



VII SIMPOSIO CEINBIO



CENUR Litoral Norte
Sede Salto

Comisión Técnico Mixta
Salto Grande

29/9 al 1/10 de 2022
Salto, Uruguay

LIBRO DE RESUMENES

Sesión de *Posters*

Efecto de las lesiones producidas por almacenamiento y estrés oxidativo en la membrana de glóbulos rojos para transfusión

López A.^{1,2}; Thomson, L.¹; Möller, M.²

¹Laboratorio de Enzimología, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, UdelaR; ²Laboratorio de Fisicoquímica Biológica, Instituto de Química Biológica,

Facultad de Ciencias, UdelaR

Los glóbulos rojos almacenados para transfusión sufren cambios progresivos que afectan la calidad y eficacia terapéutica del preparado. Estas alteraciones, conocidas como lesiones por almacenamiento, incluyen cambios bioquímicos y morfológicos, que conducen a la liberación de microvesículas alterando la membrana del glóbulo rojo. Estos eventos son inducidos al menos en parte por estrés oxidativo. El empleo de técnicas de leucorreducción en los países de la Unión Europea y en parte de los Estados Unidos ha disminuido la incidencia de reacciones adversas, sugiriendo que los leucocitos y sus mediadores serían los responsables. En Uruguay, sólo se leucorreduce el 15% de los volúmenes de glóbulo rojo transfundidos. Con el fin de colaborar en la instauración de políticas sanitarias tendientes a mejorar la provisión de esta importante herramienta terapéutica nos proponemos evaluar el efecto de la leucorreducción en concentrados de glóbulos rojos para transfusión. En este trabajo analizamos el efecto del almacenamiento sobre el estado de la membrana de glóbulos rojos, evaluando cambios en lípidos y proteínas de la membrana y el citoesqueleto, con especial énfasis en modificaciones oxidativas. También se analizó el efecto de la leucorreducción en la dinámica de liberación de microvesículas generadas durante el almacenamiento, estudiando su composición y propiedades.

Identificación de moléculas que alteran el ensamblaje de la cápside del VIH como potenciales fármacos antirretrovirales

Artía Z.¹; Randall LM.¹; Corvo I.¹; Álvarez G.¹

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

La cápside del VIH está formada por el ensamblaje de una única proteína viral (CA), que desempeña un papel esencial en pasos tempranos y tardíos de la infección. El ensamblaje correcto de la cápside es necesario para la infectividad del VIH. La alta conservación de la secuencia de aminoácidos de CA y su alta sensibilidad a las mutaciones evidencia su papel en el éxito del ciclo viral y apoya la investigación de moléculas capaces de interferir con la multimerización de CA como posibles fármacos antirretrovirales. En este trabajo se realiza una búsqueda mediante un cribado virtual masivo de moléculas capaces de interaccionar con la proteína CA, en particular con una región conservada de la superficie localizada en la interfase entre monómeros de CA. Esta región sensible a mutagénesis es fundamental para su correcta multimerización y su desestabilización podría alterar el ensamblaje de la cápside viral. A partir de los resultados obtenidos se seleccionaron 84 compuestos para analizar su capacidad de interferir con el ensamblaje *in vitro* de CA recombinante. Se realizó un ensayo a dosis fija de 50 μ M que identificó 30 moléculas con capacidad de inhibir o acelerar la multimerización de la CA en más del 50% con respecto al control. Para evaluar la actividad biológica de las moléculas se utilizó un modelo de infección por VIH *in cellulo*, mediante el cual se identificaron 4 compuestos que interfieren con la infección viral con valores de IC₅₀ entre 3 y 13 μ M. Estos resultados son la base para continuar el estudio y desarrollo de estas moléculas como posibles fármacos para el tratamiento de la infección por VIH.

VII SIMPOSIO CEINBIO

CENUR Litoral Norte
Sede Salto

Comisión Técnico Mixta
Salto Grande

29/9 al 1/10 de 2022
Salto, Uruguay

Acidez y nucleofilia de persulfuros

Benchoam D.^{1,2}; Cuevasanta E.^{1,2,3}; Möller M.N.^{2,4}; Alvarez B.^{1,2}

¹Laboratorio de Enzimología, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República; ²Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Universidad de la República; ³Unidad de Bioquímica Analítica, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República;

⁴Laboratorio de Fisicoquímica Biológica, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

Los persulfuros (RSSH/RSS⁻) están involucrados en procesos metabólicos y son considerados candidatos para la transducción de las señales del sulfuro de hidrógeno (H₂S), modulador de diversos procesos fisiológicos. Se caracterizó la formación del persulfuro de glutatión (GSSH) a partir de H₂S y glutatión disulfuro (GSSG) y se estudió su reactividad frente al electrófilo monobromobimano a distintos pHs. Se determinó la constante de velocidad independiente del pH ($k = (9.0 \pm 0.2) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) así como el pK_a del GSSH (5.45). Los estudios se extendieron a otros persulfuros de bajo peso molecular. Se obtuvieron valores de pK_a de 4.7-5.8 para los persulfuros de cisteína, homocisteína, cisteamina, cisteína metil éster y β-mercaptopropano. Los persulfuros resultaron ser especies más ácidas que los tioles (RSH) correspondientes, que poseen valores de pK_a de 6.5-9.6. Asimismo, el rango de pK_a de los persulfuros sugiere que los sustituyentes presentes en las moléculas tienen menor efecto en la acidez que en el caso de los tioles debido a la mayor distancia con el azufre ácido por la presencia del azufre adyacente. Se construyeron gráficos de Brønsted ($\log k$ vs pK_a) y se evidenció una nucleofilia acentuada en los persulfuros respecto a la esperada para los tioles de igual pK_a . Esto puede racionalizarse por el efecto alfa, el aumento de nucleofilia debido a un átomo adyacente con alta densidad electrónica. Actualmente se está investigando la acidez y nucleofilia de persulfuros en proteínas. Estos resultados contribuyen al entendimiento de la reactividad y el rol bioquímico de los persulfuros.

Cannabinoides inhiben la internalización de LDLox en la línea celular de macrófagos J774.1

Musetti, B.1; Martínez, G.1; Kun, A.2; Menchaca, D.3; Rodríguez-Haralambides, A.3; Varela, J.4; Moreira-Bahnson, E.5 y Thomson, L.1*

¹Laboratorio de Enzimología, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay-; ²Laboratorio Biología Celular del Sistema Nervioso Periférico-DPAN-IIBCE, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, Uruguay; CIBERNED-España-;

³Química Bioanalítica, Instituto Polo Tecnológico de Pando, Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay -; ⁴FOTMER life sciences, Parque de las Ciencias, Canelones, Uruguay -; ⁵Department of Cell Biology and Physiology, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC 27599, USA

Las enfermedades relacionadas con la ateroesclerosis son la primera causa de muerte en Uruguay y el mundo. Esta patología se caracteriza por la formación de placas ateromatosas en la capa íntima de arterias. Estas placas se componen de lípidos, células inflamatorias y del músculo liso, que en presencia de LDL modificada se transforman en células espumosas. Existen sólidas evidencias que relacionan la oxidación de la lipoproteína de baja densidad (LDLox) y la formación de las placas de ateroma. Nuestro grupo reportó previamente el efecto antioxidante de extractos de Cannabis sativa frente a la oxidación in-vitro de LDL mediada por Cu²⁺. Empleando microscopía confocal y espectroscopía de fluorescencia, observamos que tanto los extractos de Cannabis sativa como los fitocannabinoides aislados (THC, THCA, CBD, CBDA) inhiben la internalización de LDLox por macrófagos en cultivo. Tres extractos de cannabis con diferente composición relativa de cannabinoides (alta, intermedia y baja relación THC:CBD) mostraron valores similares de IC₅₀ (5 –12 µg/mL) al igual que los fitocannabinoides aislados (11-25 µM). Empleando inhibidores de los receptores canónicos de cannabinoides, CBR1 y CBR2, se observó una reversión parcial del efecto inhibitorio inducido por los extractos, indicando la participación de otras vías. Por su parte, el antagonista del receptor TRPV1 (AMG9810), produjo una disminución de la internalización de LDLox aun en ausencia de los extractos. Nuestros resultados refuerzan el potencial uso de fitocannabinoides para el desarrollo de alternativas terapéuticas para la ateroesclerosis. Actualmente estamos tratando de discernir los mecanismos moleculares detrás del efecto inhibitorio sobre la internalización de LDLox.

Efectos del flossing en el muslo

Schneider, C.K. ^{1,2}; Alzamendi, F.I. ^{1,3}; Silva, F. ⁴; Bonezi, A. ¹; Bona, R.L. ¹

¹Laboratorio de Investigación en Biomecánica y Análisis del Movimiento, Departamento de Ciencias Biológicas, CENUR L.N., UdelaR; ²Instituto Superior de Educación Física, CENUR L.N., UdelaR; ³Facultad de Medicina, CENUR L.N., UdelaR.
⁴Cirklo Health Education, Porto Alegre, Brazil.

Flossing es el uso de bandas elásticas que se envuelven de forma circular alrededor de las articulaciones y los tejidos. Estudios afirman los efectos beneficiosos, como aumento de: amplitud de movimiento, potencia, prevención y recuperación post ejercicio 1².

Objetivos: Comparar la temperatura local pre(TPreF) , post(TPostF) y post hiperemia(TPHipeF) de la aplicación del *flossing* y el efecto *sham* en hombres de entre 21 y 26 años activos.

Métodos: participaron 6 hombres, edad $24,4 \pm 1,7$ años, masa $74,45 \pm 9,28$ kg; estatura $1,73 \pm 0,05$ m, activos (más de 150 min). Después de la anamnesis, fue medida la TPreF (cámara termográfica - UNI-T UTi165K), aplicando el método *flossing*(140 mmhg) o *sham*(presión de 40 mmhg) de forma aleatoria con no más de una semana entre las dos. Método *flossing* incluye protocolo de cerca de 10 min (*screening hands off/hands on; wrapping; therapy; training-SWATT*)³. Luego fue tomada la medida de la TPostF. Cinco min posteriormente la TPHipeF. La presión del *flossing* fue medida a través de un esfigmomanómetro adaptado. ONE-WAY-ANOVA, *post hoc* de Turkey.

Resultados: Datos en media y desviación estándar. TPreF: $35,62 \pm 0,04$ °C, TPostF: $36,10 \pm 0,14$ °C, TPHiperF: $36,04 \pm 0,17$ °C, Anova $p \leq 0,00001$, TpreF X TPostF: $p = 0,0000053$, TPreF X TPHipeF: $p = 0,0013$.

