



LIBRO DE RESUMENES

Sesión de *Posters*

**III Simposio CEINBIO
Sede UTEC – Rivera**

Octubre 5 al 8, 2025

ÍNDICE

Sosa Quesada Martín

Adición de glutatión al ácido nitro-linolénico mediada por glutatión transferasas humanas: nitroalquenos con trienos conjugados como sustratos

P1 - S1

Pose Manuela

Inactivación de la mercaptopiruvato azufre transferasa humana (hMPST2) por peroxinitrito

P2 - S1

Scalese Gonzalo

Desentrañando vínculos metabólicos: ergosterol, lipoperóxidos y glutarredoxinas

P3 - S1

Lenzi Camisa Janina Constanza

El persulfuro en la rodanesa

P4 - S1

Sánchez Reolon Ana Gabriela

Nitración de guanina por peroxinitrito: efecto del pH y bicarbonato

P5 - S1

Haberkorn Odicini Marcela

Inactivación Oxidativa de la Glutamina Sintetasa Astrocitaria Humana: Mecanismos Bioquímicos y Consecuencias Celulares

P6 - S1

Medeiros Andrea

Interfiriendo con el metabolismo tiol-redox de los tripanosomátidos

P7 - S1

Giuliana Cardozo

Reducción de hidroperóxidos de ácidos grasos por prexirredoxina 5

P8 - S1

Reyes Aníbal M.

Perfil químico de antocianinas en variedades de boniato violeta mediante LC-MS/MS y LC-UV

P9 - S1

Valera María José

Producción de acetatos de tirosol y triptofol en alimentos fermentados con levaduras nativas: compuestos bioactivos con efecto positivo en la salud humana

P10 - S1

Araújo Verena

Vitis vinífera L. Cv. Tannat: caracterización y biodisponibilidad de flavan-3-oles y flavan-3-oles galoileados en orujo

P11 - S1

Hitta Constanza

Análisis de la interacción entre HMGB1 y Prx1 en distintos estados redox

P12 - S1

Abboud Matilde

Aspectos bioquímicos de la hemoperoxidasa híbrida de Trypanosoma cruzi (APxCcP) durante la infección de células de mamíferos

P13 - S1

Pereyra Josefina

Estudio del oxígeno como modulador de la respuesta oxidativa de macrófagos

P14 - S1

Bastidas Ormaza Jonathan Patricio

Identificación y caracterización de nuevas moléculas inhibidoras dirigidas a las proteasas del SARS-CoV-2 con actividad antiviral

P15 - S1

Tinaglino de Barros Renzo

Estudio de la función de la proteína TcBola1 en respuesta a estrés en Trypanosoma cruzi

P16 - S2

Sanz Rodríguez Carlos E.

El Modo de Acción y de Resistencia de una molécula candidata Anti-Chagásica N5MTA P17 - S2

Garcimartin Santiago

Estrategias neuroprotectoras frente a la apoptosis inducida por NGF modificado oxidativamente

P18 - S2

Chacón Eliana

Evaluación del potencial senoterapéutico de una molécula con propiedades antiinflamatorias

P19 - S2

Souto Maira

Durante la cicatrización de células de endotelio de córnea, cambia la expresión de NOX1 y NOX4 dependiendo de la modalidad de migración

P20 - S2

Diego Benítez

Interfering thiol-redox metabolism of Leishmania with drug-like molecules

P21 - S2

Herrera Lorena

Structural and proteomic characterization of MetSO-cytochrome c in cellular contexts

P22 - S2

López Miriam - 1

MV14: un compuesto liberador de óxido nítrico como agente terapéutico frente al cáncer de vejiga

P23 - S2

López Miriam - 2

Desarrollo y evaluación de compuestos obtenidos a partir de biomasa como agentes fotoprotectores frente a la radiación UVA y UVB

P24 - S2

Grünwaldt de Souza Guillermo

Secreción de vesículas extracelulares con componentes mitocondriales en la senescencia inducida por la quimioterapia en melanoma

P25 - S2

Viera Nicolás

Cinética y mecanismos de tiolación de peroxirredoxina 3 mitocondrial

P26 - S2

Taboada Alfonso

Consecuencias estructurales y funcionales de la nitración de tirosina en la chaperona

Hsp90

P27 - S2

Salazar Coronel Fabiana Maria

Entendiendo la modulación de propiedades clave y los mecanismos de activación y acción de profármacos antitumorales de Pt(IV)

P28 - S2

Delgado Francisco Javier

4-Quinolona vs 4-Hidroxiquinolina: Análisis de los efectos del medio sobre el par ceto-enol y la reactividad de un motivo de reconocida actividad biológica

P29 - S2

Schmidt-Smerdiner Julieta

¿Cómo influye la polaridad del entorno en la etapa limitante del mecanismo catalítico de la NADH-fumarato reductasa de *T. cruzi*?

P30 - S2



5 al 8 de
octubre

Rivera,
Uruguay



VIII Simposio
CEINBIO



Adición de glutatión al ácido nitro-linolénico mediada por glutatión transferasas humanas: nitroalquenos con trienos conjugados como sustratos

Sosa M. ¹; Steglich M. ¹; Schopfer F. ²; Turell L. ¹

¹ Laboratorio de Enzimología, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, y Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad de la República; ² Department of Pharmacology and Chemical Biology, School of Medicine, University of Pittsburgh.

