfera de alfalfa de Colonia, Paysandú y Tacuarembó, fue caracterizada fenotípica y genotípicamente. Los aislamientos provenientes de suelos con historia previa de alfalfa, mostraron similitudes genotípicas y se diferenciaron de los provenientes de suelos con historia de campo natural. Estos últimos presentaron mayor porcentaje de aislamientos antagonistas cuando se ensayaron *in vitro* frente a *Pythium debaryanum*. Mediante ensayos *in vivo* bajo condiciones controladas, se observaron aislamientos de las tres regiones con capacidad protectora contra el *damping-off* causado por *P. debaryanum* en alfalfa. Estos aislamientos también mostraron promoción del crecimiento de la alfalfa y fueron fenotípicamente identificados como *Pseudomonas fluorescens* mediante API 20NE. Algunos aislamientos presentaron antagonismo contra otros hongos fitopatógenos. Se analizaron los posibles mecanismos involucrados en la acción biocontroladora: síntesis de sideróforos, antibióticos, enzimas hidrolíticas, compuestos surfactantes y HCN y los posibles mecanismos de promoción del crecimiento vegetal: solubilización de fosfato inorgánico y producción de ácido indolacético. Los aislamientos seleccionados son buenos candidatos para ser evaluados en condiciones de campo y así consolidarse como posibles agentes de control biológico de enfermedades de leguminosas forrajeras.

Financiado por Fondo Prof. Clemente Estable y PEDECIBA.

## **SIMPOSIO III. EL PAPEL REGULADOR DEL CITOESQUELETO CELULAR**

### **III. 2. COMUNICACIÓN GLIA-AXÓN Y SUS POSIBLES ALTERACIONES ESTRUCTURALES EN NEUROPATÍAS DE ORIGEN GENÉTICO**

**Alejandra Kun, Depto. Proteínas y Acidos Nucleicos, IIBCE**

Las células de Schwann mielinizantes y las neuronas (axones) del sistema nervioso periférico presentan un desarrollo común, signado por la polaridad longitudinal y radial. Manifiesta en dominios funcionales compartidos, la polaridad adquiere especificidad celular a través de un sistema de marcadores y receptores, axono-gliales. Ellos consisten en complejos multiproteicos que cumplen funciones estructurales y de señalización específicas. Estas proteínas se reconocen entre sí, formando complejos transcelulares, en una red estructural y funcional común. Las regiones nodales y su entorno inmediato (paranodo y juxtapanodo), representan el 1%, en tanto los internodos ocupan cerca del 99% de las áreas de contacto entre ambos tipos celulares. Estas últimas están ocupadas, en las glias mielinizantes, por regiones de mielina compacta, alternadas por regiones de mielina laxa (incisuras de Schmidt-Lanterman), que vinculan las áreas periaxoplásmicas con las perinucleares, en un largo camino helicoidal. A estas estructuras se le han atribuido roles asociados al mantenimiento glial (pasaje de iones y pequeñas moléculas). Sin embargo, tanto en fibras animales (rata) como humanas normales, los territorios axoplásmicos enfrentados a sus “desembocaduras” en las regiones perimielínicas internas, presentan un diámetro más reducido. Hemos observado, igualmente, que en condiciones patológicas, ellas tienden a alterarse, en forma tamaño, frecuencia y contenido.

Hemos comenzado a explorar los dominios citoplasmáticos de éstas regiones: caracterizando su citoesqueleto, su contenido en ribosomas, en ácidos nucleicos y en proteínas específicas, en fibras humanas y de ratas, en condiciones normales y durante el curso de neuropatías periféricas.

Financiado por CSIC

### **III. 4. REMODELACIÓN DEL CITOESQUELETO DE ACTINA DURANTE LA CICATRIZACIÓN DE HERIDAS EN EPITELIOS: ROL DEL POTENCIAL DE MEMBRANA.**

Silvia Chifflet. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina. UdelaR.

En estudios previos determinamos que tanto la despolarización como la hiperpolarización experimentales del potencial de membrana plasmática (PMP) producen reorganizaciones características del citoesqueleto en diversos epitelios en cultivo que posean uniones adherentes bien definidas. Con el propósito de determinar posibles significados fisiológicos de estos hallazgos exploramos si las modificaciones en el PMP participan en los aspectos celulares de los procesos de cicatrización de heridas en epitelios. Al respecto, encontramos que: a) ocurre una despolarización del PMP en las células del borde de las heridas, la que se extiende gradualmente a las células vecinas; b) esta despolarización está fundamentalmente determinada por un incremento en la permeabilidad plasmática al sodio mediada por el canal de sodio epitelial (ENaC), y c) la inhibición del ENaC y/o el reemplazo del sodio extracelular por un catión no difusible determina un decremento en la cantidad total de cable de actina producido en el borde de las heridas y una reducción significativa en la velocidad de cicatrización. Más recientemente encontramos que una onda lenta de calcio se desarrolla concomitantemente a la despolarización en el PMP, siguiendo una distribución espacial y temporal similar a esta. Asimismo obtuvimos evidencia de que la onda lenta de calcio sería consecuencia de la despolarización del PMP o del incremento de sodio intracelular que ocurre en las células cicatrizales. Tomados en conjunto, nuestros resultados contribuyen al concepto de que el potencial de membrana de las células no excitables juega un rol como intermediario en diversos procesos celulares.

Financiado por PEDECIBA, C.S.I.C. y PDT

### **III. 3. PROTEÍNAS CITOESQUELÉTICAS Y MARCKS EN NEUROBLASTOS**

Andrea Toledo, Flavio R. Zolessi y Cristina Arruti

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

MARCKS es una proteína ubicua, asociada a la membrana, que posee sitios de unión a la actina modulables por fosforilaciones dependientes de PKC. A pesar de su ubicuidad, la anulación del gen en ratones mostró efectos dramáticos en el sistema nervioso, aunque estos no dependerían de los sitios de fosforilación por PKC. Nosotros hemos descrito en el pollo una fosforilación sostenida de MARCKS en un sitio para quinasas dirigidas por prolina (Serina 25), que es específica de neuronas en diferenciación.

Con la intención de comprender la función de esta fosforilación, analizamos su posible efecto en la interacción de MARCKS con dos estructuras celulares: la membrana plasmática y componentes del citoesqueleto. Nuestros resultados indican que esta fosforilación no afecta la capacidad de MARCKS de asociarse a la membrana, incluyendo su integración en microdominios resistentes a detergentes (DRM o “rafts”), ni a los filamentos de actina. También mostramos por primera vez evidencias de la interacción de MARCKS con la actina en células vivas, no así con tubulina ni espectrina. También hemos encontrado que la integridad de los filamentos de actina es esencial para el mantenimiento del estado fosforilado de MARCKS. Esta fosforilación parecería estar vinculada a la existencia de contactos célula-célula o célula-sustrato.

En conjunto, estos hallazgos indican que la fosforilación de MARCKS en S25 no provoca grandes cambios en algunas de las interacciones moleculares relevantes de la proteína, dando lugar entonces a posibles funciones modulatorias sobre otros efectores.

### **III. 1. CITOESQUELETO DE CILIAS Y FLAGELOS: UNA HISTORIA EN MOVIMIENTO.**

Rossana Sapiro

Las ciliias y flagelos son estructuras eucarióticas altamente conservadas que se encuentran en las superficies celulares cumpliendo diversas funciones biológicas que incluyen; locomoción celular, movimiento de fluidos y reproducción sexual. Ambas especializaciones poseen un eje citoesquelético característico constituido por 9 dobletes de microtúbulos periféricos que rodean un par de microtúbulos centrales.

Con la utilización de animales transgénicos se ha podido dilucidar muchas de las funciones de las proteínas que se asocian a los microtúbulos y que parecen influir en la ciliogénesis o en el movimiento de ciliias y flagelos.

Nosotros hemos generado y caracterizado ratones que carecen de las proteínas Sperm Associated Antigen 6 (Spag6) y 16 (SPAG16), dos proteínas asociadas al par central de microtúbulos. En ambos casos hemos obtenido un fenotipo en el cual los ratones machos son infértiles aunque las hembras conservan su capacidad reproductiva. Además cuando se elimina Spag6, los ratones de ambos sexos presentan hidrocefalia, probablemente debido a defectos en la motilidad de las ciliias del epéndimo. Spag6 y SPAG16 poseen dominios de interacción entre proteínas por lo cual proponemos que podrían establecer entre ellas y con otras proteínas citoesqueléticas aún no identificadas; un armazón molecular que proporciona estabilidad a los microtúbulos.

El análisis pormenorizado de estos modelos nos permitirá en el futuro comprender mejor no solo la función de ciliias y flagelos sino también enfermedades que se producen por defectos de las mismas; por ejemplo disquinecias e infertilidad.