Conclusión: El músculo en funcionamiento produce calor que facilita el metabolismo en términos de un bucle de retroalimentación positiva. Aumento de la temperatura en las extremidades, conduce a una viscoelasticidad significativamente mayor de la fascia. Por lo tanto, genera menor resistencia de la fascia, con aumento la amplitud de movimiento, posibilidad de transmisión de tensiones entre segmentos, mejor aprovechamiento de la energía elástica.

- 1.Kaneda et al. *Jsports scienc medic* 2020.
- 2.Schleip et al. Elsevier Health Sciences 2012.
- 3.Seifert et al. Meyer & Meyer Verlag 2016

VII SIMPOSIO CEINBIO

CENUR Litoral Norte
Sede Salto

Comisión Técnico Mixta
Salto Grande

29/9 al 1/10 de 2022
Salto, Uruguay

Identificación de compuestos químicos que bloquen la interacción Spike-ACE2

Lorenzelli, Franca ¹; Perelmuter, Karen ¹; Abreu, Cecilia ¹; Fagundez, Catherine ²; Posadas, Laura ²; Serra, Gloria ²; Alvarez, Guzmán ²; Villamil, Valentina ²; Saiz, Cecilia ²; Mahler, Graciela ²; Couto, Marcos ²; Cerecetto, Hugo ²; Porcal, William ²; Bollati Mariela ¹; Park, Soonju ³; Lee, Nakyung ³; Shum, David ³; Comini, Marcelo ¹; López, Virginia ¹.

¹ Institut Pasteur de Montevideo ² Universidad de la República ³ Institut Pasteur Korea

La adhesión, fusión y entrada del SARS-CoV-2 a las células huésped se da mediante la interacción de alta afinidad entre el dominio de unión al receptor de la glicoproteína Spike del virus y el dominio extracelular peptidasa de la proteína ACE2 expresada en células de tejidos humanos.

El objetivo de este trabajo fue la identificación de compuestos químicos capaces de interferir con la interacción Spike/ACE2, así como la caracterización de su citotoxicidad y actividad antiviral.

A partir de moléculas reportadas en la bibliografía como ligandos de Spike/ACE2, se detectaron moléculas estructuralmente análogas en la quimioteca local. De este primer conjunto de moléculas candidatas se estudió su potencial inhibitorio de la interacción Spike/ACE2 mediante técnica de ELISA. Esta primera ronda de cribado permitió identificar hits pertenecientes a diferentes familias químicas. Se continuaron los estudios de cribados para análogos de cada serie de hits. Para algunos de estos se pudo confirmar el efecto on-target mediante ensayos con células que expresan ACE2 humana. La gran mayoría de los compuestos presentó una baja citotoxicidad contra células de epitelio pulmonar humano y células de epitelio intestinal (CC50 >100 μ M). Por último, se testeó la actividad antiviral de algunos de los hits que presentaron mayor actividad inhibitoria contra Spike/ACE2. Unos pocos hits mostraron inhibir la infección de células Vero por SARS-CoV-2 (cepa Wuhan), los mismos también resultaron ser inhibidores de la principal proteasa viral (MPro).

Caracterización de la 3-mercaptopiruvato azufretransferasa de *Trypanosoma brucei brucei*

Gutiérrez M.V.¹; Cuevasanta E.^{2,3}; Comini M.¹; Bonilla M.¹

¹Laboratorio de Biología Redox de Tripanosomátidos, Institut Pasteur de Montevideo;

²Unidad de Bioquímica Analítica, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República; ³Laboratorio de Enzimología, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República

La 3-mercaptopiruvato azufretransferasa (MST) es una enzima que participa del metabolismo de azufre de las células, catalizando la transferencia de un átomo de azufre desde el 3-mercaptopiruvato hasta una molécula aceptora. El gen correspondiente se encuentra presente en eucariotas, al igual que en algunos procariotas. Su rol principal aún se desconoce, aunque se sabe que participa en distintas vías de relevancia fisiológica como en la producción de H₂S, la urmilación de proteínas y la tiolación de tRNAs. Este trabajo tuvo como objetivo caracterizar la MST del parásito *Trypanosoma brucei brucei* (*TbMST*). Los organismos del género *Trypanosoma* causan enfermedades en humanos y otros mamíferos, catalogadas como enfermedades tropicales desatendidas. Se caracterizó la forma recombinante de la *TbMST* por gel filtración y el radio hidrodinámico obtenido sugiere que la proteína presenta una conformación incompatible con un monómero globular. Empleando esta proteína se generó un suero anti-*TbMST* que permitió la caracterización de la forma endógena de la proteína en la forma infectiva del parásito, determinándose que ésta es poco abundante y de localización citosólica. Al regular a la baja la expresión de la *TbMST* mediante un sistema ARNi, se logró reducir eficientemente su expresión al 10%. Sin embargo, en las diferentes condiciones de cultivo *in vitro* ensayadas en este trabajo, no se observó un fenotipo diferencial. Esto podría deberse a que el remanente de enzima es suficiente para el crecimiento normal del parásito, o que la *TbMST* no sea una proteína esencial para su forma infectiva, al menos en condiciones *in vitro*.

Palabras clave: 3-mercaptopiruvato azufretransferasa; 3-mercaptopiruvato; *Trypanosoma brucei*.

VII SIMPOSIO CEINBIO

Comisión Técnico Mixta
Salto Grande

CENUR Litoral Norte
Sede Salto

29/9 al 1/10 de 2022
Salto, Uruguay

Rol del residuo Lys66 en la reducción de FAD por NADPH en glutatión reductasa humana

Bonanata J.

Laboratorio de Química Teórica y Computacional, Instituto de Química Biológica,
Facultad de Ciencias, y Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad de la
República

El glutatión es el principal antioxidante y capturador de electrófilos del medio intracelular. Por ello, es crucial mantener altos los niveles de la forma reducida del glutatión, función llevada a cabo por la glutatión reductasa (GR), flavoproteína de la familia de las flavoproteína disulfuro reductasas (FDRs), que cataliza la reducción de la forma oxidada del glutatión a su forma reducida con electrones provenientes del NADPH. El ciclo catalítico propuesto para la GR consta de las siguientes etapas: (a) reducción del FAD a FADH⁻ por NADPH; (b) reducción del disulfuro 63Cys-SS-Cys58, reoxidando al FAD; y (c) reducción de la forma oxidada del glutatión, regenerando el disulfuro. Estudios cristalográficos muestran un par Glu201:Lys66 —con análogos en otras FDRs— que se ha sugerido que tiene un rol catalítico, pudiendo actuar como un par iónico (dipolo) que guíe la etapa (a). En este trabajo se caracterizó esta etapa del ciclo catalítico de la GR mediante modelado QM/MM, considerando a Lys66 tanto en forma neutra como protonada. Los resultados arrojan valores de entalpía de activación a 298 K de 13.9 (Lys66 protonada) y 11.7 kcal/mol (Lys66 neutra), y valores de entalpía de reacción de 6.3 (Lys66 protonada) y -8.9 kcal/mol (Lys66 neutra). Estos resultados sugieren que en GR —y posiblemente en otras FDRs— el par Glu:Lys no es un par iónico, sino que el residuo Lys debe encontrarse en forma neutra para que tenga lugar la reducción de FAD a FADH.

Un nitroalqueno derivado del salicilato protege contra la obesidad inducida por dieta mediante la activación de la termogénesis dependiente de creatina.

Cal K.¹; Leyva A.²; Rodríguez-Duarte J.³; Ruiz S.¹; Colella L.³; Ingold M.³; Santos L.¹; Villaseca C.⁴; Galliusi G.³; Ziegler L.⁵; Bresque M.¹; Breining P.⁶; Dapueto R.⁷; Ribeiro T.⁸; Lopez A.⁹; Thompson K.L.⁸; Agorrody G.⁴; DeVallance E.¹⁰; Meadows E.¹¹; Camacho-Pereyra J.¹²; Valez V.¹³; Aicardo A.¹³; Contreras P.^{1,4}; Vendelbo M.H.^{6,14}; Jakobsen S.¹⁴; Kamaid A.²; Porcal W.^{3,15}; Calliari A.^{1,16}; Verdes J.M.¹⁷; Du J.¹⁸; Wang Y.¹⁸; Hollander J.M.¹⁹; White T.A.⁸; Radi R.¹³; Moyna G.⁹; Quijano C.¹³; O'Doherty R.²⁰; Kelly E.¹⁰; Duran R.²; Chini E.N.⁸; Lopez G.V.^{3,15}; Batthyany C.³; Escande C.¹

¹Laboratorio de Patologías del Metabolismo y Envejecimiento, Institut Pasteur de Montevideo-; ²Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas, Institut Pasteur de Montevideo; ³ Laboratorio de Biología Vascular y Desarrollo de Fármacos, Institut Pasteur de Montevideo; ⁴ Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República; ⁵Departamento de Ecología y Gestión Ambiental, Centro Universitario Litoral Este, Universidad de la República; ⁶Department of Biomedicine, Aarhus University Hospital, Denmark; ⁷Área I+D Biomédico, Centro Uruguayo de Imagenología Molecular (CUDIM), Montevideo, Uruguay; ⁸Robert and Arlene Kogod Center on Aging, Mayo Clinic, USA; ⁹Laboratorio de Fisicoquímica Orgánica, Departamento de Química del Litoral, Centro Universitario Regional Litoral Norte, Universidad de la República; ¹⁰ Department of Physiology and Pharmacology, School of Medicine, West Virginia University, USA; ¹¹ Mitochondria, Metabolism and Bioenergetics Working Group, School of Medicine, West Virginia University, USA; ¹²Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil; ¹³Centro de investigaciones Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República; ¹⁴ Department of Nuclear Medicine and PET, Aarhus University Hospital, Denmark; ¹⁵Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República; ¹⁶Unidad de Biofísica, Departamento de Biociencias, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República; ¹⁷Unidad Patología, Departamento de Patobiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República; ¹⁸Department of Ophthalmology and Visual Sciences, Department of Biochemistry, West Virginia University, USA; ¹⁹Division of Exercise Physiology, West Virginia University, USA; ²⁰Department of Medicine, Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Microbiology and Molecular Genetics; University of Pittsburgh, USA.