Los nitroalquenos de ácidos grasos (NO₂-FAs) son mediadores lipídicos electrofílicos formados durante la digestión y la inflamación, que están siendo investigados como agentes terapéuticos. Reaccionan vía adición de Michael con residuos de cisteína en proteínas reguladoras, con efectos citoprotectores y antiinflamatorios. En particular, el ácido nitro-oleico (NO₂-OA), con un solo carbono electrofílico, se conjuga con glutatión (GSH), generando aductos no electrofílicos excretados en orina. Recientemente se determinó que esta reacción es catalizada por las glutatión transferasas humanas (hGSTs) A4-4 y M1-1. Por su parte, el ácido nitro-linolénico conjugado (NO₂-CLnA) contiene un trieno conjugado y tres carbonos electrofílicos. Sus isómeros constituyen ~35% de los NO₂-FAs detectados en orina humana, aunque aún se conoce muy poco de su reactividad y efectos biológicos. En este trabajo, hipotetizamos que las hGSTs también catalizan la conjugación de GSH a NO₂-CLnA, generando aductos potencialmente diferentes. En el análisis se incluyó también la hGST A1-1, puesto que es abundante en hígado. Esta última se expresó en *E. coli* y se purificó con una actividad específica de 67 U/mg (pH 7.4, 25 °C). El pK_a del GSH unido a la enzima fue 7.36, menor que el del GSH libre (9.01), una estrategia clave en la catálisis por GSTs. Las tres hGSTs ensayadas catalizaron la reacción, siendo la hGST A1-1 la más rápida. Esta última también catalizó la reacción con NO₂-OA pero en menor medida que hGST A4-4. Con NO₂-CLnA se observaron cinéticas complejas con, al menos, tres fases, consistente con tres carbonos electrofílicos no equivalentes y se confirmó la formación de aductos (ESI⁺, m/z 631) por espectrometría de masas. Actualmente estamos investigando el rol señalizador del NO₂-CLnA en células HepG2. Estos hallazgos contribuyen a comprender las propiedades bioquímicas del NO₂-CLnA y resaltan un nuevo papel enzimático de las hGSTs en el procesamiento de NO₂-FAs que contienen trienos conjugados.



5 al 8 de
octubre

Rivera,
Uruguay



VIII Simposio
CEINBIO



Inactivación de la mercaptopiruvato azufre transferasa humana (hMPST2) por peroxinitrito

Pose M.^{1,2}; Demicheli, V.^{1,2}; Reyes, M. A. ^{1,2}; Cuevasanta, E.^{2,3};
Bonilla, M. ^{2,3}; Banerjee, R.⁴; Radi, R.^{1,2}, Carballal, S. ^{1,2}

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, ²Center for Free Radical and Biomedical Research, ³Laboratorio de Enzimología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; ⁴Department of Biological Chemistry, Medical Center, University of Michigan, Ann Arbor, USA

La enzima mercaptopiruvato azufretransferasa (MPST), es capaz de generar sulfuro de hidrógeno (H₂S) en diferentes tejidos de mamíferos. La MPST, cataliza la desulfuración del 3-mercaptopiruvato, liberando H₂S a través de la formación de un intermediario persulfuro. Aunque el H₂S a elevadas concentraciones es tóxico, la evidencia actual lo reconoce como un importante modulador de numerosos procesos fisiológicos. En este trabajo, se purificó la variante humana MPST2, y se caracterizó su reactividad frente al peroxinitrito, un poderoso agente oxidante y nitrante, producto de la reacción de los radicales superóxido y óxido nítrico. El tratamiento con peroxinitrito causó una pérdida de la actividad de MPST de forma dosis-dependiente, con una concentración de peroxinitrito necesaria para inactivar el 50% de 2 μM de MPST (IC₅₀) de 4 μM. Esta pérdida de actividad estuvo acompañada por la nitración de residuos de tirosina y la formación de entrecruzamientos covalentes no reducibles correspondientes a dímeros y especies de mayor peso molecular, presumiblemente por la formación de ditirosina. Estudios cinéticos realizados mediante espectrofotometría de flujo detenido (stopped-flow) revelaron que la reacción directa de la MPST con peroxinitrito, tiene una constante de velocidad de segundo orden de 2.3 x 10⁴ M⁻¹ s⁻¹ (pH 7.4, 25 °C). Resultados obtenidos en presencia de moléculas atraparoras de radicales como la desferrioxamina, y experimentos de simulaciones, sugieren que la pérdida de actividad de la MPST se debe tanto a su reacción directa con el peroxinitrito, como a su reacción con los radicales derivados de éste: el dióxido de nitrógeno y en presencia de dióxido de carbono, el radical carbonato. Estos resultados demuestran la sensibilidad de la MPST frente al peroxinitrito, lo cual resulta de gran relevancia dado el potencial impacto que podría generar el estrés nitro-oxidativo en el metabolismo del H₂S.



5 al 8 de
octubre

Rivera,
Uruguay



VIII Simposio
CEINBIO



Desentrañando vínculos metabólicos: ergosterol, lipoperóxidos y glutarredoxinas

Scalese G.¹, Oddone N.¹, Comini M.

¹Laboratorio Biología Redox de Tripanosomas, Institut Pasteur de Montevideo

El ergosterol es un componente esencial de las membranas de tripanosomátidos. Estabiliza la bicapa fosfolipídica, promueve la proliferación celular y, debido a su ausencia en mamíferos, constituye un blanco atractivo para el desarrollo de fármacos. No obstante, su rol en la protección frente al estrés oxidativo y la remodelación de membranas inducida por altas temperaturas permanece poco explorado.

Estudios en distintos organismos vinculan la deficiencia de glutaredoxinas ditiólicas (Grx) con alteraciones en el metabolismo de lípidos y esteroides, y se ha demostrado que tripanosomas defectivos en Grx1 y/o Grx2 desarrollan termotolerancia (39 °C) mediante mecanismos aún no dilucidados, asociados a cambios metabólicos (incremento de tioles de bajo peso molecular oxidados) y de membrana.

En este trabajo se analizó el impacto de la depleción de Grx1/2 sobre la lipoperoxidación y el rol del ergosterol en este proceso. Para ello, se generaron líneas celulares reporteras de lipoperóxidos tanto en la cepa silvestre (WT) como en mutantes deficientes en Grx1/2. La validación funcional del biosensor se realizó por citometría de flujo bajo distintos estímulos.

Se observó que tanto el shock térmico como el crecimiento sostenido a 39 °C, inducen lipoperoxidación. Sin embargo, los parásitos que expresan el biosensor basado en una lipoperoxidasa de *T. brucei* exhibieron mayor termotolerancia, lo que sugiere un rol protector de esta enzima frente al daño oxidativo por calor. Además, la depleción farmacológica de ergosterol exacerbó la lipoperoxidación inducida por temperatura, mientras que su suplementación exógena ejerció un efecto protector moderado en shock térmico breve y más marcado bajo exposición prolongada.