## **SIMPOSIO IV. BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR DE LA REPRODUCCIÓN**

### **IV. 2. RECEPTORES DE LAS HORMONAS ESTEROIDEAS SEXUALES EN CERVIX OVINO: Estudios en Corderas Pre-púberes y en Ovejas Adultas Durante el Ciclo Estral Natural e Inducido**

**Marcelo Rodríguez-Piñón**

Bioquímica, Departamento de Biología Molecular y Celular, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay

El objetivo de éste trabajo fue estudiar la sensibilidad y capacidad de respuesta a los estrógenos (E) y a la progesterona (P), en términos de concentración de sus receptores (RE, RP) y de sus correspondientes transcritos, en cervix de corderas prepúberes y de ovejas adultas en diferentes estados reproductivos. Las concentraciones de RE y RP se midieron por ensayos de unión y las de transcritos (RE $\alpha$ -ARNm y RP-ARNm) por hibridización en solución. En corderas prepúberes, el tratamiento con diferentes dosis de E<sub>2</sub> modificó la expresión de RE y RP en el tracto reproductivo en forma bifásica, siendo el cervix el órgano que mostró una respuesta de mayor magnitud a nivel transcripcional. Durante el ciclo estral, las concentraciones de RE y RP fueron mayores al estro que en la fase luteal, tanto en cervix craneal, como en caudal; mientras que el RE $\alpha$ -ARNm fue mayor al estro solo en cervix caudal. En ovejas en anestro estacional tratadas con P+GnRH, las variaciones en la expresión de RE y RP al momento de la ovulación y en la fase luteal temprana fueron similares a las encontradas en ovejas ciclando en el cervix craneal, mientras que en el cervix caudal no se encontraron variaciones. Los resultados, en su conjunto, demuestran que el cervix tiene una elevada sensibilidad y capacidad de respuesta a E y P y que los mecanismos moleculares que modulan la sensibilidad del cervix a las hormonas esteroideas ováricas pueden ser diferentes según el estado reproductivo y la región cervical.

#### **IV. 1. RECEPTORES ESTEROIDEOS SEXUALES EN HIPOFISIS Y UTERO DE OVEJAS: ANESTRO ESTACIONAL Y POSPARTO, CICLO ESTRAL Y FASES LUTEALES SUBNORMALES INDUCIDAS EXPERIMENTALMENTE**

Tasende, C.

Department of Clinical Chemistry, Faculty of Veterinary Medicine,  
Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala

El objetivo del trabajo de tesis fue contribuir al conocimiento de la expresión de los receptores de estrógenos y progesterona en hipófisis y útero de ovejas durante el posparto, anestro estacional, ciclo estral y en fases luteales normales y subnormales inducidas experimentalmente. Se midieron las hormonas por RIA y los receptores de estrógenos y progesterona por ensayos de unión. En el posparto tardío la concentración de receptores fue mayor que en el temprano. La recuperación de los receptores en el posparto tardío se asoció a la presencia de folículos estrógenos-activos en los ovarios. Durante el ciclo estral los niveles de receptores fueron mayores alrededor del estro que en la fase luteal concordando con la regulación positiva de los estrógenos y negativa de la progesterona sobre la expresión de sus receptores. Los niveles de estradiol preovulatorios y de progesterona en la fase luteal temprana fueron mayores en ovejas tratadas para inducir fases luteales normales que subnormales. El perfil de la concentración de los receptores hipofisarios y uterinos en ovejas en anestro tratadas para inducir fases luteales normales fue similar al de las ovejas durante el ciclo estral normal con niveles de receptores mayores alrededor de la ovulación que en la fase luteal temprana. Por el contrario en las ovejas tratadas para inducir fases luteales subnormales los receptores aumentaron en la fase luteal temprana. Estos resultados sugieren que la inducción de la expresión de los receptores esteroideos y los niveles hormonales circulantes están involucrados en los mecanismos de salida del anestro y formación de las fases luteales subnormales.

## **SIMPOSIO V. BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR VEGETAL**

### **V. 4. PRK-1, 2, 3 Y 4: UNA FAMILIA DE RECEPTORES DE SOLANUM TUBEROSUM INVOLUCRADOS EN MECANISMOS DE DEFENSA.**

**Ana Arruabarrena**

*\*Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.*

*\*Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay.*

La papa es un cultivo alimenticio de gran importancia mundial, con una producción anual cercana a 300 millones de toneladas y ocupa el segundo lugar en el consumo mundial de pesticidas químicos ya que es susceptible a una gran cantidad de plagas y enfermedades causadas por diversos patógenos. El estudio de las interacciones planta-patógeno es fundamental en el diseño de estrategias sustentables para el control de enfermedades, tanto monetaria como ambientalmente. El objetivo de esta línea de investigación es caracterizar el rol que cumple la familia de receptores tipo quinasa PRK en los mecanismos de respuesta de defensa vegetal. Estos receptores están involucrados en las etapas tempranas de los mecanismos de defensa de *Solanum tuberosum* que se desencadenan por infección con la bacteria fitopatógena *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, agente causal de la Podredumbre blanda de la papa. La caracterización funcional de estos receptores se ha abordado mediante una estrategia que involucra ingeniería genética vegetal. La misma incluye la obtención de plantas de *S. tuberosum* que exhiban una modulación en la expresión de los genes de esta familia de receptores (sobreexpresión y silenciamiento).

### V. 3. ESTUDIOS EN LA PLANTA NATIVA *Solanum commersonii* COMO POTENCIAL GERMOPLASMA EN EL MEJORAMIENTO DE PAPA

Siri, M.I.<sup>1</sup>, Galván, G.<sup>2</sup>, Quiricci, L.<sup>2</sup> y Pianzola, M.J.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Lab. de Microbiología, Facultad de Química. UDELAR.

<sup>2</sup>Cátedra de Horticultura, Facultad de Agronomía. UDELAR.

Uruguay es el centro de diversidad primario de la especie silvestre tuberosa *Solanum commersonii* (*Sc*) considerada el recurso nativo más valioso para el desarrollo de cultivares de papa con características mejoradas. En este trabajo, se realizó un estudio comparativo sobre el uso de marcadores moleculares RAPD, AFLP y SSR para la evaluación de la diversidad genética de una colección de accesiones de *Sc*. Se obtuvo una muy alta correlación entre los resultados generados por los tres tipos de marcadores. Los dendogramas revelaron un patrón de agrupamiento claramente relacionado con el origen geográfico, mostrando la existencia de dos grupos bien diferenciados de accesiones provenientes de la zona norte y sur del Uruguay. Paralelamente, se evaluó la resistencia de esta especie silvestre frente al patógeno *Ralstonia solanacearum* (*Rs*) causante de la marchitez bacteriana de la papa. Se confirmó la resistencia de *Sc* frente a *Rs*., encontrándose distintas categorías de resistencia entre las accesiones analizadas. No se obtuvo ninguna correlación entre los perfiles genéticos y los niveles de resistencia, sin embargo, se encontró un marcador RAPD de 800 pb presente únicamente en accesiones con fenotipo resistente. Se confirmó la homología de secuencia de todos los fragmentos y se diseñaron *primers* específicos logrando convertir este marcador anónimo RAPD en un marcador de secuencia caracterizada SCAR. La información generada en este estudio contribuye al mantenimiento del germoplasma de esta especie nativa y al establecimiento de criterios útiles para la selección de genotipos durante la planificación de cruzamientos.

## SIMPOSIO VI. PARASITOLOGÍA MOLECULAR

### VI. 1. *TcRBP19*: UNA PROTEÍNA DE UNIÓN AL ARN CON EXPRESIÓN DIFERENCIAL EN *Trypanosoma cruzi*

Leticia Pérez<sup>1</sup>, María Ana Duhagon<sup>1</sup>, Bruno Dallagiovanna<sup>2</sup>, Pablo Smircich<sup>1</sup>, Carlos Robello<sup>3</sup>, Noreen Williams<sup>4</sup> y Beatriz Garat<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Interacciones Moleculares, Facultad de Ciencias, UdelaR. <sup>2</sup>IBMP, Curitiba, Brasil. <sup>3</sup>Laboratorio de Inmunología Básica, UdelaR. <sup>4</sup>Department of Microbiology and Immunology, University at Buffalo, SUNY, USA

El ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* involucra diferentes estadios transcurriendo en dos huéspedes. Los tripanosomátidos regulan la expresión génica principalmente a nivel post-transcripcional. En trabajos anteriores presentamos una proteína de unión al ARN (Tc17) la cual recientemente, con la publicación del genoma de *T. cruzi* fue renombrada TcRBP19. Expresamos la proteína recombinante y generamos un anticuerpo anti TcRBP19. Western blots con proteínas totales de los diferentes estadios del parásito revelan una baja expresión de la proteína el estadio amastigota. Para la realización de estudios fenotípicos, sobreexpresamos TcRBP19 en epimastigotas no constatando diferencias significativas en su morfología así como en su tasa de crecimiento comparado con parásitos control. Sin embargo, los epimastigotas sobreexpresando TcRBP19 mostraban una capacidad disminuida de realizar metacicloogénesis *in vitro*. Mediante inmunofluorescencia observamos una localización difusa de TcRBP19 en el citoplasma de la célula. Estudiamos el efecto de la sobreexpresión de TcRBP19 en epimastigotas sobre la expresión génica global del parásito usando la tecnología microarreglos de ADN. Encontramos diferencias significativas en el perfil de ARN unido a polisomas entre control y los transfectantes. En este último se ven aumentados, tanto mensajeros implicados inespecíficamente en respuesta al estrés, como ARNm de proteínas que intervienen en vías metabólicas sorprendentemente específicas. Finalmente, se verificó la asociación de TcRBP19 a polisomas mediante fraccionamiento polisomal y western blot. La identificación de los blancos ARN de TcRBP19 se está realizando mediante *Pull-down ARN* por cromatografía de afinidad de glutatión sefarosa con GST-TcRBP19, se están poniendo a punto las condiciones para unión específica proteína-ARNs.