VII SIMPOSIO CEINBIO

Comisión Técnico Mixta
Salto Grande

CENUR Litoral Norte
Sede Salto

29/9 al 1/10 de 2022
Salto, Uruguay

La diabetes tipo II (DTII) relacionada con la obesidad ha aumentado drásticamente la morbimortalidad a nivel mundial. Estudios previos muestran que el antiguo fármaco salicilato tiene efectos beneficiosos en el tratamiento de enfermedades metabólicas en pacientes obesos y con DTII. Por otra parte, los ácidos grasos nitrados insaturados han evidenciado una protección significativa contra las consecuencias metabólicas de la obesidad, debido a la reactividad de su grupo funcional nitroalquenilo. Recientemente hemos demostrado que este grupo químico se puede reubicar de manera eficiente en diferentes andamios moleculares para conferir acciones biológicas emergentes. Aprovechando este concepto, sintetizamos un novedoso nitroalqueno derivado del salicilato al que llamamos SANA y nos propusimos evaluar su efecto funcional y metabólico en un modelo de obesidad inducida por dieta.

Para ello, se alimentaron ratones adultos C57BL/6J con una dieta rica en grasas durante 8-20 semanas, sin suplementar o suplementada con SANA (o Salicilato). Finalizado el tratamiento, se midió peso, consumo de alimentos, glucosa, insulina, leptina, triglicéridos, ácidos grasos libres, consumo de O₂ y CO₂. También se realizaron análisis histopatológicos de hígado y tejido adiposo blanco subcutáneo (scWAT) así como, análisis proteómicos, metabolómicos y de expresión de ARNm y respiración mitocondrial del scWAT. Nuestros resultados muestran que SANA previno la obesidad y revirtió las consecuencias metabólicas de la obesidad establecida, la hiperglicemia y la esteatosis hepática. Los análisis proteómicos, metabolómicos y de expresión de ARNm revelaron que SANA estimula el catabolismo, la respiración mitocondrial y la termogénesis del scWAT. De hecho, SANA estimula una vía termogénica dependiente de creatina recientemente descrita, mientras que la depleción de creatina anula los efectos impulsados por SANA. En conjunto, nuestros hallazgos revelan que SANA promueve la termogénesis dependiente de creatina y que dicha vía podría ser un blanco farmacológico adecuado para la prevención y el tratamiento de la obesidad.

VII SIMPOSIO CEINBIO

CENUR Litoral Norte
Sede Salto

Comisión Técnico Mixta
Salto Grande

29/9 al 1/10 de 2022
Salto, Uruguay

Aplicación de la metabolómica basada en RMN al estudio comparativo de parénquimas pulmonares de pacientes con COVID-19 y otras enfermedades respiratorias

López-Radcenco A.¹, Hurtado J.², Izquierdo-García J. L.³, Fajardo A.⁴, Rodriguez F⁵, Greif G.², Nin N.^{5,6}, y Moyna G.¹

¹Departamento de Química del Litoral, CENUR Litoral Norte, Universidad de la República, Paysandú 60000, Uruguay; ²Laboratorio de Interacciones

Hospedero-Patógeno - UBM, Instituto Pasteur de Montevideo, Montevideo 11400,

Uruguay; ³Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas, Facultad de

Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid 28040, España; ⁴Laboratorio de Virología Molecular, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias,

Universidad de la República, Montevideo 11400, Uruguay; ⁵Centro de Referencia

COVID 1, Hospital Español, Administración de los Servicios de Salud del Estado, Montevideo 11800, Uruguay; ⁶Centro de Referencia COVID 2, INNOT, Administración de los Servicios de Salud del Estado, Montevideo 11600, Uruguay

Dado que en general los patógenos causantes se esparcen fácilmente por el aire, las infecciones respiratorias tienen un impacto enorme a nivel global. Un ejemplo clásico es el *Mycobacterium tuberculosis*, responsable de las infecciones de tuberculosis (TB). Sin embargo, la pandemia desencadenada por el SARS-CoV-2 a fines del 2019 hicieron de este coronavirus uno de los patógenos respiratorios más importantes desde la influenza A, virus responsable de la Gripe Española de principios del siglo XX. Desde que se estableció que el COVID-19 es una enfermedad sistémica, muchos estudios han empleado un abordaje metabolómico para entender mejor su impacto en diferentes órganos. En este trabajo comparamos los perfiles metabólicos de parénquimas pulmonares de pacientes con COVID-19, tuberculosis, y otras neumonías utilizando espectrometría de ¹H RMN. Los análisis de OPLS discriminante y de STOCSY de la matriz de datos espectrales, en combinación con otros experimentos dereplicación química, nos permitieron establecer que los niveles de aminoácidos como valina, glicina, metionina, isoleucina, y alanina se asocian con infecciones con SARS-CoV-2.¹ Por otro lado, metabolitos como colina, betaina y lactato se asociaron con TB y otras neumonías.² Este constituye el primer estudio comparativo de alteraciones metabólicas en pacientes con infecciones agudas de COVID-19 y otras infecciones respiratorias realizado sobre tejido pulmonar. La interpretación de las diferencias observadas puede tener un impacto importante en el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento que apunten a reducir los síntomas y la severidad en pacientes en estado crítico.

1. Bruzzone, C.; Bizkarguenaga, M.; Gil-Redondo, R.; Diercks, T.; Arana, E.; García de Vicuña, A.; Seco, M.; Bosch, A.; Palazón, A.; San Juan, I.; Laín, A.; Gil-Martínez, J.;

VII SIMPOSIO CEINBIO

Comisión Técnico Mixta
Salto Grande

CENUR Litoral Norte
Sede Salto

29/9 al 1/10 de 2022
Salto, Uruguay

Bernardo-Seisdedos, G.; Fernández-Ramos, D.; Lopitz-Otsoa, F.; Embade, N.; Lu, S.; Mato, J. M.; Millet, O. *iScience* **2020**, 23, 101645.

2. Somashekar, B. S., Amin, A. G., Rithner, C. D., Troudt, J., Basaraba, R., Izzo, A., Chatterjee, D. *J. Proteome Res.* **2011**, 10, 4186-4195.

Desarrollo de un sensor genéticamente codificado para el monitoreo de 3-mercaptopiruvato, un metabolito vinculado a la señalización por H₂S

**Bonilla, M.^{1,2}; Oddone, N.¹; Benchoam, D.^{2,3}; Gutiérrez, M.V.¹; Alvarez, B.^{2,3};
Comini, M.A.^{1,2}; Cuevasanta, E.^{2,3,4}**

¹Laboratorio de Biología Redox de Tripanosomas, Institut Pasteur de Montevideo;

²Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Universidad de la República;

³Laboratorio de Enzimología, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República; ⁴Unidad de Bioquímica Analítica, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República

El sulfuro de hidrógeno (H₂S) es producido endógenamente por diversos organismos, donde cumple roles fisiológicos y como molécula señalizadora. Uno de los metabolitos involucrados en su biogénesis es el 3-mercaptopiruvato (3-MP), que es convertido a piruvato y H₂S por 3-mercaptopiruvato azufretransferasas (MSTs), quienes transfieren azufre mediante la formación de persulfuros intermedios.

En este trabajo diseñamos biosensores redox genéticamente codificados para monitorear al 3-MP en tiempo real, fusionando las MSTs de *Leishmania major* (*LmMST*) y *Arabidopsis thaliana* (*AtSTR1*) a la proteína redox fluorescente reportera roGFP2. La funcionalidad de estos biosensores fue evaluada en *Leishmania tarentolae*, tripanosomático modelo, no patógeno de humanos, que expresa proteínas recombinantes a altos niveles y alcanza densidades celulares elevadas, permitiendo caracterizar las líneas reporteras por citometría y fluorimetría. Ambos biosensores exhibieron niveles de expresión muy buenos y homogéneos, que no afectaron el crecimiento y que se mantienen en ausencia del antibiótico de selección. Para evaluar la respuesta al 3-MP, se agregó en forma exógena en combinación con digitonina para hacer posible su ingreso. La línea *LmMST*-roGFP2 exhibió una rápida e intensa oxidación del sensor, evidenciada por el cambio en la emisión relativa de fluorescencia al excitar a dos longitudes de onda de absorción del fluoróforo. Esta oxidación fue seguida de una rápida reversión, que refleja la reducción por los sistemas redox intracelulares. La respuesta de la línea *AtSTR1*-roGFP2 fue muy pobre. Asimismo, se determinó la capacidad de roGFP2 *in vitro* para reaccionar con *LmMST* en presencia de 3-MP. Estudios cinéticos de la oxidación de roGFP2 permitieron estimar las constantes de velocidad involucradas en el proceso.

VII SIMPOSIO CEINBIO

CENUR Litoral Norte
Sede Salto

Comisión Técnico Mixta
Salto Grande

**29/9 al 1/10 de 2022
Salto, Uruguay**

Próximamente, caracterizaremos la fusión *LmMST-roGFP2* *in vitro* y evaluaremos su funcionalidad en especies de *Leishmania* de relevancia biomédica y en líneas celulares de mamíferos derivadas de órganos y tejidos en los cuales se han sugerido roles pato-fisiológicos asociados al metabolismo del H₂S.

Inhibición de la tiorredoxina glutatión reductasa de *Echinococcus granulosus* por ácido nitrooleico

Sosa M.¹; Steglich M.¹; Turell L.¹

¹ Laboratorio de Enzimología, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

Los nitroalquenos derivados de ácidos grasos se forman *in vivo* y pueden administrarse de forma exógena. El ácido nitrooleico (NO₂OA) posee un centro electrofílico adyacente al grupo nitro, capaz de formar aductos de Michael reversibles con tioles, tales como cisteínas proteicas. Esta reacción sustenta, entre otras, las acciones antiinflamatoria y antioxidante de estos compuestos, en cultivos celulares y modelos animales. Es nuestra hipótesis que el NO₂OA también reacciona con selenocisteínas proteicas. En este trabajo se estudió su reactividad con una forma trunca de la selenoenzima tiorredoxina glutatión reductasa del parásito *Echinococcus granulosus* (*EgTGR*), que sólo posee el módulo tiorredoxina reductasa (*EgTR*). Las enzimas salvaje (*EgTR_{wt}*) y mutante (*EgTR_{U596C}*) se produjeron de forma recombinante en *E. coli* y se purificaron. Se midió la actividad enzimática utilizando ácido 5,5'ditiobis-2-dinitrobenzoico y NADPH como sustratos, siguiendo la formación del producto ácido 5-nitrobenzoico. Para *EgTR_{wt}* se determinó una *k_{cat}* ~330 veces más rápida que para *EgTR_{U596C}*. Para evaluar la reacción con NO₂OA se incubaron concentraciones fijas de *EgTR_{wt}* con concentraciones variables de NO₂OA, se tomaron alícuotas en el tiempo y se midió la actividad enzimática remanente. Se constató que el NO₂OA inhibe a la *EgTR_{wt}* con una cinética bifásica, lo que podría explicarse como la reacción del NO₂OA con dos residuos distintos de la enzima. De los ajustes se determinaron las constantes de la fase más lenta como *k_{on}* = (1.3 ± 0.1) × 10³ M⁻¹s⁻¹ y *k_{off}* = (9 ± 3) × 10⁻⁴ s⁻¹ (pH 7.4, 25 °C). Para confirmar si una de las fases corresponde a la reacción con la selenocisteína actualmente estamos evaluando la reacción con *EgTR_{U596C}* e intentando identificar los residuos involucrados por espectrometría de masa.