Estos hallazgos señalan una interacción funcional entre el metabolismo de esteroides y lipoperóxidos en la respuesta al estrés térmico en tripanosomátidos. A futuro, se buscará dilucidar los mecanismos moleculares que conectan estos procesos, con posibles implicancias para la fisiopatología del parásito y el diseño de nuevas estrategias terapéuticas.



5 al 8 de
octubre

Rivera,
Uruguay



VIII Simposio
CEINBIO



El persulfuro en la rodanasa

Lenzi Camisa J.^{1,2}; Alvarez B.^{1,2}

¹Laboratorio de Enzimología, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, UdelaR; ²Centro de Investigaciones Biomédicas, UdelaR

Los persulfuros (RSSH/RSS^-) participan en procesos de metabolismo de azufre y señalización. Son más ácidos que los tioles (RSH) y presentan carácter nucleofílico y electrofílico. En este trabajo se estudió la electrofilia de un persulfuro presente en el ciclo catalítico de la enzima tiosulfato sulfuro transferasa (TST), también conocida como rodanasa. Esta enzima se encuentra en la mitocondria y su reacción canónica es la transferencia de azufre entre tiosulfato y cianuro para formar tiocianato y sulfito. Se preformó el persulfuro de la rodanasa y se estudió la cinética de reacción con distintos aceptores de azufre mediante los cambios en la fluorescencia intrínseca, ya que la enzima en estado tiol presenta un máximo de emisión a 330 nm, el cual decrece en el estado persulfuro. La constante de velocidad obtenida para la reacción con cianuro fue $(3.68 \pm 0.09) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (pH 7.8, 25 °C). No se evidenció la formación de complejo de Michaelis entre enzima y sustrato. Se constataron reacciones similares con sulfito, GSH, y L-Cys, con constantes de velocidad de $(1.55 \pm 0.02) \times 10^5$, 65.9 ± 0.6 y $88 \pm 1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectivamente. Además, se evaluó la reacción con H_2S y tiorredoxina 2, sin embargo la cinética de las mismas resultó compleja. Nuestros resultados aportan a la comprensión de las propiedades del persulfuro de la rodanasa y los posibles roles biológicos de esta enzima.



5 al 8 de
octubre

Rivera,
Uruguay



VIII Simposio
CEINBIO



Nitración de guanina por peroxinitrito: efecto del pH y bicarbonato

Sánchez, A.G.¹; Menoni, M.¹; Moreira, E.¹; Ibargoyen, N.¹; Keszenman, D.J.^{1,2}; Peluffo, R.D.^{1,3}

¹Grupo de Biofísicoquímica, Departamento de Ciencias Biológicas, CENUR Litoral Norte, Udelar, Rivera 1350, Salto, Uruguay; ²Citizen Science Program, Biology Department, Bard College, Annandale-on-Hudson, NY 12504, USA; ³Department of Pharmacology, Physiology and Neuroscience, Rutgers-New Jersey Medical School, Rutgers, The State University of New Jersey, 185 South Orange Avenue, Newark, NJ, 07103, USA

Las variaciones de pH del microambiente celular regulan el equilibrio del par $\text{ONOO}^-/\text{ONOOH}$. En presencia de CO_2 se forma anión nitrosoperoxicarbonato (ONOOCO_2^-), cuyo decaimiento genera CO_3^{2-} y NO_2^{\cdot} , especies que inducen la formación de compuestos nitro-oxidados. Se estudió la cinética de la reacción de nitración entre 200 μM guanina y 400 μM peroxinitrito en función del pH (5.60–8.00), temperatura (10–40°C), y concentración de bicarbonato (1–20 mM) usando un equipo de mezclado rápido y flujo detenido. Se registraron cursos temporales (0.01–5 s) de formación de 8-nitroguanina (8-NitroGua) en 0.1 M buffer fosfato, 0.1 M NaCl, 0.1 mM DTPA a $\lambda_{\text{max}} = 396 \text{ nm}$, y se ajustaron ecuaciones exponenciales empíricas. A 25°C, la suma de amplitudes de ajustes biexponenciales mostró un sostenido incremento de la concentración de 8-NitroGua (10–18 μM) para el rango de pHs estudiado, consistente con mediciones espectrofotométricas de hasta 60 s, bajo idénticas condiciones. Interesantemente, a 40°C, la cinética cambia con el aumento del pH, de un componente exponencial creciente rápido (con ligera caída posterior) a un comportamiento doble exponencial creciente, que es evidente por encima del pK_a del par $\text{ONOO}^-/\text{ONOOH}$. En presencia de bicarbonato (pH 7.40, 25°C), la cinética de producción de 8-NitroGua fue bifásica, alcanzando su concentración un máximo a 5 mM HCO_3^- . En estas condiciones, la constante de velocidad rápida (k_f) creció linealmente con la $[\text{HCO}_3^-]$, mientras que la constante de velocidad lenta (k_s) permaneció incambiada. En conclusión, a pH bajos predomina un único mecanismo de nitración y por encima de pH 6.80 aparece un segundo componente, congruente con las dos vías descritas para el decaimiento de peroxinitrito. Los cursos temporales de nitración en presencia de bicarbonato son consistentes con la capacidad nitrante del ONOOCO_2^- previamente descrita. Inesperadamente, al agregar 5 mM HCO_3^- , el rendimiento de 8-NitroGua se duplicó.



5 al 8 de
octubre

Rivera,
Uruguay



VIII Simposio
CEINBIO



Inactivación Oxidativa de la Glutamina Sintetasa Astrocitaria Humana: Mecanismos Bioquímicos y Consecuencias Celulares

Haberkorn M.^{1,2}; Campolo N.^{1,2}; Bartesaghi S.^{1,2}; Radi R.^{1,2}

¹Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO); ²Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República.

La glutamina sintetasa (GS) es la enzima metabólica que cataliza la síntesis ATP-dependiente de glutamina (gln) a partir de glutamato (glu) y amonio (NH_3). En mamíferos, esta es altamente expresada en astrocitos cerebrales donde desempeña un rol central en el llamado ciclo glutamato-glutamina, que posibilita la detoxificación eficiente del glu en exceso en las neurosinapsis, evitando la ocurrencia de excitotoxicidad y muerte neuronal asociada. En cerebros de pacientes humanos y en modelos animales de la enfermedad de Alzheimer, se observa una disminución en la cantidad y actividad de esta enzima, que ha sido asociada, a su vez, a una extensiva modificación oxidativa de su cadena polipeptídica, sugiriendo un posible mecanismo de inactivación oxidativa, que podría actuar como *driver* de la neuro-degeneración.