#### **VI. 4. ANTÍGENOS DE O-GLICOSILACIÓN SIMPLE: NUEVAS SIMILITUDES ENTRE PARÁSITOS Y CÉLULAS CANCEROSAS.**

Eduardo Osinaga

Departamento de Inmunobiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República

Los glicoconjugados juegan un papel importante en la interacción de los parásitos con su huésped. Nuestra actividad de investigación sobre la *O*-glicosilación en parásitos se inicia a partir de un resultado inesperado: la demostración de que dos de los antígenos más específicos de cáncer (Tn y sialil-Tn) se expresan en *Echinococcus granulosus*. Posteriormente comprobamos la presencia de estos antígenos en los principales grupos taxonómicos de parásitos helmintos, así como en *Trypanosoma cruzi*. A los efectos de iniciar un estudio detallado sobre las bases moleculares de la primera etapa de la *O*-glicosilación en parásitos helmintos, efectuamos el clonado, caracterización funcional y evaluación de expresión celular de una ppGalNAc-T de *E. granulosus* (denominada Eg-ppGalNAc-T1). Uno de los resultados más interesantes de este trabajo fue la observación de que la Eg-ppGalNAc-T1 presenta un dominio lectina con características hasta ahora no descritas para una glicosiltransferasa. El mismo contiene un motivo CYTH, especializado en la unión de fosfatos orgánicos. El significado de estos resultados debe interpretarse en el contexto de interesantes similitudes biológicas y moleculares entre algunos parásitos y células cancerosas; la posible existencia de reacciones inmunológicas cruzadas entre enfermedades parasitarias y cáncer; así como en la identificación de una ppGalNAc-T esencial para el desarrollo de la *Drosophila melanogaster*, lo que habilita a plantear la hipótesis de que alguna ppGalNAc-T sea un potencial blanco de interés terapéutico anti-parasitario.

## VI. 5. UNA KININASA NOVEL EN LOS PRODUCTOS EXCRETADOS / SECRETADOS DE *Fasciola hepatica*

Berasain, P., Unidad de Biología Parasitaria, Dpto. de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias

Las cisteína-proteinasas de *F. hepatica* cumplen numerosas funciones en la biología de este parásito trematodo, tales como nutrición, migración por los tejidos e interferencia con la respuesta inmune de sus hospederos. En este trabajo se describe por primera vez una actividad nueva de tipo kininasa en los productos de excreción/secreción (PES) de los gusanos adultos del trematodo y por primera vez en endoparásitos. Usando el bioensayo sobre íleon de cobayo hemos demostrado que los PES son capaces de hidrolizar eficientemente la bradiquinina (BK, Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg), inactivando a este potente biopéptido. La actividad kininasa fue completamente inhibida por E-64, mientras que el inhibidor de metaloproteinasas, el EDTA no detiene la actividad, indicando que la(s) enzima(s) responsable(s) de la inactivación de la BK es(son) cisteínproteinasas. El análisis por electroforesis capilar de los productos de corte de la BK mostró al fragmento BK1-6 como el único producto detectado, revelando que la actividad kininasa de PES hidroliza el enlace Ser6-Pro7. Más aún, dicho sitio de corte representa una especificidad única ya que ninguna de las kininasas conocidas hasta el momento cortan la BK en dicho sitio. Sorprendentemente, los PES no hidrolizan un análogo fluorogénico de la BK, el *o*-aminobenzoyl-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-Gln-(ethylendiamine 2,4-dinitrophenyl). Debido a que la cathepsina L1 es la principal cisteínproteinasas presente en PES de gusanos adultos, analizamos también la capacidad de la enzima recombinante para inactivar BK, y no se detectó actividad kininasa en la misma. Por lo tanto, junto a la CL1, los PES deben presentar otra cisteínproteinasas que podría ser responsable por esta novel actividad kininasa. Probablemente, esta kininasa permita al parásito interferir con la respuesta inflamatoria modulada por la BK a través de sus receptores B2.

## VI. 6. ANÁLISIS DE RESPUESTAS AL ESTRÉS FÍSICO-QUÍMICO EN *TRYPANOSOMA CRUZI*

Adriana Parodi-Talice<sup>1,2</sup>; Dolores Piñeyro<sup>1</sup>; Gonzalo Greif<sup>3</sup>; Carlos Robello<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

<sup>2</sup>Sección Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

<sup>3</sup>Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

*Trypanosoma cruzi* presenta un complejo ciclo de vida, requiriendo para su supervivencia de una capacidad adaptativa rápida frente a los cambios de entorno. Dos procesos en su diferenciación debemos destacar:

- a) **La invasión celular:** durante la misma *T. cruzi* se aloja en vesículas fagolisosómicas, donde se sintetizan radicales libres, tóxicos para los parásitos, así como cambios de pH. La adaptación rápida de los parásitos a nuevos entornos es la que permitirá su supervivencia y la persistencia de la infección.
- b) **La metacicloogénesis:** en este proceso el parásito se transforma en el insecto de una forma no infectiva para el ser humano a una infectiva; el estrés nutricional desencadena este proceso.

Las proteínas implicadas en la capacidad infectiva así como en las respuestas adaptativas rápidas del parásito constituyen factores de virulencia cuya identificación y caracterización es altamente relevante para el diseño de fármacos. Para identificar este tipo de marcadores moleculares hemos llevado adelante tres abordajes:

- 1) Caracterización de proteínas que cambian sus perfiles de expresión en respuesta al estrés.
- 2) Caracterización de perfiles de ubiquitinación en respuesta al estrés.
- 3) Caracterización de sistemas de defensas antioxidantes relevantes en el parásito, detectados por las aproximaciones 1) y 2)

Los resultados obtenidos han permitido:

- Identificar proteínas relevantes en la metacicloogénesis
- Determinar la relevancia de la ubiquitinación en respuestas a estrés físico químico
- Caracterizar funcionalmente enzimas identificadas en la respuesta adaptativa
- Determinar, a partir de estructuras proteicas obtenidas, posibles blancos de acción de fármacos.

Este trabajo fue financiado por el proyecto PDT

## **SIMPOSIO VII. ESTRUCTURA, QUÍMICA Y FUNCIÓN CELULAR A NIVEL MOLECULAR: LO QUE UN LÁSER NOS PERMITE CONOCER**

### **SIMPOSIO VIII. ONCOLOGÍA MOLECULAR**

#### **VIII. 1. MUTACIONES SINÓNIMAS Y MISSENSE EN EL GEN CODIFICANTE DE LA PROTEÍNA P53**

Fabian Alvarez

El gen codificante de la proteína p53 se encuentra mutado en aproximadamente el 50% de los tumores humanos. La mayoría de estas mutaciones, que afectan la actividad normal de p53 como supresor de tumoral, son de tipo puntual y en general implican cambios de aminoácidos o creación de codones de terminación prematuros. Sin embargo se ha aislado un número muy elevado de mutaciones sinónimas en p53, es decir mutaciones que no alteran la secuencia de aminoácidos en la proteína, y que sin embargo están asociados a la patología tumoral. Estas mutaciones se encuentran en un número mucho mayor al esperado, si las mutaciones sinónimas fueran efectivamente irrelevantes desde el punto de vista funcional. La explicación más comúnmente aceptada es que las mutaciones sinónimas son la consecuencia de la hipermutabilidad que afecta a las células cancerosas. Hemos estudiado recientemente la distribución espacial de las mutaciones sinónimas reportadas en el gen que codifica la proteína p53 y vimos que dicha distribución no es al azar sino que se encuentra asociada a aspectos de importancia funcional. Específicamente vimos que las mutaciones sinónimas se encuentran ubicadas preferentemente en los codones que codifican aminoácidos relevantes desde el punto de vista funcional, y también tienden a ubicarse en posibles regiones reguladoras de splicing (Lamolle et al., 2006). Por otro lado hemos estudiado la distribución filogenética de mutaciones missense. Llamativamente una proporción llamativamente alta de las mutaciones que en el hombre son probablemente deletéreas aparecen como el tipo salvaje en otras especies de mamíferos.

## **VIII. 2. PARTICIPACIÓN DE microRNAs EN LA INICIACIÓN Y PROGRESIÓN DEL CÁNCER.**

Alfonso Cayota, Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, UdelaR.