Efecto de polifenoles del aceite de oliva sobre la formación de ácidos grasos nitrados

Santos M.¹; Mastrogiovanni M.¹; Sanchez B.^{1,2}

¹CEINBIO; ²Departamento de Nutrición Básica, Escuela de Nutrición

El aceite de oliva es considerado un alimento funcional debido a la presencia en su fracción minoritaria de compuestos bioactivos que otorgan beneficios para la salud. Entre ellos destacan los polifenoles que se caracterizan por sus propiedades antioxidantes, antinflamatorias y anti-proliferativas. La concentración de los mismos en el aceite depende de multitud de factores como la variedad del olivo, la etapa de maduración del fruto entre otros. Por otro lado el aceite de oliva contiene de forma endógena compuestos citoprotectores y antioxidantes llamados ácidos grasos nitrados y que a su vez se potencian su formación tras la ingesta. El pH bajo del estómago y en presencia de nitrito proveniente de los alimentos promueve la generación de diferentes especies nitrantes responsables de nitrar a los ácidos grasos del aceite y generar así estos compuestos. El objetivo de este proyecto es evaluar el efecto de diferentes concentraciones de polifenoles de dos variedades contrastantes de olivos sobre la formación de ácidos grasos nitrados durante la digestión gástrica. Para ello se utilizó un aceite a base de ácidos grasos con una proporción equivalente a la del aceite de oliva sin componentes minoritarios. Este se sometió a una simulación gástrica en presencia de nitrito utilizando concentraciones crecientes de los polifenoles extraídos de las variedades Arbequina y Coratina, ambas en las etapas de maduración verde y envero. Tras el tratamiento se determinó oxidación lipídica y formación de ácidos grasos nitrados. En ausencia de polifenoles se observó la máxima oxidación mientras con la mayor concentración de polifenoles menor oxidación. Con respecto a la formación de los ácidos nitrados, esta se vio favorecida en la presencia de polifenoles.

Los polifenoles podrían proteger al aceite de oliva de la oxidación lipídica favoreciendo la nitración de ácidos grasos potenciando los efectos beneficiosos del consumo de aceite de oliva.

Estudio de variaciones en el metaboloma de pacientes con Endometriosis con y sin tratamiento mediante ^1H RMN

Bergalli L.¹, Llona J.D.¹, López-Radcenco A.¹, Germano G.², y Moyna G.¹

¹Laboratorio de Espectroscopía y Fisicoquímica Orgánica, Departamento de Química del Litoral, Facultad de Química, Universidad de la República, Paysandú, Uruguay;

²Centro de endoscopía y Policlínica especializada en la atención de pacientes con Endometriosis, Centro Hospitalario Pereira Rossell, Administración de los Servicios de Salud del Estado, Ministerio de Salud Pública

La endometriosis es una enfermedad crónica de etiología desconocida definida por la implantación y crecimiento benigno del tejido endometrial fuera del útero. El “patrón de oro” para su diagnóstico es la visualización directa de lesiones mediante laparoscopía, procedimiento invasivo e inapropiado para el seguimiento de pacientes. Se plantea el desarrollo de nuevos métodos no invasivos, rápidos, y de costo moderado capaces de diagnosticar la endometriosis desde el comienzo de los síntomas. Los métodos quimiométricos basados en espectroscopía de ^1H RMN de muestras biológicas de fácil acceso, sangre y orina, son una alternativa con enorme potencial, y desarrollarlos es un objetivo de este proyecto. Debido a la variación en los tratamientos recibidos, y para evaluar el alcance y robustez de la metodología, comparamos muestras de pacientes tratadas con el fármaco dienogest ($n=24$), pacientes sin tratamiento actual ($n=15$), pacientes que nunca recibieron tratamiento ($n=16$), y voluntarias sanas ($n=24$). Se obtuvieron los perfiles de ^1H RMN de muestras de suero mediante experimentos CMPG con presaturación de agua y análisis estadísticos multivariados, incluyendo análisis de componentes principales (PCA) y regresiones de mínimos cuadrados parciales (OPLS-DA). La comparación de datos de enfermos con individuos sanos indica una clara diferenciación, independiente de los tratamientos farmacológicos. Un estudio de los valores de carga del OPLS-DA permitió correlacionar al colesterol, VLDL, LDL y lactato con los individuos sanos, y NAc-colina, NAc-glucosamina y acetooacetato, con los individuos enfermos. El análisis no permite discriminar pacientes bajo distintos tratamientos, lo que nos habla de la robustez e independencia del método para calificar a las pacientes enfermas. Se obtuvo un modelo preliminar que permitiría diagnosticar a las pacientes con endometriosis, independientemente del tratamiento recibido. A futuro se pretende elaborar un modelo paramétrico que será evaluado en muestras de pacientes con sospecha de la enfermedad que están a la espera de una laparoscopía.

VII SIMPOSIO CEINBIO

CENUR Litoral Norte
Sede Salto

Comisión Técnico Mixta
Salto Grande

29/9 al 1/10 de 2022

Salto, Uruguay

Diabetes y locomoción

Gianneechini G.¹; Biancardi C.¹; Bona R.¹;

¹Filiación: LIBiAM, Dep. Ciencias Biológicas, CENUR L.N, Universidad de la República, Paysandú

La diabetes es una enfermedad crónica que conduce a cambios sensoriales y motores. Tales cambios comprometen la marcha y el equilibrio predisponiendo a sus portadores a un mayor riesgo de caídas. Se ha sugerido que las alteraciones de la marcha observadas en esta población podrían ser responsables de un mayor gasto energético (GE). Este aumento del GE, se puede relacionar en gran medida con una menor respuesta en ciertos músculos de ambos miembros inferiores. Este proyecto tiene como objetivo analizar, mediante un abordaje electrofisiológico, metabólico y cinemático, la marcha en personas con diabetes tipo 2. La muestra se encuentra formada por un grupo de personas entre 65 y 74 años de edad con diabetes tipo 2 y un grupo de control (sin la patología). El protocolo incluye pruebas a 5 velocidades sobre una cinta caminadora, calculadas a partir de la velocidad autoseleccionada de cada sujeto. Se utiliza un sistema de captura del movimiento; un electromiógrafo para monitorear 10 músculos y un analizador de gases portátil. Sabiendo que dentro de las complicaciones microvasculares de la diabetes se encuentra la polineuropatía simétrica; previo a la realización de la prueba en cinta caminadora, se hace un abordaje clínico donde se evalúa el grado de neuropatía mediante el análisis de la "Sensibilidad protectora" del sujeto en ambos miembros inferiores. Esto se lleva adelante por medio de la utilización del "test de monofilamentos Semmes-Weinsten 10g".

Los resultados podrán determinar grandes avances en el estudio de los determinantes y modelos de control motor en la locomoción humana, y brindar aportes importantes en áreas como la rehabilitación clínica con el fin de ayudar al sujeto en la economía de la marcha.

Diseño y caracterización de un biosensor de lipoperóxidos basado en GFP

Oddone N.¹; Bonilla M.¹; Ferrer Sueta G.²; Comini M.¹

¹Laboratorio de Biología Redox de Tripanosomas, Institut Pasteur de Montevideo, Mataojo 2020, Montevideo CP 11400, Uruguay; ²Laboratorio de Fisicoquímica Biológica, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo 11400, Uruguay

Los lipoperóxidos (LOOH) son especies reactivas que derivan de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) iniciada por radicales hidroxilo/peroxilo. Para los LOOH se han descrito roles como señalizadores celulares con actividad anti-inflamatoria y pro-inflamatoria. Un desequilibrio entre la generación y detoxificación de estas especies puede conducir al daño irreversible de macromoléculas y membranas celulares. Las glutatión peroxidases y ciertas tiol-peroxidases contribuyen a su descomposición.

En la actualidad, no existen métodos (bio)químicos que permitan detectar y cuantificar a los LOOH de manera dinámica y con resolución espacio-temporal. Esta necesidad, sumada a la demostrada funcionalidad de biosensores codificados genéticamente basados en formas redox sensibles de la proteína fluorescente verde (roGFP), nos estimularon a desarrollar un biosensor GFP con especificidad por LOOH.

Como módulo sensor seleccionamos a una tiol-peroxidasa de *T. brucei* con alta sensibilidad por LOOH, y como módulo reportero elegimos a la roGFP2, cuyo espectro de fluorescencia se modifica de manera radiométrica dependiendo del estado redox de un par de cisteínas expuestas al solvente. Esta propiedad de la roGFP2 cancela las interferencias por diferencias en niveles de expresión del biosensor o variaciones fisiológicas del pH en una población celular.

La funcionalidad y especificidad por LOOH (ej. del ácido araquidónico, cumano y tertulito) de la forma recombinante del biosensor fueron verificadas mediante ensayos cinéticos convencionales y de flujo detenido. Se determinaron las constantes de reacción de varias de las etapas que involucran la oxidoreducción del biosensor. La expresión estable y transitoria del biosensor de LOOH en *Leishmania tarentolae* y en hepatocitos humanos (línea celular HepG2), respectivamente, permitió confirmar la especificidad sensibilidad y reversibilidad de respuesta del mismo a concentraciones fisiológicas de LOOH.

El nuevo biosensor presenta un gran potencial para el estudio no invasivo e *in situ* del rol del metabolismo de LOOH en diferentes modelos patofisiológicos.

VII SIMPOSIO CEINBIO

Comisión Técnico Mixta
Salto Grande

CENUR Litoral Norte
Sede Salto

29/9 al 1/10 de 2022
Salto, Uruguay

Nuevos parámetros de Lennard-Jones para cisteína y selenocisteína en el campo de fuerza AMBER

**Andresa Messias^{1,2}; Federico Pedron^{1,2}; Ari Zeida³; Adrián Roitberg⁴;
Darío Estrin^{1,2}**

¹Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física; ²CONICET- Universidad de Buenos Aires. Instituto de Química-Física de los Materiales, Medio Ambiente y Energía (INQUIMAE). Buenos Aires, Argentina; ³Departamento de Bioquímica and Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; ⁴Department of Chemistry, University of Florida, Gainesville, Florida, USA.