Estudios recientes llevados a cabo por nuestro grupo revelaron que la GS humana (HsGS) recombinante es susceptible de ser modificada oxidativamente en múltiples sitios al ser expuesta a diversos oxidantes *in vitro*, incluyendo el peroxinitrito, lo cual deriva, a su vez, en su inactivación y agregación.

En este trabajo, se ahondó en los mecanismos bioquímicos que conducen a la inactivación oxidativa de la HsGS *in vitro*, centrándonos en el rol de la agregación. Particularmente, se halló que la oxidación dirigida de residuos de cisteína por el oxidante específico diamida induce la agregación y la pérdida de actividad, siendo ello prevenible mediante la unión del ligando Mg-ATP. Adicionalmente, se llevó a cabo la puesta a punto de un modelo celular basado en la línea U87-MG, de glioblastoma humano, para el estudio de la inactivación de la GS en un contexto celular, profundizándose asimismo en sus impactos sobre el metabolismo y fenotipo general de las células.



5 al 8 de
octubre

Rivera,
Uruguay



VIII Simposio
CEINBIO



Interfiriendo con el metabolismo tiol-redox de los tripanosomátidos

Quiroga C.¹; Incerti, M.²; Benítez, D.¹; Luzardo, M.²; Manta, E.²; Leyva, A.³; Margot Paulino⁴, Comini, M.A.¹; Medeiros, A^{1,5}

¹Laboratorio de Biología Redox de Tripanosomas, Institut Pasteur de Montevideo, ²Laboratorio de Química Farmacéutica, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Udelar, ³Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica, Institut Pasteur de Montevideo, ⁴Centro informático, DETEMA, Facultad de Química, Udelar, ⁵Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Udelar.

Varias especies de tripanosomátidos causan enfermedades fatales y discapacitantes en humanos y ganado. La quimioterapia disponible es limitada y se requieren nuevos fármacos más eficaces y seguros. Las benzisotiazolonas (ej., Ebsulfur, EbS) y las selenazolonas (ej., Ebselen, EbSe) han sido investigadas por su acción prometedora contra enfermedades transmisibles y no transmisibles. En este trabajo se sintetizaron 23 benzisotiazolonas y se evaluó su actividad antitripanosomática frente a los estadios clínicamente relevantes de tres especies: *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania infantum*. Varios compuestos mostraron alta actividad (CE₅₀ en el rango nanomolar o micromolar bajo) y buena selectividad (selectividad de al menos dos dígitos) contra *Trypanosoma* spp., mientras que la mayoría resultó inactivo frente a *L. infantum*. Aproximadamente la mitad de los compuestos indujeron un desbalance en el pool intracelular de tioles de bajo peso molecular. Dado que la tripanotona es el tiol característico de los tripanosomátidos, estudiamos la actividad sobre dos enzimas clave de este sistema: la tripanotona sintetasa (TryS) y la tripanotona reductasa (TR). Ensayos enzimáticos revelaron que únicamente EbSe y EbS inhibieron a TryS, mientras que dos de los nuevos compuestos sintetizados inhibieron a TR. Mediante espectrometría de masas confirmamos que EbS y uno de los compuestos sintetizados, inhibidor de TR, se incorporan covalentemente en la cisteína 221 de la enzima, a través de un mecanismo consistente con un ataque tiolato al anillo de la tiazolona con la formación de un heterodisulfuro, análogo a lo observado con EbSe–GSH. Finalmente, en un modelo murino agudo de tripanosomiasis africana, el compuesto más potente y selectivo frente a *T. brucei* (CE₅₀=0,022 μM, IS=6772) prolongó la supervivencia de los animales. Los próximos estudios se enfocarán en la elucidación del blanco molecular principal, la mejora de la solubilidad y biodisponibilidad, así como en la exploración de estrategias de formulación y terapias combinadas para optimizar la eficacia terapéutica.



5 al 8 de
octubre

Rivera,
Uruguay



VIII Simposio
CEINBIO



Reducción de hidroperóxidos de ácidos grasos por peroxirredoxina 5 humana

Cardozo G.^{1,2}; Viera N.^{2,3}; Radi R.^{2,3}; Reyes A.^{2,3}; Trujillo M.^{2,3}

¹Departamento de Educación Médica, Facultad de Medicina, Universidad de la República; ²Centro de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República; ³Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República

La peroxirredoxina 5 (Prdx5) es una peroxidasa dependiente de tioles que se expresa en diferentes compartimentos celulares y desempeña un papel clave en procesos fisiopatológicos. La Prdx5 humana es altamente resistente a la sobreoxidación en comparación con otras peroxirredoxinas de 2 cisteínas, aunque se ha detectado sobreoxidada en modelos animales de isquemia-reperfusión. Los hidroperóxidos orgánicos oxidan la Prdx5 con constantes de velocidad en el rango de 10^6 - 10^7 $M^{-1}s^{-1}$. Sin embargo, la reacción con hidroperóxidos de ácidos grasos (AG-OOHs), ya sean libres o formando parte de lípidos más complejos, no había sido explorada hasta el momento. En este trabajo, investigamos la reacción entre Prdx5 reducida y los hidroperóxidos de ácidos grasos derivados del ácido linoleico y del ácido eicosapentaenoico. La Prdx5 reducida redujo los AG-OOHs libres con una estequiometría de 1:1, mientras que las determinaciones por espectrometría de masas indicaron que los AG-OOHs oxidan a Prdx5 sin causar sobreoxidación. La adición de AG-OOHs a la Prdx5 reducida provocó un aumento rápido en la intensidad de fluorescencia intrínseca de la enzima, consistente con su oxidación. La gráfica de las constantes observadas del cambio de fluorescencia en función de la concentración de AG-OOHs mostró una relación lineal, lo que refleja un proceso bimolecular con constantes de velocidad de 10^5 - 10^6 $M^{-1}s^{-1}$. Estas gráficas mostraron de manera consistente offsets de aproximadamente 10 s^{-1} , lo que interpretamos como k^{-1} , la constante de velocidad de disociación del complejo ES. Aunque la adición de AG-OOH no causó sobreoxidación de Prdx5 en condiciones no catalíticas, sí provocó su inactivación en condiciones catalíticas. El mecanismo de dicha inactivación se encuentra actualmente en estudio.