Una nueva familia de RNAs de pequeño tamaño denominados microRNAs (miRNAs) ha sido recientemente identificada en plantas y animales. Tienen un largo de ~22 nucleótidos y regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional mediante la unión por complementariedad de bases con las regiones 3'UTR de los mRNA blancos induciendo su degradación o la inhibición de su traducción. Actualmente se han descrito más de 460 miRNAs en humanos y se estima que regulan más de un 30% de genes de proteínas que participan en procesos como embriogénesis, apoptosis, proliferación y diferenciación entre otros. Estos elementos junto al hallazgo que más de un 50% de genes de miRNAs están localizados en regiones genómicas frecuentemente alteradas en el cáncer ha sugerido que los mismos pueden jugar un novedoso y relevante rol en la biología del cáncer. Consistentemente con esta hipótesis se ha descrito recientemente una alteración en los perfiles de expresión de microRNAs en diversos cánceres humanos. Estas y otras evidencias recientes han demostrado que mutaciones o alteraciones de la expresión de diferentes miRNAs y otros factores proteicos asociados a su actividad funcional pueden funcionar como oncogenes o supresores tumorales. Esta reciente área de investigación aporta nuevos elementos en la comprensión de la biología del cáncer de imprevisible proyección en el diagnóstico y tratamiento del cáncer

**VIII. 3. O-GLICOSILACION Y CANCER.  
CARACTERIZACION DE UNA GLICOSILTRANSFERASA RELACIONADA  
CON EL NEUROBLASTOMA METASTASICO.**

Nora Berois

Laboratorio de Oncología Básica y Biología Molecular, Facultad de Medicina.  
Universidad de la República

Las frecuentes alteraciones de la glicosilación en el cáncer han promovido numerosas investigaciones tendientes a comprender sus bases moleculares, así como la evaluación de muchas de estas moléculas como potenciales marcadores o eventuales blancos terapéuticos en oncología. Dentro de ellas, algunos miembros de la familia de ppGalNAc-transferasas, que catalizan el primer paso de la *O*-glicosilación, se han visto expresados en forma aberrante en diferentes tumores. En un modelo de neuroblastoma humano metastático, mediante estudio de expresión génica diferencial, se identificó a la ppGalNAc-T13 como el gen más sobreexpresado en la métastasis en relación al tumor primario. Técnicas de RT-PCR han permitido evaluar su utilidad como marcador de invasión medular en muestras clínicas de pacientes al diagnóstico, habiendo demostrado una mejor correlación con la sobrevida global que otros marcadores de referencia. La alta sensibilidad y especificidad del procedimiento puede permitir, en el seguimiento de estos pacientes, la detección de enfermedad diseminada oculta. Por otra parte, la constatación de la expresión de esta enzima en otros tumores ha motivado su evaluación para el diagnóstico de diseminación tumoral, así como su potencial utilidad como factor pronóstico.

#### **VIII. 4. Hsp25 COMO BLANCO TERAPÉUTICO EN EL CÁNCER DE MAMA MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE ARN DE INTERFERENCIA (siRNA)**

María A. Bausero, Unidad de Biología Celular, Instituto Pasteur de Montevideo

La proteína de choque térmico Hsp25 está asociada entre otros con el cáncer de mama y está sobreexpresado en biopsias y suero de pacientes. En este estudio, utilizamos ARN de interferencia para silenciar el gen de Hsp25 (siRNA-Hsp25) en adenocarcinoma mamario murino 4T1. Estas células se caracterizan por ser pobremente inmunogénicas y altamente metastásicas. En este trabajo, demostramos que la transfección de 4T1 con ARN de interferencia para Hsp25 (siRNA-Hsp25) inhibe dramáticamente la proliferación cuando se compara con las células transfectadas para la sobre-expresión de Hsp25. Paralelamente, estudios */in vivo/* sugieren tanto un enlentecimiento del crecimiento tumoral como una reducción en el número de metástasis pulmonares. Además, demostramos que el silenciamiento de Hsp25 inhibe el potencial de migración tumoral por mecanismos que involucran la represión de metaloproteinasa de matriz-9 (MMP-9) y concomitante la sobre-regulación de su antagonista TIMP-1 (Tissue inhibitor metaloproteinase-1). En suma, estos hallazgos proveen un modelo importante para los estudios del potencial metastásico y proveen un blanco terapéutico en el cáncer de mama.

## **VIII. 5. DESARROLLO DE VIRUS ONCOLÍTICOS PARA EL TRATAMIENTO DE TUMORES INDUCIDOS POR PAPILOMAVIRUS**

Francisco Noya

Laboratorio de Ecología Microbiana, IIBCE.

La utilización de virus recombinantes para el tratamiento del cáncer ha cobrado gran importancia en los últimos años. La manipulación genética de estos vectores permite mejorar su infectividad, especificidad y poder citolítico. El objetivo a largo plazo de este enfoque es lograr desarrollar vectores virales capaces de infectar y destruir selectivamente a las células tumorales sin afectar a las células normales. El papilomavirus humano (HPV) es responsable de más de 500.000 nuevos casos de carcinoma de cuello de útero por año en el mundo. Con el objetivo de desarrollar un vector oncolítico basado en adenovirus que sea específico para los tumores inducidos por papilomavirus se introdujeron modificaciones en la oncoproteína E1A del adenovirus Ad12. El virus “atenuado” resultante sólo es capaz de proliferar en aquellas células que expresan las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-18. Para validar estos resultados se utilizaron cultivos organotípicos de queratinocitos primarios que recapitulan el desarrollo normal de un epitelio estratificado y se constituyen en un excelente modelo experimental para la validación de vectores oncolíticos.

**SIMPOSIO IX. BIOTECNOLOGÍA**

## **SIMPOSIO X. MICROBIOLOGÍA CLÍNICA**

### **VII. 5. LA GLÍA RADIAL COMO CÉLULA PROGENITORA EN LA GELATINOSA CENTRAL.**

Anabel Fernández. Dpto Neuroanatomía Comparada IIBCE

Hoy se acepta que determinadas regiones del cerebro de los mamíferos conservan la capacidad de generar nuevas neuronas en la vida adulta. Sin embargo existen numerosas interrogantes acerca de las células responsables de mantener esta capacidad. La mayoría de los aportes relacionados con la neurogénesis postnatal fueron realizados a nivel del cerebro y muy poco se sabe de lo que ocurre en la medula espinal. Estudios recientes sugieren a la glia radial como una firme candidata a ser la progenitora neuronal.

Nuestro grupo ha iniciado el estudio de la neurogénesis postnatal en la medula espinal de la tortuga *Trachemis d'orbigny*. A través del marcado con Bromodeoxiuridina (marcador de proliferación celular), en combinación con marcadores neuronales y gliales hemos demostrado que la Gelatinosa Central de las tortugas juveniles mantiene una activa capacidad de génesis de nuevas neuronas y glías. (Fernández y col. 2002). A través de la combinación de diferentes metodologías experimentales fue posible caracterizar distintas poblaciones celulares en la región. Tanto el Golgi como la microscopía electrónica y la inmunohistoquímica mostraron que una de esas poblaciones celulares, cumple con las características descritas para la glia radial. Estas células resentan una prolongación apical conectada al canal central y otra periférica que termina en la piamadre,. Son células positivas al S-100, en algunos casos al GFAP y muestran marcada proliferación. Además la microscopía electrónica mostró que son monociliadas y que poseen uniones "gap" entre ellas. La electrofisiología confirmó, a través de la inyección intracelular que la biocitina pasa por dichas uniones marcando un grupo de estas células cuando solo una es inyectada. Los registros mostraron que son células de baja resistencia en concordancia con el acople funcional y en algunas situaciones estas células pueden estar desacopladas Russo y col 2004.

#### **VII. 4. PROTEÍNA PRIÓNICA CELULAR Y PROTEÍNA INDUCIBLE POR ESTRÉS 1: PARTICIPACIÓN EN UNA VÍA TRÓFICA PARA MOTONEURONAS ESPINALES**

**Ana G. Barbeito<sup>1</sup>, Laura Martínez-Palma<sup>1</sup>, Patricia Cassina<sup>1</sup>, Glaucia N. M. Hajj<sup>4</sup>, Ricardo R. Brentani<sup>3</sup>, Luis Barbeito<sup>2</sup> & Vilma R. Martins<sup>3,4</sup>**

<sup>1</sup>Depto. de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de la República e <sup>2</sup>Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay, <sup>3</sup> Centro de Tratamiento e Pesquisa Hospital do Câncer, y <sup>4</sup> Ludwig Institute for Cancer Research, São Paulo, Brazil

La supervivencia de las motoneuronas es altamente dependiente de factores tróficos provenientes de sus blancos y de las células gliales que las rodean. La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa fatal, caracterizada por la degeneración selectiva de motoneuronas. En su patogenia participan diversos factores; entre ellos, la glia y particularmente los astrocitos tienen un rol importante.

La proteína inducible por estrés 1 (STI1), es una co-chaperonina, que además promueve neuroprotección y neuritogénesis mediadas por proteína priónica celular (PrP<sup>C</sup>). El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar la participación de esta vía trófica en la supervivencia de motoneuronas, y en modelos para la ELA.

Mostramos por inmunofluorescencia indirecta que ambas proteínas son expresadas por motoneuronas en cultivo. El péptido STI1<sub>230-245</sub>, que contiene el sitio de unión de STI1 a PrP<sup>C</sup>, es capaz de prevenir la muerte de las motoneuronas purificadas inducida por privación de factores tróficos y en un modelo de co-cultivo para la ELA.

En el modelo murino para la ELA, no se observaron modificaciones en la expresión de STI1 y PrP<sup>C</sup> en la médula espinal mediante westernblots. Sin embargo, la utilización de técnicas de inmunofluorescencia en cortes histológicos de médula espinal permitió demostrar que la expresión de STI1, aunque no de PrP<sup>C</sup>, está disminuida particularmente en motoneuronas en degeneración. Estos datos sugieren una participación de la vía PrP<sup>C</sup>/STI1 en la enfermedad, así como un posible potencial terapéutico.