La cisteína es un aminoácido con un papel preponderante en la bioquímica redox. La selenocisteína es el aminoácido número 21, presente sólo en 25 proteínas humanas. La sustitución de Cys por Sec se ha interpretado como una estrategia evolutiva para obtener una proteína más reactiva o resistente a la sobreoxidación. Sin embargo, en el contexto de las simulaciones clásicas de dinámica molecular, los parámetros apropiados para las moléculas derivadas de cisteína y selenocisteína siguen siendo escasos y carecen de una validación adecuada para simulaciones. Además, el uso de parámetros estándar del campo de fuerza AMBER da como resultado una descripción deficiente de la solvatación alrededor del anión tiolato, debido al hecho de que AMBER carece de parámetros específicos de Lennard-Jones (LJ) para el azufre del tiolato. Para las especies que contienen selenio, los parámetros son aún más escasos. Para dar respuesta a este problema, en este trabajo presentamos una metodología para obtener los parámetros de LJ para cisteína y selenocisteína en diferentes estados de oxidación y protonación, ajustando los mismos para reproducir las distribuciones de la función radial soluto-agua, obtenidas por dinámica molecular ab initio DFT (AIMD). Hemos desarrollado con éxito un nuevo conjunto de parámetros de LJ para especies derivadas de cisteína y selenocisteína fisiológicamente relevantes, y evaluamos el impacto de la nueva parametrización en simulaciones MD clásicas de proteínas representativas que contienen residuos catalíticos de cisteína/selenocisteína. Observamos que hay cambios significativos en la estructura y dinámica de la proteína dependiendo de los parámetros elegidos, afectando especialmente a los residuos vecinos en los sitios catalíticos.

VELOCIDAD AUTOSELECCIONADA DE MARCHA EN EMBARAZADAS

Racedo A¹⁻²; Biancardi C.²; Bonezi A.²; Bona RL,²

¹ Instituto Superior de Educación Física. Centro Universitario Regional (CENUR) LitoralNorte -Paysandú. Universidad de la República, Uruguay -; ² Laboratorio deInvestigación en Biomecánica y Análisis del Movimiento. CENUR LitoralNorte - Paysandú. Universidad de la República, Uruguay.

Los cambios estructurales pueden alterar el desarrollo biomecánico de la marcha en las embarazadas. El objetivo de este estudio fue comparar la velocidad autoseleccionada de marcha (VAS), con la velocidad óptima a través del cálculo del numero de Froude (nFr= índice de rehabilitación para obtener la velocidad óptima - con menos gasto metabólico de marcha en relación al largo del miembro inferior-). Participaron: 13 embarazadas 1er trimestre (Tr), 16 en el 2do, 18 en el 3ero y 15 controles. El protocolo consistió en realizar una caminata en un pasillo de 15 metros a la velocidad más confortable (tres intentos que se promediaron); 1°Tr $3,63 \pm 0,36$, 2°Tr $3,8 \pm 0,4$, 3°Tr $3,64 \pm 0,63$, Controles $4,67 \pm 0,44$ (velocidad km/h). Luego se realizó el cálculo del nFr: 1°Tr $5,22 \pm 0,12$, 2°Tr $5,2 \pm 0,2$, 3°Tr $5,23 \pm 0,14$, Controles $5,17 \pm 0,11$ (km/h). Para comparar las velocidades y nFr intra-grupos fue utilizado ANOVA de un factor y para la comparación entre grupos Test-T para variables independientes (Post Hoc de Bonferroni). En los resultados obtenidos no se encontró diferencia significativa ($p < 0,05$) para la VAS suelo entre los trimestres ($p = 0,763$), pero si al comparar cada grupo con los controles ($p = 0,00000005$). No se encontró diferencia entre los nFr calculados ($p = 0,72$). Si se encontró diferencias entre la VAS suelo y el nFr para los grupos de las embarazadas: 1° ($P = 1,4E-13$), 2° ($4,31E-14$), 3° ($2,11E-12$). Como primeras conclusiones se puede determinar que la VAS de las embarazadas no coincide con su velocidad óptima de marcha, aumentando el costo de transporte generando un mayor gasto energético para caminar.

OSEOINTEGRACIÓN ALTERADA EN CONDICIONES DE HIPERGLICEMIA Y ROL DEL ESTRÉS OXIDATIVO

Suárez M.C.^{1,2}; Rinaldi M.²; Valez V.^{1,2}; Radi R.¹

¹Centro de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Medicina Universidad de la República -; ²Cátedra de Bioquímica y Biofísica, Facultad de odontología, Universidad de la República

La oseointegración de los implantes dentales puede estar afectada en condiciones de hiperglicemia, siendo la Diabetes Mellitus una contraindicación relativa para su implantación. La patología ósea diabética se debe en gran medida a un estado de estrés oxidativo mediado por la hiperglicemia. Sin embargo, los mecanismos moleculares involucrados no se han dilucidado, siendo los resultados hasta contradictorios. Además, hay evidencia de que los osteoblastos proliferantes desvían el metabolismo energético hacia la fermentación láctica similar al efecto Warburg, con lo cual el rol de la mitocondria en este proceso también es controversial. También es importante aclarar el involucramiento de las citoquinas pro-inflamatorias en la producción de oxidantes y cómo afecta la diferenciación y proliferación de osteoblastos en condiciones de hiperglicemia, así como analizar los parámetros relacionados a la oseointegración en estas condiciones, como son la adhesión y migración celular. **Objetivos:** Estudiar el rol del estrés oxidativo en la alteración de la diferenciación celular hacia el linaje osteoblástico, evaluando marcadores de oseointegración y función mitocondrial, en condiciones de hiperglicemia y en un estado pro-inflamatorio *in vitro*. **Métodos:** Se utilizó un modelo celular de hiperglicemia e inflamación con la línea celular de pre-osteoblastos MC3T3-E1 cultivados en condiciones de normoglicemia e hiperglicemia, con y sin citoquinas pro-inflamatorias. Se analiza la diferenciación celular hacia el linaje osteoblástico. Para la detección de la formación de oxidantes se utilizaron sondas fluorescentes como la DCF-DA. Además, la funcionalidad mitocondrial se evalúa a través de un analizador metabólico y del potencial de membrana mitocondrial mediante microscopía y citometría de flujo. **Resultados Preliminares:** La hiperglicemia y la presencia de interleuquina-1 β disminuyen la producción de colágeno y calcio en el medio. También hay una mayor producción de oxidantes y daño mitocondrial que empeora en presencia de citoquinas.

Análogos del ebsulfur alteran la homeostasis redox de los tripanosomátidos

Cristina Quiroga¹, Marcelo Incerti², Diego Benítez¹, Eduardo Manta²,
Marcelo Comini^{1,3#} y Andrea Medeiros^{1,3#}

¹ Laboratorio de Biología Redox de Tripanosomas. Institut Pasteur de Montevideo. ² Cátedra de Química Farmacéutica. DQO, Facultad de Química, Udelar, Montevideo, ³ Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Udelar, Montevideo

La tripanosomiasis y la leishmaniasis tienen un gran impacto en la salud humana y animal a nivel global. Los tratamientos disponibles tienen grandes limitaciones relativas a su eficacia, costos y toxicidad. Esto justifica el interés académico en aportar conocimiento y desarrollar herramientas que contribuyan al proceso de descubrimiento y caracterización de fármacos contra estas enfermedades. Tomando como referencia al ebselen (EbSe) y su análogo azufrado, el ebsulfur (EbS), los cuales fueron descritos como inhibidores covalentes de la tripanotión sintetasa (TryS) y tripanotión reductasa (TR), enzimas claves en el metabolismo redox de tripanosomátidos, nos propusimos sintetizar y caracterizar a nivel bioquímico y biológico nuevos análogos del EbS. El % de moléculas bioactivas (*hit* *Trypanosoma* = EC₅₀ ≤ 10 μM, *Leishmania* = EC₅₀ ≤ 25 μM) contra las formas infectivas de cada especie fue: 91% *T. brucei* > 22% *T. cruzi* >> 4% *L. infantum*. Esto se correlaciona directamente con la tasa proliferativa de cada una de las especies y estadios de estos parásitos. Uno de los *hits* afectó la proliferación de estos tres patógenos, y la administración de uno de ellos a ratones infectados con *T. brucei*, controló parcialmente de la infección. Todos los *hits* resultaron poco citotóxicos presentando en algunos casos mejor selectividad que las moléculas de referencia (EbS y EbSe). Ensayos con líneas redox-reporteras de *T. brucei* y *L. infantum* indican que varios de los compuestos inducen un desbalance redox intracelular. Contradicidiendo los antecedentes para el EbSe y EbS, ninguno de los nuevos derivados inhibió a la TryS en el orden de los compuestos de referencia. Dos de los compuestos presentaron inhibición de la TR del orden del EbS. Estos resultados aportan nuevas moléculas con destacada actividad y selectividad contra estos patógenos, y alientan a extender los estudios de modo de acción a otros posibles blancos moleculares.

Rol de las modificaciones oxidativas en la proteína alfa-sinucleína

Ivagnes R.¹; Chavarría C.¹; Piñeyro DM.^{1,2}; Zeia A.¹; Mastrogiovanni M.¹;
Ríos N.¹; Souza JM.¹

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina y CEINBIO, Udelar -;

²Laboratorio de interacciones hospedero-patógeno, Unidad de Biología Molecular,
Institut Pasteur de Montevideo.

Las sinucleinopatías son un grupo de trastornos que se caracterizan por la presencia de agregados fibrilares, siendo la proteína alfa-sinucleína (aS) el principal componente. aS es una proteína presináptica, perteneciente al grupo de proteínas intrínsecamente desordenadas. En condiciones patológicas, en presencia de peroxinitrito (ONOO⁻), sufre modificaciones oxidativas, tales como la nitración de tirosinas y oxidación de metioninas. Nuestro interés radica en estudiar cómo estas modificaciones afectan los fenómenos de formación de oligómeros y fibras de aS. En este trabajo construimos formas mutantes de aS, que presentan un único residuo de tirosina, así como un mutante sin tirosinas. Los mutantes fueron caracterizados por diversas técnicas (CD, DLS). Utilizando el tratamiento con ONOO⁻ en bolo como modelo de nitración *in vitro*, se estudió el rol de los residuos de tirosina, y su contribución en la agregación de aS, comparando las formas *wt* y mutantes tratadas. Se vio que el tratamiento con ONOO⁻ inhibe la formación de fibras tanto para aS *wt*, así como para los mutantes. Esta inhibición no es debida a un efecto de carga (la nitración de tirosina disminuye su pK_a), ya que a pH ácido se mantiene la inhibición observada. Este tratamiento genera, además, metionina sulfóxido, por lo que, para discriminar el efecto de esta oxidación, utilizamos un agente selectivo para la formación de 3-nitrotirosina, el 1,5-metil-1,4-dinitroimidazol (DNI). Utilizando DNI se confirmó por espectrometría de masa la aparición de especies +180 Da (correspondientes a 4 tirosinas nitradas), así como la ausencia de metioninas oxidadas, y se evaluó esta modificación en la agregación de aS para la proteína *wt* y un mutante sin tirosinas. Este trabajo contribuirá al estudio del rol de las modificaciones postraduccionales de aS y su contribución a la formación de agregados fibrilares, los cuales son importantes en la patología neurodegenerativa.