5 al 8 de
octubre

Rivera,
Uruguay



VIII Simposio
CEINBIO



Perfil químico de antocianinas en variedades de boniato violeta mediante LC-MS/MS y LC-UV

Reyes A. M. ¹; Aicardo A.²; Chavarría, C.¹; Lado J. ²;
Radi R¹; Mastrogiovanni M.²

¹Departamento de Bioquímica y CEINBIO, Facultad de Medicina, Universidad de la República; ²INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria) Salto Grande.

Los boniatos violetas se caracterizan por su contenido elevado de antocianinas. Estas antocianinas son pigmentos naturales versátiles, y existe evidencia científica que respalda sus efectos positivos en la salud humana, posicionando a estas variedades como potenciales alimentos funcionales. Asimismo, sus cambios de color dependientes del pH y su alto grado de acilación les confieren propiedades que los hacen atractivos para aplicaciones en las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica. En este estudio, analizamos el contenido de antocianinas en diferentes variedades de boniato desarrollados por el programa de mejoramiento genético de boniato del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA, Uruguay), con el fin de aportar datos que contribuyan a valorizar este producto. Se examinaron tres variedades de boniato: un cultivar de pulpa blanca (INIA Rubí63) y dos cultivares experimentales ricos en antocianinas (A1807.19 y F23A2.2). La extracción de antocianinas se realizó mediante extracción asistida por ultrasonido en solventes hidroalcohólicos ácidos, y la caracterización química se llevó a cabo mediante HPLC-UV y HPLC-MS/MS. En total, se identificaron 15 y 17 antocianinas en A1807.19 y F23A2.2, respectivamente. A1807.19 presentó un predominio de derivados de cianidina, mientras que en F23A2.2 predominaron los derivados de peonidina. Las antocianinas se encontraron en formas no aciladas, monoaciladas y diaciladas, principalmente conjugadas con ácidos cafeico, ferúlico y p-hidroxibenzoico, en concordancia con los perfiles reportados para cultivares asiáticos. El análisis cuantitativo reveló contenidos totales de antocianinas de 1.55 mg eq Cia/g en A1807.19 y 2.37 mg eq Cia/g en F23A2.2, valores comparables a los informados para cultivares chinos y coreanos. Además, F23A2.2 presentó una mayor proporción de antocianinas diaciladas, lo que podría mejorar la estabilidad del pigmento y ampliar sus aplicaciones potenciales. Este estudio representa un aporte al conocimiento de compuestos bioactivos en cultivares nacionales, y constituye una base para investigaciones futuras sobre sus propiedades funcionales.



5 al 8 de
octubre

Rivera,
Uruguay



VIII Simposio
CEINBIO



Producción de acetatos de tirosol y triptofol en alimentos fermentados con levaduras nativas: compuestos bioactivos con efecto positivo en la salud humana

Valera M. J.^{1,2,3}; Boido E.³; Dellacassa, E.⁴; Carrau, F.^{2,3}

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UdelaR; ²Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Programa en Alimentos y Salud Humana (Pays), Facultad de Medicina, UdelaR; ³Área de Enología y Biotecnología de las Fermentaciones, Departamento Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Química, UdelaR; ⁴Laboratorio de Biotecnología de Aromas, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, UdelaR

Los acetatos de tirosol y triptofol han sido recientemente caracterizados por sus propiedades bioactivas como su efecto antiinflamatorio en mamíferos y su actividad antimicrobiana frente a algunas especies que producen patologías intestinales. La especie de levadura *Hanseniaspora vineae*, aislada de uvas en Uruguay, presenta producción elevada de estos compuestos durante la fermentación de alimentos. Los objetivos de este trabajo fueron comparar la producción de acetatos de tirosol y triptofol por *H. vineae* con lo producido por otras especies de levaduras, demostrar si varias cepas de esta especie tienen la misma propiedad y describir la dinámica de producción a lo largo del proceso fermentativo.

Para ello se utilizaron diferentes especies de levaduras: *Hanseniaspora osmophila*, *Hanseniaspora uvarum*, *Saccharomyces cerevisiae* y tres cepas de *H. vineae*. Éstas fueron inoculadas en medio definido para fermentar durante 10 días. Se tomaron diferentes muestras durante la fermentación y al final de la misma. Los extractos se analizaron por GC-MS, cuantificando los dos acetatos. Además, se compararon los genomas de estas especies *in silico* para encontrar los genes relacionados con la producción de estos compuestos.

La producción de acetato de tirosol y triptofol resultó ser muy superior en *H. vineae* respecto al resto de especies, aumentando hasta en cuatro órdenes de magnitud la cantidad de estos compuestos, probablemente debido a las 6 acetiltransferasas que tiene esta especie en su genoma. Por otra parte, se determinó que la producción de acetatos comienza en las primeras horas de fermentación de *H. vineae*.



5 al 8 de
octubre

Rivera,
Uruguay



VIII Simposio
CEINBIO



***Vitis vinífera* L. Cv. Tannat: caracterización y biodisponibilidad de flavan-3-oles y flavan-3-oles galoileados en orujo.**

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

¹ Departamento de Bioquímica, Programa de Alimentos y Salud Humana, y Centro de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Medicina

² Departamento de Alimentos, ³ Departamento de Nutrición Clínica, Escuela de Nutrición

⁴ Enología y Biotecnología de las Fermentaciones, Departamento de Ciencia y Tecnología Alimentos, Facultad de Química Universidad de la República