### **VII. 3. PAPEL DE LOS ASTROCITOS EN LA ACIDEMIA GLUTÁRICA I: UN ABORDAJE MORFO-FUNCIONAL**

Silvia Olivera Bravo, NCM-IIBCE

En la acidemia glutárica I (GAI), error innato del metabolismo aminoacídico, la ausencia de la glutaril-CoA deshidrogenasa altera el metabolismo del triptofano, lisina e hidroxilina, acumulando ácidos glutárico (GA), 3-hidroxiglutárico (3OHGA) y glutacónico que producen neurodegeneración estriatal, atrofia fronto-temporal, alteraciones espongiiformes y macrocefalia en niños de 6 a 18 meses. El enfoque neuronocéntrico empleado en GAI no explica su fisiopatología ni es eficaz para su tratamiento y el papel de la glia es desconocido. En nuestra hipótesis de trabajo, los astrocitos y oligodendrocitos pueden ser blancos relevantes de GA y 3OHGA afectando la sobrevivencia neuronal y la mielinización. Para testarla, se trataron astrocitos corticales en cultivo con GA y/o 3OHGA. Se determinó número, fenotipo, sobrevivencia astrocitaria y efectos sobre la función mitocondrial. Mediante marcadores mitocondriales vitales (MitoTracker Red, MitoFluor Green, JC1) se determinó que GA y 3OHGA producen despolarización mitocondrial selectiva comprometiendo el soporte trófico que los astrocitos brindan a las neuronas. Esta despolarización mitocondrial, precede los cambios fenotípicos asociados a reactividad determinados por marcadores estructurales (faloidina-Alexa 568) y por inmunocitoquímica contra GFAP (proteína acídica fibrilar) y es además anterior a la proliferación determinada mediante incorporación de 5-bromodeoxiuridina. Todos los efectos reportados fueron inhibidos total o parcialmente por antioxidantes mitocondriales específicos. Por tanto, las células gliales podrían ser intermediarios importantes en el desencadenamiento y progresión de GAI y el uso de bloqueantes de reactividad y señalización astrocitaria y/o antioxidantes podría ser más eficaz que el manejo dietario o las terapias alcalinizantes actuales que no logran revertir o enlentecer la enfermedad.

## **SIMPOSIO VIII. ONCOLOGÍA MOLECULAR**

### **VIII. 2. PARTICIPACIÓN DE microRNAs EN LA INICIACIÓN Y PROGRESIÓN DEL CÁNCER.**

Alfonso Cayota, Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, UdelaR.

Una nueva familia de RNAs de pequeño tamaño denominados microRNAs (miRNAs) ha sido recientemente identificada en plantas y animales. Tienen un largo de ~22 nucleótidos y regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional mediante la unión por complementariedad de bases con las regiones 3'UTR de los mRNA blancos induciendo su degradación o la inhibición de su traducción. Actualmente se han descrito más de 460 miRNAs en humanos y se estima que regulan más de un 30% de genes de proteínas que participan en procesos como embriogénesis, apoptosis, proliferación y diferenciación entre otros. Estos elementos junto al hallazgo que más de un 50% de genes de miRNAs están localizados en regiones genómicas frecuentemente alteradas en el cáncer ha sugerido que los mismos pueden jugar un novedoso y relevante rol en la biología del cáncer. Consistentemente con esta hipótesis se ha descrito recientemente una alteración en los perfiles de expresión de microRNAs en diversos cánceres humanos. Estas y otras evidencias recientes han demostrado que mutaciones o alteraciones de la expresión de diferentes miRNAs y otros factores proteicos asociados a su actividad funcional pueden funcionar como oncogenes o supresores tumorales. Esta reciente área de investigación aporta nuevos elementos en la comprensión de la biología del cáncer de imprevisible proyección en el diagnóstico y tratamiento del cáncer

### **VIII. 3. O-GLICOSILACION Y CANCER: CARACTERIZACION DE UNA GLICOSILTRANSFERASA RELACIONADA CON EL NEUROBLASTOMA METASTASICO.**

Nora Berois

Laboratorio de Oncología Básica y Biología Molecular, Facultad de Medicina.  
Universidad de la República

Las frecuentes alteraciones de la glicosilación en el cáncer han promovido numerosas investigaciones tendientes a comprender sus bases moleculares, así como la evaluación de muchas de estas moléculas como potenciales marcadores o eventuales blancos terapéuticos en oncología. Dentro de ellas, algunos miembros de la familia de ppGalNAc-transferasas, que catalizan el primer paso de la *O*-glicosilación, se han visto expresados en forma aberrante en diferentes tumores. En un modelo de neuroblastoma humano metastático, mediante estudio de expresión génica diferencial, se identificó a la ppGalNAc-T13 como el gen más sobreexpresado en la métastasis en relación al tumor primario. Técnicas de RT-PCR han permitido evaluar su utilidad como marcador de invasión medular en muestras clínicas de pacientes al diagnóstico, habiendo demostrado una mejor correlación con la sobrevida global que otros marcadores de referencia. La alta sensibilidad y especificidad del procedimiento puede permitir, en el seguimiento de estos pacientes, la detección de enfermedad diseminada oculta. Por otra parte, la constatación de la expresión de esta enzima en otros tumores ha motivado su evaluación para el diagnóstico de diseminación tumoral, así como su potencial utilidad como factor pronóstico.

#### **VIII. 4. Hsp25 COMO BLANCO TERAPÉUTICO EN EL CÁNCER DE MAMA MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE ARN DE INTERFERENCIA (siRNA)**

María A. Bausero, Unidad de Biología Celular, Instituto Pasteur de Montevideo

La proteína de choque térmico Hsp25 está asociada entre otros con el cáncer de mama y está sobreexpresado en biopsias y suero de pacientes. En este estudio, utilizamos ARN de interferencia para silenciar el gen de Hsp25 (siRNA-Hsp25) en adenocarcinoma mamario murino 4T1. Estas células se caracterizan por ser pobremente inmunogénicas y altamente metastásicas. En este trabajo, demostramos que la transfección de 4T1 con ARN de interferencia para Hsp25 (siRNA-Hsp25) inhibe dramáticamente la proliferación cuando se compara con las células transfectadas para la sobre-expresión de Hsp25. Paralelamente, estudios */in vivo/* sugieren tanto un enlentecimiento del crecimiento tumoral como una reducción en el número de metástasis pulmonares. Además, demostramos que el silenciamiento de Hsp25 inhibe el potencial de migración tumoral por mecanismos que involucran la represión de metaloproteinasa de matriz-9 (MMP-9) y concomitante la sobre-regulación de su antagonista TIMP-1 (Tissue inhibitor metaloproteinase-1). En suma, estos hallazgos proveen un modelo importante para los estudios del potencial metastásico y proveen un blanco terapéutico en el cáncer de mama.

## **VIII. 5. DESARROLLO DE VIRUS ONCOLÍTICOS PARA EL TRATAMIENTO DE TUMORES INDUCIDOS POR PAPILOMAVIRUS**

Francisco Noya

Laboratorio de Ecología Microbiana, IIBCE.

La utilización de virus recombinantes para el tratamiento del cáncer ha cobrado gran importancia en los últimos años. La manipulación genética de estos vectores permite mejorar su infectividad, especificidad y poder citolítico. El objetivo a largo plazo de este enfoque es lograr desarrollar vectores virales capaces de infectar y destruir selectivamente a las células tumorales sin afectar a las células normales. El papilomavirus humano (HPV) es responsable de más de 500.000 nuevos casos de carcinoma de cuello de útero por año en el mundo. Con el objetivo de desarrollar un vector oncolítico basado en adenovirus que sea específico para los tumores inducidos por papilomavirus se introdujeron modificaciones en la oncoproteína E1A del adenovirus Ad12. El virus “atenuado” resultante sólo es capaz de proliferar en aquellas células que expresan las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-18. Para validar estos resultados se utilizaron cultivos organotípicos de queratinocitos primarios que recapitulan el desarrollo normal de un epitelio estratificado y se constituyen en un excelente modelo experimental para la validación de vectores oncolíticos.

## SIMPOSIO IX. BIOTECNOLOGÍA

### IX. 1. OBTENCIÓN DE UN CLON RECOMBINANTE DE *HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE* (LAC<sup>+</sup>) CAPAZ PRODUCIR POLI 3-HIDROXIBUTIRATO EN PRESENCIA DE SUERO DE QUESO COMO FUENTE DE CARBONO

Ana I. Catalán<sup>1\*</sup>, F. Ferreira<sup>2</sup>, P. Gill<sup>1,3</sup>, y S. Batista<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica del Inst. de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Unidad Asoc. Inst. de Química Biológica de Fac. Ciencias

<sup>2</sup>Laboratorio de Carbohidratos y Glicoconjugados del Inst. de Higiene, Fac. de Medicina y Fac. Química

<sup>3</sup>Laboratorio de Tecnología Molecular, Fac. de Ciencias

\*anaines@iibce.edu.uy

Los plásticos petroquímicos pueden ser utilizados en diversas áreas gracias a su gran versatilidad. Estos materiales son recalcitrantes a la degradación biológica y pueden permanecer varios años en el medio ambiente. La pesquisa de materiales termoplásticos biodegradables de bajo costo se ha incrementado desde hace algunos años involucrando investigadores del área académica e industrial.

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son poliésteres termoplásticos biodegradables de origen biológico. Estos polímeros son acumulados por algunos microorganismos como reserva de carbono y energía. Los PHAs son considerados como potenciales sustitutos de los plásticos convencionales en determinadas áreas, pero el costo de producción es bastante superior al de los derivados petroquímicos. Esto puede ser disminuido empleando sustratos carbonados económicos como, por ejemplo, algunos subproductos industriales (melaza, suero de queso de leche, etc).