Glutatión transferasas humanas catalizan la reacción entre el ácido nitrolinoleico conjugado y glutatión

Steglich M.¹; Salvatore S.²; Schopfer F.²; Alvarez B.¹; Turell L.¹

¹Laboratorio de Enzimología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay; ²Department of Pharmacology and Chemical Biology, School of Medicine, University of Pittsburgh, United States

Los nitroalquenos derivados de ácidos grasos se forman *in vivo* y modulan respuestas celulares mediante reacciones de adición de Michael con tioles proteicos. El ácido nitro-linoleico conjugado (NO₂CLA) se forma preferencialmente *in vivo* e *in vitro*, generando mayoritariamente los isómeros 9- y 12-NO₂CLA. Estos reaccionan con tioles de bajo peso molecular en dos sitios electrofílicos (carbonos β y δ), dando lugar a cinéticas bifásicas con formación de dos productos, los aductos en β y δ (Turell, Vitturi, JBC, 2017). Para continuar caracterizando la química biológica de este nitroalqueno se evaluó si su reacción con glutatión (GSH) es catalizada por glutatión transferasas humanas (GST). Se ensayaron cinco isoformas de GST mediante espectrometría de masas monitoreando la formación de producto (NO₂CLA-GSH, MRM: 633.300/504.200). Se observó catálisis para una GST de tipo mu (GST M1) y una alfa (GST A4). Además, se observó la formación de un nuevo producto en presencia de enzima que no se observa para la reacción espontánea. El análisis cinético (2 mM GSH, 10 μ M 9- o 12-NO₂CLA, 25 °C, pH 7.4) mostró que GST A4 acelera ambas fases de manera similar en presencia de 9-NO₂CLA (6×10^6 M⁻¹ y 7×10^6 M⁻¹ para la primera y segunda fase, respectivamente) observándose valores similares para 12-NO₂CLA. Con GST M1 la primera fase se aceleró 14 veces más que la segunda (3.9×10^5 M⁻¹ versus 5.5×10^6 M⁻¹) cuando se utilizó 9-NO₂CLA y 40 veces más con 12-NO₂CLA (1.1×10^5 M⁻¹ versus 4.3×10^6 M⁻¹). Actualmente estamos realizando experimentos de HPLC UV-Vis para identificar los productos. La existencia de catálisis por parte de GSTs es de relevancia ya que la formación de aductos con GSH es uno de los principales mecanismos de inactivación de NO₂CLA y tendrá por lo tanto un impacto en sus acciones señalizadoras.

Evaluación de la viabilidad de queratinocitos humanos tratados con glifosato, arsénico o UVA

Gabrielli A.; Peluffo R. D., Keszenman D.J.

Laboratorio de Radiobiología Médica y Ambiental, Grupo de Biofisicoquímica, Dpto. de Ciencias Biológicas. CENUR Litoral Norte, Udelar, Salto, Uruguay

La actividad agropecuaria en Uruguay constituye un pilar de la economía del país que conlleva al uso de agroquímicos para mejorar la producción. Estos productos pueden causar efectos en la salud humana por exposición ocupacional, accidental y/o ambiental. Entre estos se destacan las formulaciones en base a glifosato cuyos componentes pueden incluir arsénico (As). Además, las personas pueden exponerse a trazas de contaminantes del agua (entre ellos As) y a la radiación ultravioleta (~95%UVA). Dada la relevancia de los potenciales efectos en la salud de estos agentes proponemos estudiar los efectos biológicos de glifosato, As y UVA como agentes únicos y sus combinaciones. Se determinó la viabilidad celular por ensayo de MTT en función de la dosis de los agentes aislados y el tiempo de exposición en un modelo *in vitro* de queratinocitos humanos. Los cultivos de células HaCaT fueron expuestos a glifosato (0-10 mM) o As⁺⁵ (0-2000 µg/L). Para la exposición a UVA (0-30J/cm²) se utilizó un irradiador Bio-Sun++. El curso temporal de las respuestas a glifosato o As⁺⁵ se evaluó entre 4-72 h. El tratamiento con glifosato disminuyó significativamente la viabilidad celular a partir de 0,05 mM para una exposición de hasta 48 h, con una curva dosis-respuesta de dos componentes. La respuesta de viabilidad a [Glifosato]=5 mM (próxima a la concentración recomendada en la agricultura) no varió luego de las 24 h de exposición. El tratamiento con [As⁺⁵]>100 µg/L disminuyó la viabilidad en función de la dosis y del tiempo de exposición, no observándose efecto a concentraciones menores. Para el UVA se observó una disminución lineal de la viabilidad con una pendiente de 1,89% de letalidad por unidad de fluencia. Estos resultados representan un avance fundamental para establecer las condiciones de tratamiento combinado en el estudio de las interacciones de tipo sinérgico o aditivo de estos agentes.

Sustancias Bioactivas de *Vitis vinifera* L. cv. Tannat: Aislamiento, Biodisponibilidad y Actividad Biológica de Compuestos Galoileados

V. Araújo^{1,2,3}, M. Mastrogiovanni^{1,2}, C. Chavarría^{1,2}, A. Aicardo^{1,2,4},
F. Carrau^{1,2,5}, R. Radi^{1,2}

¹ Departamento de Bioquímica, ² Centro de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Medicina; ³ Departamento de Alimentos, ⁴ Departamento de Nutrición Clínica, Escuela de Nutrición ; ⁵ Enología y Biotecnología de las Fermentaciones, Departamento de Ciencia y Tecnología Alimentos, Facultad de Química Universidad de la República

Vitis vinifera L. cv Tannat es considerada la variedad insigne del Uruguay y estos cultivos han impulsado las exportaciones de la industria vitivinícola nacional. El consumo moderado de vino tiene efectos beneficiosos sobre la salud y, en particular, el vino Tannat ha sido correlacionado con longevidad y salud cardiovascular. El orujo es un subproducto del proceso de vinificación compuesto por piel y semillas. Las semillas de *Vitis* Tannat han sido destacadas por su elevado contenido de taninos. Se evidenció que esta variedad presenta alta expresión de epicatequina galoil transferasa, enzima responsable de la reacción de galoileación, por lo tanto, presenta de forma distintiva a otras variedades, un elevado contenido de flavan-3-oles galoileados. Si bien la ingesta de catequinas está asociada a una mejora en la función endotelial y la salud cardiovascular, las catequinas galoileadas podrían explicar efectos diferenciales vinculados al vino Tannat. Dado esto, se propuso evaluar el impacto de la galoileación sobre la actividad biológica de flavan-3-oles de *Vitis vinifera* L. cv. Tannat. Con ese objetivo, se caracterizaron y cuantificaron flavan-3-oles en el orujo Tannat y se estudiaron algunos de los posibles efectos biológicos de estos compuestos. Por un lado, en cultivos de macrófagos se encontró que las catequinas podrían disminuir la producción de radical anión superóxido y que este efecto podría ser mayor para las formas galoileadas. Por otro lado, en células endoteliales se evidenció que el tratamiento con flavan-3-oles galoileados, resultó en una mayor protección frente a flujos de oxidantes generados endógenamente. En conclusión, el orujo de *Vitis* Tannat representa una potencial fuente de flavan-3-oles galoileados, cuya actividad biológica podría ser mayor que la de sus formas no galoileadas, explicando efectos diferenciales de esta variedad.

Palabras clave: *Vitis vinifera* L. cv. Tannat, polifenoles, flavan-3-oles, epicatequina, catequina, epicatequina galoileada, compuestos galoileados, orujo.

NADH-Fumarato Reductasa de *T. cruzi* (*TcFR*): predicción de su estructura 3D e interacción con nuevos inhibidores [Ru^{II}(dppf)(mpo)L]

Coitiño E. L.¹; Salazar, F.¹; Scalese, G.²; Gambino, D.²

¹Laboratorio de Química Teórica y Computacional (LQTC), Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias y Centro de Investigaciones Biomédicas (CeInBio), Universidad de la República, Iguá 4225, Montevideo 11400, Uruguay; ²Cátedra de Química Inorgánica, DEC, Facultad de Química, Universidad de la República, Gral. Flores 2124, Montevideo 11800, Uruguay

El protozoo *Tripanosoma cruzi* (*T. cruzi*) es el agente causante de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana que, según datos de OMS del año 2021, afecta entre 6-7 millones de personas, siendo endémica en 21 países de América Latina, incluido Uruguay. Al presente hay tratamientos farmacológicos efectivos en la etapa aguda inicial que pierden eficacia y desarrollan efectos adversos importantes en pacientes crónicos. Así se buscan alternativas más selectivas entre parásito y huésped, siendo una entre las posibles estrategias el diseño de inhibidores de enzimas clave para la supervivencia del parásito no expresadas en mamíferos. La Fumarato reductasa NADH-dependiente de *T.cruzi* [EC 1.3.1.6] es una proteína soluble de 1215 residuos que cataliza la transformación de fumarato en succinato utilizando NADH, proceso esencial para el crecimiento y supervivencia del parásito bajo condiciones anaeróbicas. La ausencia de estructura 3D experimental de la enzima limitó por años el diseño de inhibidores de TcFR, entre los que se mostró que complejos metálicos/organometálicos $[M(mpO)_2]/[M(mpO)(dppf)](PF_6)$ $M=Pt^{II}/Pd^{II}$ y $mpO=N$ -óxido de 2-mercaptopiridina tienen buena actividad y selectividad [1-2]. Aquí presentamos una nueva estructura 3D representativa y de alta calidad de la enzima, generada por docking (Autodock) de NADH al esqueleto proteico 3D predicho por la red neural AlphaFold2 [3] desde la secuencia Q4CYX1, refinando el complejo 1:1 así obtenido por simulaciones NPT de dinámica molecular clásica (AMBER20). En segundo lugar, analizamos la unión a la enzima de 4 nuevos inhibidores organometálicos [Ru^{II}(dppf)(mpo)L] con L = bipy/tmp/phen que despliegan buen perfil farmacológico, elucidando su modo de acción en el dominio catalítico.