Vitis vinífera L. Cv. Tannat es considerada la variedad emblemática de Uruguay, consolidada como la cepa emblemática que ha impulsado las exportaciones de la industria vitivinícola nacional. Esta variedad ha sido caracterizada por su elevado contenido de polifenoles. La secuenciación de su genoma y la caracterización de sus compuestos, han evidenciado una elevada actividad de vías de biosíntesis de polifenoles galoileados. Estos compuestos podrían tener efectos biológicos diferenciados respecto a los no galoileados, como mejora de la función endotelial y protección frente a enfermedades cardiovasculares. El orujo es un subproducto del proceso de vinificación compuesto por piel y semillas, el cual conserva una elevada proporción de polifenoles. Considerando la alta concentración de polifenoles y que se genera en grandes volúmenes, este subproducto tiene interés de estudio. En este contexto, se analizó la presencia de flavan-3-oles galoileados en semillas de orujo Tannat y Cabernet, y su biodisponibilidad en plasma. Inicialmente, se caracterizaron extractos de semillas de orujo de Tannat (EVT) y Cabernet (EVC) utilizando diferentes concentraciones hidroalcohólicas. De forma complementaria, se cuantificó el contenido total de polifenoles (CPT). Luego, se optimizó una metodología de extracción de flavan-3-oles presentes en plasma. Posteriormente, se evaluó la biodisponibilidad de estos compuestos en modelos animales, mediante la administración de estándares y de extractos. Los resultados posicionan al orujo Tannat como una potencial fuente de flavan-3-oles y flavan-3-oles galoileados, lo cual le da un alto valor agregado y podría ser revalorizado para el desarrollo de nuevas estrategias en salud y nutrición.



5 al 8 de
octubre

Rivera,
Uruguay



VIII Simposio
CEINBIO



Análisis de la interacción entre HMGB1 y Prx1 en distintos estados redox

Constanza V. Hitta ; Sebastian F. Villar ; Gerardo Ferrer-Sueta

Laboratorio de Físicoquímica Biológica, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Montevideo, Uruguay

Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

La HMGB1 es una proteína nuclear, actúa como chaperona del ADN durante la transcripción regulando la expresión génica, Además, participa en procesos extracelulares vinculados a la inflamación. Estructuralmente se compone de dos cajas y una cola ácida. Su secreción está regulada por modificaciones postraduccionales (acetilaciones y fosforilaciones) y por el estado redox de sus cisteínas (C23, C45, C106), proceso en el que se ha propuesto como mediadores a las peroxirredoxinas (como Prx1 y Prx2).

La Peroxirredoxina 1 (Prx1) es una enzima antioxidante con un dominio tipo tiorredoxina que presenta una cisteína peroxidática Cp-SH en el N-terminal y una cisteína resolutive CR-SH en el C-terminal. La unidad catalítica mínima son homodímeros, que pueden asociarse en decámeros dependiendo del estado redox del sitio activo. Debido a su capacidad de interactuar con H_2O_2 y transferir su estado de oxidación a proteínas blanco se ha propuesto como regulador redox de HMGB1.

Este proyecto se enfoca en la interacción entre HMGB1 y Prx1 en distintos estados redox mediante abordaje multitécnico. Incluyendo cromatografía de exclusión molecular en HPLC, donde se evidenció la co-elución de las proteínas. Con dicroísmo circular se observaron cambios en la estructura terciaria de la mezcla de proteínas reducidas, compatible con la formación de complejos. El análisis de tiempo de vida de fluorescencia por fasores mostró desviaciones para la mezcla de proteínas, sugiriendo interacción. Mediante la búsqueda de disulfuros intermoleculares usando bloqueo con N-etilmaleimida y posterior electroforesis nativa no se revelaron bandas correspondientes a complejos estables. Adicionalmente, para identificar regiones de contacto se realizaron ensayos de entrecruzamiento, fotoquímico con $Ru(II)(fen)_3$ no evidenció formación de complejos, mientras que el entrecruzamiento químico de lisinas con BS3 (bis(sulfosuccinimidil)suberato) reveló contacto entre proteínas,



5 al 8 de
octubre

Rivera,
Uruguay



VIII Simposio
CEINBIO



confirmados mediante espectrometría de masas. Estos datos sustentaron modelados tridimensionales, dirigidos a proponer una posible superficie de interacción.



5 al 8 de
octubre

Rivera,
Uruguay



VIII Simposio
CEINBIO



Estudio del oxígeno como modulador de la respuesta oxidativa de macrófagos

Pereyra Domenech, J^{1,2}; Rios, N^{1,2}; Alvarez, M. N^{2,3}; Radi, R^{1,2}; Prolo, C^{1,2}

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UdelaR-; ²Centro de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Medicina, UdelaR.-; ³Departamento de Educación Médica, Facultad de Medicina, UdelaR.

Dentro de la respuesta oxidativa de los macrófagos, la producción de especies oxidantes es dependiente del oxígeno. Estas células cuentan con enzimas como la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la NADPH oxidasa 2 (NOX-2), capaces de sintetizar óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) y superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), respectivamente. Ambas especies son altamente reactivas y capaces de modificar distintas biomoléculas de forma directa o a partir de la formación de derivados como el peroxinitrito (ONOO^-). Al ser mecanismos dependientes de O_2 como sustrato, es importante considerar como el microambiente celular, que puede diferir de las condiciones estándar de cultivo celular (20% O_2 / 5% CO_2). En este trabajo se evalúa el rol del oxígeno en la respuesta oxidativa de macrófagos adaptados 48hs a un rango de presiones de oxígeno ($p\text{O}_2$) entre 1-21%. Si bien se observa menor actividad de la iNOS conforme disminuye la $p\text{O}_2$, se evidenció un aumento compensatorio de la expresión de la iNOS, manteniendo constante la producción de $\cdot\text{NO}$. La cuantificación de ONOO^- mediante boronatos derivados de cumarinas (CBA/CBE) y fluoresceína (FI-B) son ampliamente utilizados, pero están limitados por sus propiedades espectroscópicas, y su labilidad a las variaciones de pH y $p\text{O}_2$ del microambiente celular. Consecuentemente se planteó el desarrollo de dos nuevas sondas derivadas de éster y ácido borónico (Red-BI y RedBII respectivamente), con reactividad similar a las comúnmente utilizadas pero con mayor estabilidad permitiendo complementar y ampliar el uso de las herramientas actualmente disponibles. Se logró sintetizar con éxito RedBI, mientras que RedBII todavía se encuentra en desarrollo. Se evaluó la reactividad de Red-BI con oxidantes biológicamente relevantes, mostrando un comportamiento comparable a otros boronatos. Futuros estudios permitirán validar la sonda como una herramienta para evaluar la formación de peroxinitrito en macrófagos expuestos a distintas $p\text{O}_2$ a través de métodos espectroscópicos y de microscopía.