*Herbaspirillum seropedicae* acumula poli 3-hidroxitirato (PHB) en presencia de una amplia variedad de fuentes de carbono como glucosa y galactosa, pero es incapaz de crecer en presencia de lactosa. Mediante la transferencia de los genes *lacZY* de *Escherichia coli* (pHM3) se obtuvo un clon recombinante de la cepa Z69 de *H. seropedicae*, denominado Z69Lac+, capaz de crecer en presencia de lactosa como única fuente de carbono. El clon Z69Lac+ cultivado en medio definido con lactosa fue capaz de acumular aproximadamente un 36 % de PHB, valor comparable al producido cuando se utilizó glucosa como fuente de carbono. Asimismo, Z69Lac+ creció y acumuló PHB cuando se cultivó en presencia de suero de queso de leche como única fuente de carbono.

En este trabajo se discute la influencia de las condiciones de cultivo sobre el contenido de PHB alcanzado por la cepa Z69Lac+ así como la futura construcción de un clon derivado de la cepa Z69 generado mediante la inserción cromosomal del operón *lacZY* de forma estable.

Financiado por CSIC y RITE.

## SIMPOSIO X. MICROBIOLOGÍA CLÍNICA

### X. 1. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA DE *PROTEUS MIRABILIS* EXPRESADAS IN VIVO E IDENTIFICACIÓN MEDIANTE ESTRATEGIAS PROTEÓMICAS

Bruno D'Alessandro

Laboratorio de Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas  
Estable

Clemente

*Proteus mirabilis* es un patógeno oportunista Gram-negativo que causa infecciones urinarias, asociadas a complicaciones en pacientes con tracto urinario anormal y con catéteres urinarios. Recientemente el genoma de esta bacteria fue secuenciado y aunque su anotación aún está pendiente, su secuencia está disponible de forma pública. En este trabajo se utilizó una estrategia proteómica para identificar a las PME de la bacteria que se expresan diferencialmente *in vivo* en el modelo de cámaras intraperitoneales en rata (CIP). La estrategia utilizada consistió en obtener los perfiles de PME de *P. mirabilis* en el modelo de CIP mediante SDS-PAGE, analizar mediante espectrometría de masas MALDI-TOF las bandas detectadas diferencialmente *in vivo* y realizar búsquedas en una base de datos generada a partir de la secuencia genómica de *P. mirabilis* y en bases de datos públicas. Mediante esta estrategia se analizaron tres proteínas, expresadas diferencialmente *in vivo* y en cultivo bajo restricción de hierro, que pudieron ser identificadas con tres marcos abiertos de lectura en el genoma de *P. mirabilis*. El análisis de su secuencia mostró que contenían dominios típicos de receptores de membrana externa dependientes de TonB y homología con receptores de membrana bacterianos para la captación de hierro. Posteriormente se evaluó mediante *western blot* la expresión de las PME durante una infección urinaria ascendente experimental en ratón, revelando una fuerte inducción de anticuerpos específicos contra dichas proteínas. Estos resultados alientan a investigar el papel de estas proteínas en la infección, su evaluación como antígenos protectores, así como el uso de esta estrategia para identificar nuevas proteínas de *P. mirabilis*.

### **X. 3. HANTAVIRUS EN URUGUAY: RESERVORIOS NATURALES Y SÍNDROME PULMONAR POR HANTAVIRUS.**

**Mag. Adriana Delfraro.**

Sección Virología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

Los Hantavirus son virus envueltos con genoma de ARN trisegmentado de polaridad negativa. Son altamente especie-hospedero específicos y su reservorio natural son roedores múridos, en los cuales establecen una infección persistente. En el hombre producen la fiebre hemorrágica con síndrome renal y el síndrome pulmonar por hantavirus (SPH), una zoonosis de impacto sanitario en las Américas.

Nuestro objetivo fue identificar las especies de roedores que actúan como reservorio de hantavirus en Uruguay, caracterizar los virus circulantes y analizar las principales características del SPH en nuestro país.

Se capturaron roedores en las localidades donde ocurren la mayoría de los casos de SPH en Uruguay. Se investigó la presencia de IgGs anti hantavirus por ELISA, y se caracterizaron los genomas virales en roedores seropositivos y casos de SPH por RT-PCR, secuenciación y análisis filogenético.

Los roedores que actúan como reservorio primario de hantavirus en Uruguay son el ratón colilargo chico (*Oligoryzomys flavescens*) y el ratón colilargo grande (*Oligoryzomys nigripes*). Se encontró un tercer roedor seropositivo, no descrito previamente como reservorio de hantavirus: el ratón hocicudo (*Oxymycterus nasutus*). El análisis de secuencias mostró que las variantes circulantes en Uruguay son Andes Central Plata y Lechiguanas, ambas estrechamente emparentadas, y el hantavirus Jujutiba.

La mayoría de los casos de SPH en Uruguay ocurren en las zonas rurales y suburbanas de Montevideo y Canelones, entre trabajadores rurales del sexo masculino, con una letalidad del 21%. Las características clínicas son similares a las descritas para la región, destacándose un porcentaje mayor de afectación renal.

## **X. 1. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Neisseria meningitidis* serogrupo C EN URUGUAY**

**Gabriela García Gabarrot**

**Unidad de Bacteriología, Servicio Nacional de Laboratorios de Salud Pública**

*N. meningitidis* es un agente frecuente de meningitis supuradas que afecta principalmente a niños y adolescentes, con una tasa de mortalidad entre 5 y 10% y más del 20% de los que sobreviven lo hacen con secuelas neurológicas.

*N. meningitidis* se clasifica según su cápsula en 12 serogrupos, los más relevantes son: el serogrupo A que provoca epidemias periódicas en Africa sub-sahariana, y los serogrupos B y C que son los más frecuentes en el mundo desarrollado y América Latina. Mientras que el primero solamente produce brotes esporádicos autolimitados, el segundo es capaz de producir epidemias significativas, como la ocurrida en Uruguay en la década del 70. Afortunadamente existen vacunas para el serogrupo C, que por ser polisacáridicas, no confieren una inmunidad permanente, pero son efectivas para detener una epidemia.

En Uruguay, se registraron recientemente dos brotes epidémicos por el serogrupo capsular C: en Rivera en 1993 y en Paysandú en 1994, a los que les siguió un aumento progresivo de casos. El diagnóstico de situación, fruto de la vigilancia epidemiológica, determinó la decisión de instrumentar una vacunación masiva a los grupos de riesgo en 1996.

El estudio que presentaremos explora la variabilidad genética de 116 cepas de *N. meningitidis* serogrupo C, aisladas entre 1993 y 2001, para demostrar la siguiente hipótesis: los brotes epidémicos antes mencionados serían el resultado de la diseminación de dos clones diferentes; las cepas aisladas en los años posteriores a la vacunación presentarían una mayor diversidad genética, con presencia o ausencia de los clones de Rivera y Paysandú.

#### **X. 4. BIOGÉNESIS DE LA CUBIERTA Y SU RELACIÓN CON LA CAPACIDAD PATOGENICA EN BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS**

Alejandro Ureta, Departamento de Biología Molecular, Universidad de Princeton

La envoltura de bacterias gram-negativas esta formada por una membrana externa y una membrana interna separadas por un espacio acuoso (periplasma). En la membrana externa se localizan lipoproteínas y proteínas integrales (OMPs); estas últimas adoptan una estructura tridimensional tipo barril  $\beta$ . Además de cumplir un rol estructural (ej OmpA), las OMPs son determinantes en el fenotipo virulento de bacterias patogénicas al funcionar como autotransportadores, adhesinas, proteasas, canales de eflujo y como porinas (ej LamB), receptores, etc. Recientemente se ha identificado en *Escherichia coli* un complejo de proteínas de membrana externa encargado del ensamblado de las OMPs entre las que se encuentra la lipoproteína YfgL.

En su camino hacia la membrana externa, luego de atravesar la membrana interna las OMPs recorren el espacio periplásmico. En este compartimiento existen una serie de factores de plegamiento (ej SurA) involucrados en su biogénesis (transporte, plegado y ensamblado). Aunque se ha demostrado *in vitro* la interacción de algunos de ellos con las formas desplegadas de OMPs, la importancia de estos factores *in vivo* aun no se conoce en detalle. Para entender las funciones de alguna de estas proteínas de plegamiento, hemos estudiado los efectos de mutaciones en estos factores sobre la cinética del plegado y ensamblado de la porina LamB en *E. coli*. Análisis de pulse-chase mostraron que tanto SurA como YfgL son necesarias para el plegamiento de LamB. Sin embargo YfgL no es necesario para el plegamiento eficiente de OmpA lo que sugiere caminos diferentes para la biogénesis de distintas proteínas de membrana externa.

## X. 5. TECNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR APLICADAS AL ESTUDIO DE *Mycobacterium tuberculosis* EN URUGUAY.

González, S.<sup>1</sup>; Gadea, P.<sup>1</sup>; Mota, M.I.<sup>1</sup>; González, G.<sup>1</sup>; Rivas, C.M.<sup>2</sup>; Varela, G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dpto. de Bacteriología y Virología. Instituto de Higiene, Facultad de Medicina. Universidad de la República, Uruguay. E-mail: [bacvir@higiene.edu.uy](mailto:bacvir@higiene.edu.uy)

<sup>2</sup> Laboratorio de Bacteriología, Comisión Honoraria de Lucha Antituberculosa, Montevideo, Uruguay.

Pese a la disponibilidad de procedimientos diagnósticos y de tratamiento antimicrobiano específico, la Tuberculosis sigue siendo globalmente una causa importante de morbi-mortalidad, relacionada con la aparición de cepas de *M. tuberculosis* multirresistentes a antimicrobianos. Una forma de control eficaz de su diseminación, es identificarlas precozmente y realizar una terapéutica rápida y efectiva.