- [1] Merlino A, Vieites M, Gambino D & Coitiño EL (2014) *J Mol Graph & Model*, 48, 47-59. [2] Rodríguez-Arce E, Coitiño EL, Gambino D, et al. (2015) *Dalton Trans.*, 44, 14453-64 [3] Evans J, et al. (2021) *Nature*, 596, 583-589.

VII SIMPOSIO CEINBIO

Comisión Técnico Mixta
Salto Grande

CENUR Litoral Norte
Sede Salto

29/9 al 1/10 de 2022
Salto, Uruguay

Análisis *in silico* de antivirales de origen natural y bajo costo contra COVID-19

Salazar F.¹; Sastre S.¹; Bonanata J.¹; Coitiño, E. L.¹

¹Laboratorio de Química Teórica y Computacional, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias y Centro de Investigaciones Biomédicas (CelnBio), Universidad de la República, Iguá 4225, Montevideo 11800, Uruguay

El reposicionamiento y desarrollo de fármacos han sido parte de las estrategias empleadas contra la COVID-19 causada por el virus SARS-CoV-2, siendo clave para ello la identificación del blanco farmacológico entre las proteínas que codifica el virus. La mayoría de los *coronavirus* -familia que incluye al SARS-CoV-2- presentan en su superficie una glicoproteína llamada **Spike**. La misma es responsable de iniciar el proceso de infección por interacción de su dominio de unión (RBD) con un receptor (ACE-2) presente en la superficie de la célula humana. Por lo tanto, tomar a Spike como blanco farmacológico permite bloquear la propagación del virus en las etapas iniciales sin daño celular. En este trabajo realizamos un análisis por modelado computacional de 45 de especies químicas presentes en un extracto de origen natural con antecedentes documentados en el tratamiento de otras enfermedades (virales y bacterianas) y con acción reportada contra SARS-CoV-2^[1]. Caracterizamos a nivel DFT/IEF-PCM sus propiedades fisicoquímicas de interés en solución, clasificándolos por *Data Mining* (PCA y HCPC) y seleccionando 5 candidatos a los que se exploró mediante simulaciones de dinámica molecular (MD) de 300 ns su interacción con Spike (variante Wuhan Cys oxidadas) sobre el RBD en conformaciones cerrada y parcialmente abierta extraídas de estructuras representativas de MD extensas (10 μ s) desarrolladas por DE. Shaw. Nuestros resultados indican que 2 de los 5 compuestos seleccionados se unen favorablemente al dominio RBD de la proteína Spike y son potenciales candidatos para el tratamiento de la COVID-19, en concordancia con los hallazgos experimentales.

Referencias

- [1] Papies J., Emanuel J., Heinemann N., Kulić Ž., Schroeder S., Tenner B., Lehner M. D., Seifert G. and Müller M. A. *Front. Pharmacol.*, 12, 814452, 2021.

MEDIADORES LIPÍDICOS RESOLUTIVOS DE LA INFLAMACIÓN EN MACRÓFAGOS DE FENOTIPOS M1 Y M2

**Abramo, Sofía ^{1,2}; Mastrogianni, Mauricio ^{1,2}; Rubbo, Homero ^{1,2};
González Perilli, Lucía ^{2,3,4}.**

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República;

²Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Facultad de Medicina, Universidad de la República; ³Unidad Académica de la Licenciatura en Biología Humana, Universidad de la República; ⁴Departamento de Educación Médica, Facultad de Medicina, Universidad de la República.

La resolución de la inflamación es un proceso metabólicamente activo que involucra un cambio en el perfil de los mediadores lipídicos producidos por los leucocitos, desde eicosanoides proinflamatorios a mediadores proresolutivos especializados (SPMs). Estos mediadores son sintetizados fundamentalmente por enzimas lipoxigenasas (LOXs) de macrófagos y neutrófilos a partir de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) araquidónico (AA), eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA). La acción de los SPMs en cascadas de señalización contribuye a eliminar señales proinflamatorias y retornar a la homeostasis. El mecanismo que regula el cambio de perfil de mediadores lipídicos no está bien comprendido. Se propone que diferencias de expresión y cambios en la localización subcelular de las LOXs en los fenotipos de macrófagos proinflamatorio (M1) y prorresolutivo (M2) determinan una producción diferencial de mediadores lipídicos. Para demostrarlo, se trabaja con cultivos de macrófagos humanos derivados de la línea de monocitos THP-1 y de monocitos primarios purificados de sangre periférica que se polarizan a los fenotipos M1 y M2 con lipopolisacárido (LPS) e interleuquina- 4 (IL-4). Los fenotipos se verifican por expresión de marcadores de superficie y producción de citoquinas característicos mediante citometría de flujo y ELISA. Se evidencia por Western Blot que 5-LOX y 12-LOX se expresan en ambos fenotipos, mientras que 15-LOX1 solo en M2. Experimentos de determinación de mediadores lipídicos por HPLC-MS/MS en curso, con macrófagos suplementados con PUFAs y estimulados con Zymosan, muestran mayores cantidades de mediadores proinflamatorios derivados del AA como prostaglandina E2 y leucotrieno B4 en M1 y de intermediarios de las vías LOXs derivadas de DHA en M2. Se plantea profundizar en el estudio de la localización subcelular y colocalización de las isoformas LOXs por microscopía confocal. Se espera aportar a la comprensión del mecanismo celular que dirige el cambio en el perfil de la respuesta a nivel del sitio inflamatorio.

Formación de especies reactivas de oxígeno durante la cicatrización de células de endotelio de córnea

Justet C.¹, Schaffner M.¹, Vlaeminck S.¹, Rinaldi M.²

¹ Facultad de Medicina, Udelar. ² Facultad de Odontología, Udelar.

Tanto en células en cultivo como experimentos *in vivo* se ha encontrado que durante la cicatrización, se produce H_2O_2 , $\cdot NO$ y $ONOO^-$ en períodos que van desde 15 min a horas luego de generada la lesión. Asimismo, se ha encontrado que luego de realizada la herida se produce instantáneamente una onda de calcio fugaz (FCW, Fast Calcium Wave) que dura 2 a 10 min. En células de endotelio de córnea de bovino (BCEC) en cultivo la FCW estimula la proliferación e induce mecanismos de inhibición de la apoptosis.

El objetivo de este trabajo es determinar si se produce H_2O_2 , $\cdot NO$ y $ONOO^-$ en forma instantánea al realizar una herida en BCEC en cultivo y su relación con la FCW.

Para analizar las ROS se hicieron heridas en BCEC en cultivo bajo microscopio de epifluorescencia, utilizando las sondas fluorescentes 1) CellROX Green (sonda comercial que reacciona inespecíficamente con ROS) y 2) fluoresceína boronato (reacciona con $ONOO^-$). Con ambas sondas se observó formación de ROS en las primeras 4 a 5 filas de células del borde de la herida, durante los primeros 5 minutos de cicatrización. Asimismo, la incubación con 4-(Aminometil)piridina (inhibidor de NOS) pero no con ML-171 o Apocinina (inhibidores de NOX), provocó disminución de las señales de ROS. Los experimentos en ausencia de calcio extracelular o presencia de U73122 (inhibidor de la PLC) revelaron que sólo la falta del calcio extracelular inhibe la formación de ROS temprana.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que durante los primeros minutos de cicatrización en BCEC en cultivo se genera $\cdot NO$ y $O_2\cdot^-$, que reaccionan para formar $ONOO^-$ en forma dependiente de la entrada de calcio extracelular e independiente de la liberación del calcio de retículo endoplásmico. Los resultados no sugieren formación de H_2O_2 dependiente de NOX.

Consecuencias estructurales y funcionales de la nitración de tirosinas en la chaperona celular Hsp90.

A. Taboada¹; M.C. Franco²; R. Radi¹; A. Zeida¹.

¹Filiación: Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Facultad de Medicina, UDELAR, Uruguay ; ²Filiación: Department of Biochemistry and Biophysics, Oregon State University, USA

La chaperona Hsp90 (heat shock protein 90KDa), necesaria para el mantenimiento de la homeostasis celular y para la respuesta al estrés celular en todas las células eucariotas (1-3), puede ser objetivo de nitración en una o dos tirosinas de su dominio catalítico debido al estrés oxidativo. La nitración de estas tirosinas conduce a cambios importantes en la función de estas proteínas, asociándose con la inducción de la muerte celular y con la regulación del metabolismo mitocondrial en las motoneuronas (4). Sin embargo, los cambios estructurales y dinámicos que surgen a partir de esta modificación química no están caracterizadas aún. En este proyecto, se utilizan una serie de herramientas computacionales que permiten analizar los cambios estructurales y dinámicos asociados a dichas nitraciones en los residuos clave de tirosina. Paralelamente, nuestra colaboración internacional nos permite integrar nuestros conocimientos teóricos con evidencia experimental. Nuestros resultados preliminares con el dominio N-terminal aislado sugieren que la nitración de tirosinas genera cambios en la flexibilidad de varias regiones cercanas al sitio de unión de ATP, induciendo cambios de volumen en esta cavidad. Además, las simulaciones sugieren que el estado de protonación de las tirosinas nitradas también es muy importante. Además, habiendo analizado ya el dominio N-terminal aislado, se ajustó la generación de estructuras de partida apropiadas para simular el homodímero completo de la Hsp90 β , ya que no existe una estructura determinada experimentalmente para esta proteína. En resumen, este conjunto de experimentos computacionales proporciona una imagen inicial de cómo esta modificación postraduccional modifica la estructura y la dinámica de esta importante chaperona.

1. Borkovich KA, et al. *Mol Cell Biol*. 1989 Sep;9(9):3919–30.
2. Wandinger SK, et al. *J Biol Chem*. 2008 Jul 4;283(27):18473–7.
3. Zhao R, et al. *Cell*. 2005 Mar 11;120(5):715–27.
4. Franco MC, et al. *J Biol Chem*. 2015 Jul 31;290(31):19055–66.

Desarrollo de un Hamiltoniano híbrido de grano-grueso para el estudio 3D/4D del plegamiento de genes

Gabriela da Rosa^{1,2}, Leandro Grille^{1,2}, Pablo D. Dans^{1,2,3}

¹ Grupo de Biofísica Computacional, Departamento de Ciencias Biológicas, CENUR Litoral Norte, Universidad de la República, Salto, Uruguay. ² Laboratorio de Genómica Funcional, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay. ³ Molecular Modelling and Bioinformatics group, Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona), Barcelona, Spain.