5 al 8 de
octubre

Rivera,
Uruguay



VIII Simposio
CEINBIO



Identificación y caracterización de nuevas moléculas inhibidoras dirigidas a las proteasas del SARS-CoV-2 con actividad antiviral

Bastidas J.¹; Incerti M.²; Salas C.³; Espinosa-Bustos C.³; Comini M¹; Fló M.^{4,5}; Medeiros A^{1,6}

¹Laboratorio de Biología Redox de Tripanosomas, Institut Pasteur de Montevideo -; ²Laboratorio de Química Farmacéutica, Facultad de Química, Universidad de la República -; ³Facultad de Química y Farmacia, Pontificia Universidad Católica de Chile -; ⁴Unidad Académica Inmunobiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República -; ⁵Laboratorio de Inmunovirología, Institut Pasteur de Montevideo -; ⁶Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República

La replicación del virus SARS-CoV-2 depende de la actividad de sus proteasas virales M^{Pro} y PL^{Pro}. Por ello, se consideran atractivos para el desarrollo de fármacos contra la COVID-19. Un estudio previo de una quimioteca interna del laboratorio identificó más de 100 inhibidores de M^{Pro}, de los cuales el 43% también inhibía PL^{Pro}. Treinta de estos compuestos mostraron actividad antiviral comparable a Lopinavir y Remdesivir [1]. El estudio actual busca completar el cribado y caracterizar la citotoxicidad y el modo de inhibición de los compuestos con actividad antiviral.

Para ello se expresaron y purificaron M^{Pro} y PL^{Pro} de forma recombinante en *E. coli*, su actividad se midió monitoreando la hidrólisis de un sustrato fluorescente. El cribado de 491 compuestos identificó 21 "hits" ($\geq 50\%$ de inhibición a 25 μM). En el ensayo de citotoxicidad en células de pulmón humanas A549, cuatro compuestos afectaron la viabilidad celular. De los "hits" evaluados en células Vero infectadas con SARS-CoV-2, dos mostraron actividad antiviral sin citotoxicidad. Dos familias de compuestos, rotenoides y naftoquinonas, se destacaron por su tasa de éxito contra M^{Pro}. Cuatro rotenoides tuvieron un $\text{CI}_{50, \text{M}^{\text{Pro}}}$ entre 10 y 25 μM y no fueron citotóxicos. Por otro lado, doce naftoquinonas tuvieron un $\text{CI}_{50, \text{M}^{\text{Pro}}}$ de 3 a 15 μM , pero la mayoría fueron citotóxicas. Solo una naftoquinona, mostró verdadera actividad antiviral y mostraron una mayor selectividad por M^{Pro} que por PL^{Pro}. En conclusión, este cribado identificó nuevos "hits", dos de los cuales mostraron actividad antiviral. Los rotenoides y las naftoquinonas son prometedores para ser optimizados por métodos computacionales y así mejorar su potencia y selectividad.

[1] Ruatta SM et al. Improved training data enhances virtual screening for M^{Pro} inhibitors. *Front Pharmacol.* 2023;14:1193282.



5 al 8 de
octubre

Rivera,
Uruguay



VIII Simposio
CEINBIO



Estudio de la función de la proteína TcBola1 en respuesta a estrés en *Trypanosoma cruzi*

Tinagliini R.¹ ; Sanz-Rodriguez CE.² ; Chiribao ML.^{1,2,3}

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

² Programa de Alimentos y Salud Humana, Facultad de Medicina, Universidad de la República

³ Laboratorio de Interacciones Hospedero-Patógeno, Instituto Pasteur de Montevideo.

Las proteínas Bola-like constituyen una familia altamente conservada y extendida tanto en procariontes como en eucariotes. Estudios filogenéticos agruparon estas proteínas en cuatro subfamilias: Bola1, presente en organismos procariontes y eucariotes, Bola2 y Bola3, solamente en organismos eucarióticos y Bola4 únicamente en organismos fotosintéticos.

Esta familia de proteínas se cree que participa en la respuesta oxidativa y el ensamblaje de centros ferrosulfurados.

En el genoma de *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas, usando la cepa Dm28c, han sido identificados dos genes, los cuales están anotados como "Bola-like" y se localizan como genes de copia única. Uno de ellos es TcBola1, cuyo producto génico se corresponde con una proteína de 76 aminoácidos. El segundo gen, identificado como TcBola3, representa otro miembro putativo de esta familia correspondiente a una proteína de 87 aminoácidos.

En este trabajo se tiene como uno de los objetivos la caracterización funcional de TcBola1 en *T. cruzi* utilizando como herramienta parásitos hemí knockout para este gen (TcBola1 +/-). Para esto, en primer lugar, se realizaron curvas de crecimiento comparativas entre líneas de epimastigotas hemí knockout y Wild Type, con el propósito de evaluar el impacto de la deficiencia de esta proteína en la proliferación del parásito. Luego, se realizaron ensayos de infección en células hospedadoras, para poder así determinar posibles alteraciones en la capacidad infectiva asociadas a la pérdida de TcBola1. Finalmente se realizaron ensayos de susceptibilidad al estrés oxidativo y de pH, dado que antecedentes de estudios, llevados a cabo en bacterias, remarcan la participación de dicha proteína en la respuesta al estrés.

Comprender la función de Bola no solo permitirá avanzar en el conocimiento de aspectos fundamentales de la fisiología de *T. cruzi*, sino que también podría abrir nuevas vías para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.



5 al 8 de
octubre

Rivera,
Uruguay



VIII Simposio
CEINBIO



El Modo de Acción y de Resistencia de una molécula candidata Anti-Chagásica N5MTA

Carlos E. Sanz-Rodríguez^{1,2}, Gonzalo Greif², Luisa Berná^{2,3}, Michael P. Barrett⁴, Paul W. Denny⁵, Carlos Robello^{2,6}.

¹Programa de Alimentación y Salud (PAYS). Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

²Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay,

³Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.