La mayoría de las cepas de *M. tuberculosis* resistentes a Isoniacida en el mundo, presentan la mutación Ser315Thr en el gen *katG*.

Localmente, aún no se ha establecido si esto es así; tampoco se han aplicado de rutina métodos de comparación genética entre diferentes cepas.

Los objetivos son, establecer la frecuencia de dicha mutación en cepas resistentes a Isoniacida y determinar su relación clonal utilizando 2 técnicas de laboratorio, PCR-RFLP y DRE-PCR, respectivamente. Además, comparar por DRE-PCR cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes con una posible recaída de la enfermedad y determinar contaminación cruzada intralaboratorio.

La PCR-RFLP (polimerase chain reaction-restriction fraction length polymorphism) se basa en la amplificación y digestión enzimática de secuencias genéticas específicas. La DRE-PCR (double-repetitive-element) es una técnica rápida que detecta secuencias genómicas repetidas, variables entre cepas de la misma especie.

Con respecto a la resistencia a Isoniacida, los ensayos preliminares realizados en nuestro laboratorio muestran hasta el momento, resultados diferentes a los descritos internacionalmente.

Es necesario continuar desarrollando estas técnicas para avanzar aún más en el conocimiento genético de las cepas locales de *M. tuberculosis*, lo cual redundará en un beneficio terapéutico y preventivo de la enfermedad

## **SIMPOSIO XI. GENÓMICA HUMANA**

### **XI. 1. PREDISPOSICIONES HEREDITARIAS A PADECER MELANOMA EN FAMILIAS URUGUAYAS**

Dra. Alejandra Larre Borges, Depto. Básico de Medicina, Facultad de Medicina.

El melanoma cutáneo es el cáncer cuya incidencia presenta la mayor tasa de crecimiento en el mundo. Su tasa de mortalidad no ha disminuido pese a las terapias costosas empleadas para su diagnóstico y tratamiento. Puede presentarse bajo dos formas: esporádica y hereditaria. Esta última incluye a individuos con alto riesgo de desarrollar melanoma, variando su prevalencia según la población estudiada. Nuestro trabajo tiene como objetivo general contribuir al conocimiento de las predisposiciones hereditarias a melanoma en Uruguay. Mediante la aplicación de un formulario de tamizaje empleado en una red de Policlínicas Dermatológicas de la mayor parte del país, se identificaron 14 familias con alto riesgo de padecer melanoma hereditario. Diecisiete pacientes integrantes de las mismas dieron su consentimiento informado para la investigación de mutaciones de línea germinal en CDKN2A y CDK4. La detección de cambios genéticos se realizó mediante la técnica PCR-SSCP (Polymerase Chain Reaction - Single Stranded Conformational Polymorphism). Los fragmentos con un patrón de bandas SSCP atípicos fueron analizados mediante secuenciación directa. Se identificaron 4 mutaciones en 9 pacientes. Describimos una nueva mutación en dos familias no consanguíneas, en el exón 2 de CDKN2A (E88X) portadoras de melanomas múltiples y Síndrome Familiar de Nevos Atípicos, con historia familiar de melanoma, y cáncer de páncreas. Esta mutación de línea germinal no ha sido descrita previamente en familias con melanoma. Las otras mutaciones identificadas ya han sido descritas. La frecuencia de mutaciones encontrada es superior a la documentada en estudios previos que utilizaron criterios de selección similar

## **XI. 2. APROXIMACIÓN MOLECULAR AL ESTUDIO DEL BAJO HDL**

Vital M.

Cátedra de Biología Molecular, Facultad de Química.

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 principal, constituyendo el 70 % de la masa proteica, de las partículas de HDL, y constituye uno de los candidatos principales para estudiar la variabilidad genética de los niveles de HDL.

Se seleccionaron 25 pacientes con hipoalfalipoproteinemia con valores de HDL colesterol (HDL-C) menores al valor de referencia (vr: 40mg/dL), referidos de la policlínica de Genética Cardiovascular del Hospital de Clínicas y se estudió la secuencia del gen candidato.

En una familia con aterosclerosis coronaria prematura encontramos, en la secuencia del exón 4 del gen de la ApoA1 un cambio G2006C , que conduce a un cambio en el codón 143 de Arginina a Prolina. Se trata de una mutación que involucra una arginina altamente conservada a nivel evolutivo y ubicada en un dominio fundamental para el metabolismo de estas partículas (sitio de activación de LCAT).

La mutación puntual encontrada no ha sido descrita en la literatura científica, y resulta un fuerte candidato como responsable de una hipoalfalipoproteinemia familiar con características de transmisión dominante.

### **I. 3. ANÁLISIS DE LA INCIDENCIA Y ROL PRONÓSTICO DE LAS MUTACIONES DEL GEN FLT3 EN LAS LEUCEMIAS AGUDAS MIELOBLASTICAS EN LA POBLACIÓN URUGUAYA.**

Dra. Virginia Costa Illanes

La leucemia mieloide aguda (LMA) es la leucemia mas frecuente en el adulto. Su respuesta al tratamiento y sobrevida global varían entre diferentes pacientes. El estudio cariotípico es uno de los factores pronósticos más importantes. Diferencia tres grupos pronóstico: favorable, intermedio y adverso.

La citogenética convencional no encuentra alteraciones cariotípicas en más de un 30% de los pacientes, asignándose al grupo de riesgo intermedio. Este grupo es heterogéneo, postulándose que otras alteraciones moleculares, participan en el pronóstico.

Datos recientes indican que aproximadamente el 20% - 30% de los pacientes con LMA, presentan mutaciones en el gen FLT3. Las mutaciones observadas en FLT3 consisten en duplicaciones internas en tandem (ITD) y en una mutación sin sentido, en el codón D835. Ambas producen la activación constitutiva del receptor tirosina kinasa codificado por este gen, y su detección se vincula con mal pronóstico. Actualmente, el FLT3 es el gen individual más comúnmente mutado en las LMA, con implicancia pronóstica y terapéutica. La detección de estas mutaciones cobra vital importancia con el desarrollo de péptidos inhibidores para el receptor, (actualmente en ensayos fase 1), como el inhibidor de proteínas tirosina kinasa STI571, altamente eficaz en la leucemia mieloide crónica

De encontrar resultados similares a los publicados hasta el momento, la detección de estas mutaciones permitirá una mejor estadificación y la utilización de tratamientos adaptados al riesgo del paciente.

#### **XI. 4. LA POBLACIÓN URUGUAYA EN EL CONTEXTO DEL MAPEO POR MESTIZAJE**

B. Bertoni

Depto. De Genética. Facultad de Medicina. Montevideo. Uruguay.

En la presente década ha tomado cada vez más relevancia el mapeo por mestizaje para detectar genes vinculados a una enfermedad de carácter multifactorial. En esta situación, el Uruguay se encuentra en una posición ventajosa, ya que se han realizado diferentes estudios sobre la estructura de la población. De estos estudios se desprende que la población uruguaya ha tenido aportes de las poblaciones europeas, africanas e indígenas. Estos aportes no son homogéneos, sino que se observa un mayor aporte indígena en Tacuarembó (20 %) y bastante menor en Montevideo (1%). Al analizar los aportes maternos se encuentra que reflejan una historia común a América Latina, donde la contribución materna indígena es mayor que la europea.

En el presente trabajo, analizamos una serie de SNPs y microsatélites del cromosoma Y en una muestra de varones de las regiones de Tacuarembó (90) y de Montevideo (52) para comprender como ha sido el aporte paterno a estas poblaciones, y el desarrollo de su pasado demográfico. Se observó que, tal como se esperaba, el aporte masculino europeo es mayoritario en cualquiera de las dos poblaciones. Con respecto al pasado demográfico se encontró que en ambas poblaciones se detecta un crecimiento expansivo. Al simular bajo diferentes condiciones se encontró que el crecimiento expansivo afecta las estimaciones de mestizaje y debería ser considerado en el momento de realizar los análisis en el marco de un estudio de mapeo por mestizaje.

## **XI. 5. RELEVANCIA DEL SPLICING ALTERNATIVO EN LA GENERACIÓN DE DIVERSIDAD DE UNA GLICOSILTRANSFERASA**

Felipe Trajtenberg

Laboratorio de Oncología Básica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina,  
Universidad de la República

La O-glicosilación tipo mucina es un proceso esencial en la vida celular y del organismo, participando desde el plegamiento de las proteínas secretadas o de membrana hasta procesos tan complejos como el desarrollo embrionario. Nuestro trabajo se ha centrado en una familia de glicosiltransferasas (la ppGalNAc-T) responsables del primer paso de esta vía biosintética, y especialmente sobre uno de sus miembros (ppGalNAc-T13) que podría estar asociada al proceso metastásico. Esta enzima se encuentra expresada en distintos tipos de cánceres, mientras que su expresión en tejidos normales está restringida principalmente a las neuronas. El clonado de la región codificante de la misma permitió descubrir un complejo patrón de variantes de splicings, de las cuales algunas podrían estar sujetas a una regulación por NMD (“decaimiento de mensajeros sin sentido”). Las alteraciones a nivel de las secuencias aminoacídicas pueden ser tan dramáticas como la eliminación del dominio catalítico o más sutiles como la sustitución de un motivo en el dominio lectina o de pequeñas deleciones. Sin embargo, estudios funcionales preliminares sobre algunas de estas nuevas proteínas revelaron que no todas presentan actividad frente a sustratos peptídicos derivados de mucinas. Asimismo, el análisis de la expresión de las mismas en un modelo de neuroblastoma reveló que algunas podrían estar relacionadas a un mayor potencial metastásico. Este trabajo revela lo que podría constituir un interesante modelo para estudiar la importancia del splicing alternativo en la generación de diversidad funcional.