Con el advenimiento de las tecnologías 3C y el abaratamiento de las técnicas de secuenciación masiva, el área dedicada al estudio de la estructura/dinámica 3D/4D que adopta la cromatina está viviendo una revolución. Desde el plegamiento que adoptan los genes formando dominios asociados topológicamente, hasta los territorios que ocupan los cromosomas en el núcleo, se han generado cientos de conceptos nuevos sobre los diferentes niveles de organización estructural del genoma. La microscopía de alta resolución, el desarrollo de sondas fluorescentes y las técnicas de modelado molecular también han sido protagonistas del área (Jerković, Cavalli, 2021). Un aspecto particularmente desafiante, está relacionado con los varios órdenes de magnitud espacial involucrados. En este sentido, la región que se extiende desde la micro a la mesoescala y que abarca la estructura de un único nucleosoma hasta la conformación de un gen entero, ha sido la menos estudiada dada la ausencia de técnicas *in vivo* asequibles y con resolución suficiente, y la escasa disponibilidad de modelos teóricos (Dans et al, 2016) . Por otro lado, los pocos modelos disponibles se basan en algoritmos del tipo Monte Carlo que no consideran explícitamente al tiempo durante la simulación (Huertas et al, 2022). Esto impide el cálculo de varias propiedades para las cuales existe contraparte experimental, limitando nuestra comprensión de los cambios conformacionales que sufre un gen en los diferentes estadios/tipos celulares. En esta contribución presentamos los primeros pasos hacia el desarrollo de un nuevo modelo de grano-grueso basado en un Hamiltoniano híbrido (combinando primeros principios y potenciales estadísticos) para la simulación de cromatina usando técnicas de Dinámica Molecular.

PD Dans, J Walther, H Gómez, M Orozco. Multiscale simulation of DNA. Current Op. Struct. Biol. 2016, 37, 29-45

VII SIMPOSIO CEINBIO

CENUR Litoral Norte
Sede Salto

Comisión Técnico Mixta
Salto Grande

29/9 al 1/10 de 2022
Salto, Uruguay

I Jerkovic, G Cavalli. Understanding 3D genome organization by multidisciplinary methods. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2021 22(8):511-528.

J Huertas, EJ Woods, R Collepardo-Guevara. *Curr Opin Cell Biol.* 2022, 102067

Oxidación y sobreoxidación de peroxirredoxina 3 humana por hidroperóxidos de ácidos grasos

Cardozo G.^{1,2}; Mastrogiovanni M.^{1,2}; Radi R.^{1,2}; Reyes A.^{1,2}; Trujillo M.^{1,2}

¹ Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República;

² Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad de la República

La peroxirredoxina 3 (Prx3), una peroxidasa mitocondrial basada en tioles, juega un rol fundamental en la reducción de hidroperóxidos de relevancia biológica, tales como peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y peroxinitrito. Una serie de indicios sugiere que Prx3 puede reducir también hidroperóxidos de ácidos grasos (AG-OOHs). Se propuso identificar y caracterizar la actividad peroxidasa de Prx3 sobre AG-OOHs libres o unidos a fosfolípidos. Siguiendo los cambios de fluorescencia intrínseca de Prx3 durante la reacción de oxidación, se determinaron las constantes de velocidad de oxidación de Prx3 por diferentes AG-OOHs en el orden de 10^7 - $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a pH 7.8 y 12°C. La reacción con AG-OOHs libres provocó también una rápida sobreoxidación de Prx3, con constantes de velocidad en el orden de 10^5 - $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a pH 7.8 y 12°C. En concordancia con una constante de velocidad mayor para la sobreoxidación de Prx3 por AG-OOHs libres que por H_2O_2 , la adición de un equivalente AG-OOH, pero no de H_2O_2 , provocó considerable sobreoxidación de Prx3, lo que fue detectado por diferentes metodologías, incluyendo cinética de estado estacionario, western blot y espectrometría de masas. Si bien nuestros resultados son consistentes con una rápida sobreoxidación de Prx3 por AG-OOHs libres, la cantidad de enzima sobreoxidada resultante es menor a la esperada en función de la constante de velocidad determinada. Esta diferencia es interpretada en base a las asimetrías entre los sitios activos de la enzima dodecamérica. En suma, Prx3 es capaz de reducir AG-OOHs, llevando a una rápida oxidación y sobreoxidación de la enzima.

Estudio de la función de la triparredoxina peroxidasa mitocondrial de *Trypanosoma cruzi* en la respuesta a estrés utilizando la herramienta CRISPR/Cas9.

**Specker G.^{1,2}; Libisch G.³; Radi R. ^{1,2}; Robello C. ^{1,2,3}, Piacenza L.^{1,2},
Chiribao M.L. ^{1,2,3}**

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República; ²Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Universidad de la República, ³Laboratorio de interacciones hospedero patógeno/Unidad de Biología Molecular, Institut Pasteur de Montevideo

Trypanosoma cruzi es un parásito con gran capacidad de adaptación a diferentes situaciones adversas como cambios de pH, de temperatura, en la disponibilidad y tipo de nutrientes y así como a diferentes ambientes oxidantes generados por sus hospederos. Estas condiciones adversas o estresores, cumplen un rol fundamental en la diferenciación del parásito durante el ciclo de vida. Las peroxirredoxinas son una familia ubicua de enzimas antioxidantes que detoxifican peróxidos y que se han descrito otras funciones como señalización intracelular, chaperona y modulación del sistema inmune. *T. cruzi* contiene dos peroxirredoxinas CPX y MPX, localizadas en el citosol y en la mitocondria, respectivamente. El rol de MPX en la detoxificación de peróxidos ha sido ampliamente estudiado y también se ha observado que puede actuar como chaperona molecular y que su expresión aumenta en respuesta a incrementos de temperatura y a la exposición al fármaco nifurtimox. Utilizando la herramienta de edición génica CRISPR/Cas9 hemos generado clones de parásitos mutantes nulos parciales los cuales expresan un 70% menos de MPX en comparación con la cepa salvaje, así como parásitos con una nutación puntual en la cisteína resolutiva (C204S). El objetivo de este trabajo es estudiar el rol de MPX en la respuesta a estrés así como sus interactores en diferentes condiciones. Observamos que epimastigotas deficientes en MPX tienen son más sensibles al estrés térmico y al tratamiento con nifurtimox. El efecto del estrés térmico también fue evaluado en el estadio infectivo en donde obtuvimos resultados similares. Pudimos determinar también la importancia de esta proteína en el contexto de infección *in vitro*, ya que las líneas deficientes en mpx presentan un menor índice de infección. Estos resultados indican que MPX juega un rol importante no solo en la respuesta a oxidantes sino a otro tipo de estresores siendo fundamental para establecer la infección.

VII SIMPOSIO CEINBIO

CENUR Litoral Norte
Sede Salto

Comisión Técnico Mixta
Salto Grande

29/9 al 1/10 de 2022
Salto, Uruguay

INDICE

Efecto de las lesiones producidas por almacenamiento y estrés oxidativo en la membrana de glóbulos rojos para transfusión	1
Identificación de moléculas que alteran el ensamblaje de la cápside del VIH como potenciales fármacos antirretrovirales	2
Acidez y nucleofilia de persulfuros	3
Cannabinoides inhiben la internalización de LDLox en la línea celular de macrófagos J774.1	4
Efectos del flossing en el muslo	5
Identificación de compuestos químicos que bloqueen la interacción Spike-ACE2	6
Caracterización de la 3-mercaptopiruvato azufretransferasa de <i>Trypanosoma brucei brucei</i>	7
Rol del residuo Lys66 en la reducción de FAD por NADPH en glutatión reductasa humana	8
Un nitroalqueno derivado del salicilato protege contra la obesidad inducida por dieta mediante la activación de la termogénesis dependiente de creatina	9
Aplicación de la metabolómica basada en RMN al estudio comparativo de parénquimas pulmonares de pacientes con COVID-19 y otras enfermedades respiratorios	11
Desarrollo de un sensor genéticamente codificado para el monitoreo de 3-mercaptopiruvato, un metabolito vinculado a la señalización por H2S	13
Inhibición de la tiorredoxina glutatión reductasa de <i>Echinococcus granulosus</i> por ácido nitrooleico	15
Efecto de polifenoles del aceite de oliva sobre la formación de ácidos grasos nitrados	16
Estudio de variaciones en el metaboloma de pacientes con Endometriosis con y sin tratamiento mediante 1H RMN	17

VII SIMPOSIO CEINBIO

Comisión Técnico Mixta
Salto Grande

CENUR Litoral Norte
Sede Salto

29/9 al 1/10 de 2022
Salto, Uruguay

Diabetes y locomoción	18
Diseño y caracterización de un biosensor de lipoperóxidos basado en GFP	19
Nuevos parámetros de Lennard-Jones para cisteína y selenocisteína en el campo de fuerza AMBER	20
Velocidad autoselecciónada de marcha en embarazadas	21
Oseointegración alterada en condiciones de hiperglicemia y rol del estrés oxidativo	22
Análogos del ebsulfur alteran la homeostasis redox de los tripanosomátidos	23
Rol de las modificaciones oxidativas en la proteína alfa-sinucleína	24
Glutatión transferasas humanas catalizan la reacción entre el ácido nitrolinoleico conjugado y glutatión	25
Evaluación de la viabilidad de queratinocitos humanos tratados con glifosato, arsénico o UVA	26
Sustancias Bioactivas de Vitis vinifera L. cv. Tannat: Aislamiento, Biodisponibilidad y Actividad Biológica de Compuestos Galoileados	27
NADH-Fumarato Reductasa de <i>T. cruzi</i> (TcFR): predicción de su estructura 3D e interacción con nuevos inhibidores [Rull(dppf)(mpo)L]	28
Ánálisis in silico de antivirales de origen natural y bajo costo contra COVID-19	29
Mediadores lipídicos resolutivos de la inflamación en macrófagos de Fenotipos M1 y M2	30
Formación de especies reactivas de oxígeno durante la cicatrización de células de endotelio de córnea	31
Consecuencias estructurales y funcionales de la nitración de tirosinas en la chaperona celular Hsp90	32

VII SIMPOSIO CEINBIO

CENUR Litoral Norte
Sede Salto

Comisión Técnico Mixta
Salto Grande

29/9 al 1/10 de 2022
Salto, Uruguay

Desarrollo de un Hamiltoniano híbrido de grano-grueso para
el estudio 3D/4D del plegamiento de genes

33

Oxidación y sobreoxidación de peroxirredoxina 3 humana
por hidroperóxidos de ácidos grasos

35

Estudio de la función de la triparredoxina peroxidasa
mitocondrial de *Trypanosoma cruzi* en la respuesta a estrés
utilizando la herramienta CRISPR/Cas9

36