## SIMPOSIO XII. OXIDANTES, ÓXIDO NITRICO Y FUNCIÓN PROTEICA

### XII. 1 Inactivación de aconitasa por óxido nítrico, peroxinitrito y nitrosotioles: mecanismos y relevancia biológica.

Verónica Tórtora, Celia Quijano, Rafael Radi y Laura Castro. Departamento de Bioquímica y Centro de Investigaciones Biomédicas en Radicales Libres, Facultad de Medicina, Montevideo, Uruguay.

La aconitasa mitocondrial (aconitasa<sub>m</sub>) contiene un centro ferrosulfurado ([4Fe-4S]) en su sitio activo que es rápida y selectivamente inactivado por superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) *in vitro* e *in vivo*. La relación aconitasa<sub>m</sub>inactiva/aconitasa<sub>m</sub>total ha sido utilizada para determinar el estado estacionario de O<sub>2</sub><sup>-</sup> en células. Modelos celulares y animales mostraron que la aconitasa<sub>m</sub> también se inactiva por óxido nítrico (·NO) y la proteómica con anticuerpos antinitrotirosina, reveló nitración de aconitasa<sub>m</sub>.

Utilizamos aconitasa<sub>m</sub> recombinante de corazón de chanco y determinamos los mecanismos y la cinética de inactivación mediada por ·NO y especies secundariamente derivadas como el nitrosoglutatión (GSNO) y el peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>). Concentraciones altas (no fisiológicas) de ·NO inhiben a la aconitasa<sub>m</sub> en ausencia de sustratos. La inhibición dependiente de ·NO se da en 2 pasos: tiempos cortos de incubación determinan una inhibición reversible competitiva con isocitrato (K<sub>I</sub>=35 μM), seguida por una inactivación irreversible (0.65 M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>). La inactivación mediada por GSNO en presencia o ausencia de sustratos es irreversible (0.23 M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>). El ONOO<sup>-</sup> reacciona con el centro [4Fe-4S] con una k=1.1x10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>. En presencia de CO<sub>2</sub>, el ONOO<sup>-</sup> rinde radical carbonato (CO<sub>3</sub><sup>-</sup>) que también inactiva a la aconitasa<sub>m</sub> (k=3x10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>). El ONOO<sup>-</sup> media la nitración de la aconitasa<sub>m</sub>, pero la nitración de la proteína no determina pérdida de actividad catalítica.

Utilizando las constantes cinéticas aquí determinadas y de la literatura, modelamos el rol que juegan estas especies en la inactivación de la aconitasa<sub>m</sub> *in vivo*, cuando se generan simultáneamente O<sub>2</sub><sup>-</sup> y ·NO. Si el ·NO se consume rápidamente (por difusión o reacción con blancos celulares) la inactivación de la aconitasa<sub>m</sub> aún refleja cambios en la producción (y estado estacionario) de O<sub>2</sub><sup>-</sup>; mientras que si el consumo de ·NO es menor, la inactivación de la aconitasa<sub>m</sub> refleja la formación de especies secundarias ya que la inactivación dependiente de CO<sub>3</sub><sup>-</sup> y de ONOO<sup>-</sup> se hace significativa.

## XII. 2. REACTIVIDAD CON OXÍGENO Y POTENCIAL REDOX DEL HEMO DE LA CISTATIONINA $\beta$ -SINTASA

**S. Carballal<sup>1,2</sup>, F. Zinola<sup>3</sup>, R. Banerjee<sup>4</sup>, R. Radi<sup>2</sup> y B. Alvarez<sup>1</sup>**

Laboratorios de <sup>1</sup>Enzimología y <sup>3</sup>Electroquímica Fundamental, Facultad de Ciencias; <sup>2</sup>Departamento de Bioquímica y Centro de Radicales Libres e Investigaciones Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; <sup>4</sup>Department of Biochemistry, University of Nebraska at Lincoln.

La enzima cistationina  $\beta$ -sintasa (CBS) cataliza la reacción de condensación de homocisteína y serina para formar cistationina en la vía de la transulfuración, que conduce a la formación de cisteína a partir de metionina. Deficiencias en la CBS se asocian con elevados niveles de homocisteína en plasma, lo cual constituye un factor de riesgo cardiovascular. La CBS humana contiene un cofactor piridoxal 5'-fosfato (PLP) esencial para la catálisis y un grupo hemo de función desconocida, coordinado con His65 y el tiolato de Cys52.

En este trabajo se purificó la variante trunca dimérica de la CBS recombinante humana y se exploraron las propiedades redox del hemo, su reacción con el oxígeno y la formación de especies reactivas. El potencial redox fue estimado por titulación potenciométrica como  $-0.25 \pm 0.07$  V a pH 7.4, en el rango del potencial reportado para otras proteínas hemo-tiolato. Mediante espectrofotometría de flujo detenido, se estudió la cinética de reacción entre el oxígeno y la CBS previamente reducida con ditionito de sodio, determinando una reoxidación de Fe(II)CBS a Fe(III)CBS sin especies intermediarias, con una constante de  $(1.03 \pm 0.01) \times 10^5$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> a pH 7.4 y 25 °C. Esta reacción dio lugar a la formación de superóxido, detectado mediante la oxidación de epinefrina y confirmado por su inhibición con superóxido dismutasa. La incubación de Fe(III)CBS con alícuotas de extracto de hígado de rata en presencia de FAD/FMN o NAD(P)H en anaerobiosis, no dio lugar a la reducción, sugiriendo que el hemo de la CBS no podría ser reducido por flavoproteínas. De existir la Fe(II)CBS *in vivo*, representaría una nueva fuente de generación de superóxido citosólica.

## **XII. 4. FORMACIÓN DE RADICALES LIBRES Y DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL EN LA PATOGÉNESIS DE LA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA (ELA).**

**Adriana María Cassina Gomez**

La Esclerosis Lateral Amiotrofica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa que se caracteriza por la muerte específica de motoneuronas y una fuerte reacción glial. La alteración de la producción energética y el daño oxidativo mitocondrial están involucrados en los mecanismos patogénicos de la ELA. La mutación G93A de la enzima Superóxido dismutasa-1 (SOD1) se asocia a formas familiares de la ELA y animales transgénicos para esa enzima mutada reproducen los síntomas humanos de la enfermedad. En las mitocondrias aisladas de medula espinal y de cultivos de astrocitos de ratas transgénicas que expresan la mutación SOD1<sup>G93A</sup>, disminuye el consumo de oxígeno produciéndose un desacople de la fosforilación oxidativa.

La preincubación de los astrocitos en cultivos con antioxidantes dirigidos a la mitocondria como la ubiquinona y el carboxy proxyl nitroxido unidos covalentemente con el catión trifenilfosfonio (MitoQ y Mito-CP respectivamente), también previenen de la disfunción mitocondrial producida por la mutación SOD1<sup>G93A</sup>.

Estos astrocitos transgénicos resultan un mal soporte trófico para la motoneurona comparados con los no transgénicos. Al tratarlos con antioxidantes se recupera la función mitocondrial y la capacidad de mantener la supervivencia de las motoneuronas. Por lo tanto la disfunción mitocondrial en los astrocitos es crítica sobre la supervivencia de las motoneuronas y quizás sea el blanco clave para evitar la progresión de la enfermedad.

## **XII. 5. PROTEINAS NITRADAS COMO AUTO-ANTIGENOS**

Leonor Thomson

Instituto de Quimica-Biologica, Facultad de Ciencias, Universidad de la Republica y Stokes Research Center, Children's Hospital of Philadelphia, UPENN.

Los procesos inflamatorios tanto agudos como crónicos se acompañan de la producción de especies altamente reactivas, capaces de oxidar, clorinar, y nitrar aminoácidos proteicos. Estos cambios proteicos post-traduccionales transforman proteínas autologas en potenciales inmunógenos. Nuestro objetivo fue demostrar que el grupo nitro puede actuar como hapteno, conduciendo al desarrollo de una respuesta inmune humoral, para lo cual exploramos la presencia de anticuerpos anti-nitrotirosina en el plasma de pacientes con el síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) y en pacientes portadores de enfermedad coronaria.

Con el fin de identificar las proteínas plasmáticas que se unen a 3-nitrotirosina se empleó cromatografía de afinidad. En el caso de los pacientes con SDRA la fracción aislada mediante cromatografía de afinidad consistió fundamentalmente en IgM, como se demostró mediante western blot y espectrometría de masa. En cambio IgG fue la proteína aislada del plasma de pacientes con enfermedad coronaria. Para valorar los anticuerpos anti-nitrotirosina presentes en el plasma de estos pacientes se desarrolló y validó un ELISA de competencia, con el que se comparó el título de anticuerpos en el plasma de pacientes portadores de SDRA ( $0.36 \pm 0.14$ , n=30) y enfermedad coronaria ( $0.31 \pm 0.19$ , n=443), con el presente en el plasma de controles sanos ( $0.05 \pm 0.05$ , n=321). Estos datos indican que la presencia de grupos nitro a nivel de tirosinas proteicas inducen la producción de inmunoglobulinas específicas, en procesos inflamatorios tanto agudos como crónicos.