⁴Wellcome Trust Centre for Molecular Parasitology, Institute of Infection, Immunity, and Inflammation, College of Medical, Veterinary and Life Sciences, University of Glasgow, Glasgow, United Kingdom.

⁵Department of Bioscience, Durham University. Durham, United Kingdom.

⁶Unidad Académica de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Resumen: La enfermedad de Chagas (EC), causada por el *Trypanosoma cruzi*, es la enfermedad parasitológica más importante de las Américas y, más recientemente, se ha convertido en una de las enfermedades infecciosas globales más relevantes debido a la migración y el calentamiento global. La EC está clasificada como una de las Enfermedades Tropicales Desatendidas, en parte debido a las limitadas opciones de tratamiento disponibles. Actualmente, estas se limitan a dos compuestos nitroheterocíclicos, benznidazol y nifurtimox, que solo son verdaderamente efectivos contra la forma aguda de la enfermedad y presentan efectos secundarios adversos. Por ello, se necesitan urgentemente nuevos fármacos y, en los últimos años, se han identificado algunas pequeñas moléculas prometedoras mediante la evaluación fenotípica masiva. Sin embargo, los estudios sobre el modo de acción (MoA) son necesarios para una mejora racional de estos compuestos tanto en las fases preclínicas como clínicas del desarrollo farmacológico. En este estudio, utilizamos un enfoque de evolución *in vitro* en *T. cruzi* para generar cepas resistentes a N-[4-(2,5-dimetilfenil)-5-metil-1,3-tiazol-2-il] (N5MTA) y así evaluar los modos de resistencia (MoR) y MoA. Dos líneas resistentes generadas mostraron una reorganización estructural del genoma en una región que contiene los genes que codifican la triporoxirredoxina peroxidasa citosólica (c-TXNPx), lo que resultó en una menor expresión de c-TXNPx. Esto sugiere que c-TXNPx regula la potencia de N5MTA, reduciendo el consumo de NADPH. Los análisis metabólicos revelaron que el MoA de N5MTA es sobre las rutas donde la pirofosfato de tiamina (TPP) funciona como coenzima, resultando en un desequilibrio redox en el parásito. Nuestros datos indican un MoA preciso para N5MTA y respaldan su potencial preclínico como candidato anti-Chagas.



5 al 8 de
octubre

Rivera,
Uruguay



VIII Simposio
CEINBIO



Estrategias neuroprotectoras frente a la apoptosis inducida por NGF modificado oxidativamente

Garcimartín S.^{1,2}, Campolo N.^{1,2}, Mastrogiovanni M.^{1,2}, Zeida A.^{1,2}, Varela V.³, Trias E.³, Barbeito L.³, Durán R.⁴, Almeida A.⁵, Radi R.^{1,2}, Delgado-Esteban M.⁵, and Bartesaghi S.^{1,2}.

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; ²Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; ³Laboratorio de Neurodegeneración, Institut Pasteur, Montevideo, Uruguay; ⁴Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable e Instituto Pasteur de Montevideo; ⁵Instituto de Biología Funcional y Genómica, Universidad de Salamanca, CSIC, Salamanca, España.

El Factor de Crecimiento Nervioso (NGF) es una neurotrofina fundamental para la supervivencia neuronal, que señala a través de los receptores TrkA y p75^{NTR}. Sin embargo, el NGF es susceptible a modificaciones oxidativas, como la nitración por peroxinitrito, que lo convierten en un factor pro-apoptótico, capaz de inducir apoptosis neuronal. En este trabajo, evaluamos dos estrategias terapéuticas para atenuar este efecto y estudiamos la formación de NO₂NGF en el contexto de la enfermedad de Alzheimer (AD).

En primer lugar, se evaluaron dos estrategias de intervención para evitar la apoptosis inducida por NO₂NGF. Este último se preparó exponiendo NGF a un flujo de peroxinitrito mediante infusión lenta y fue caracterizado mediante western blot y espectrometría de masas. Luego, cultivos primarios de neuronas fueron tratados con 100 ng/mL de NO₂NGF, en presencia o ausencia de un anticuerpo monoclonal anti-NO₂NGF o de LM11A-31, un antagonista específico de p75^{NTR}. La viabilidad neuronal fue estudiada mediante citometría de flujo, ensayo de actividad caspasa-3 e inmunocitoquímica. Los resultados mostraron que ambas intervenciones redujeron significativamente la muerte neuronal inducida por NO₂NGF, sugiriendo la señalización mediada por p75^{NTR} en la inducción de muerte celular y señalando el potencial de ambas estrategias terapéuticas.

Para evaluar la relevancia de estos hallazgos en el contexto de la enfermedad, se trataron neuronas con oligómeros de A β ₂₅₋₃₅ a 10 μ M. La formación de peroxinitrito fue detectada mediante la sonda fluoresceína boronato, y la formación de NO₂NGF fue analizada por inmunocitoquímica. Los resultados mostraron un aumento tanto en la formación de peroxinitrito como en la nitración de NGF.



5 al 8 de
octubre

Rivera,
Uruguay



VIII Simposio
CEINBIO



En conjunto, estos datos sugieren un rol del NO₂NGF en la neurotoxicidad inducida por A β y presentan al NO₂NGF y p75^{NTR} como blancos terapéuticos para la AD. Actualmente, nos encontramos estudiando la relevancia de estos hallazgos en un modelo *in vivo* de AD.



5 al 8 de
octubre

Rivera,
Uruguay



VIII Simposio
CEINBIO



Evaluación del potencial senoterapéutico de una molécula con propiedades antiinflamatorias

Chacón E.¹; Martínez J.¹; Ingold M.^{2,3}; Di Domenico M.⁴; Porcal W.^{2,3}; López V.^{2,3}; Batthyány C.³; Escande C.⁵; Quijano C.¹

¹Universidad de la República, Departamento de Bioquímica y Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Facultad de Medicina, Montevideo, Uruguay.;

²Universidad de la República, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Montevideo, Uruguay.; ³Institut Pasteur de Montevideo, Laboratorio de Biología Vasculare y Desarrollo de Fármacos, Montevideo, Uruguay.; ⁴Universidad de la República, Unidad de Microscopía Confocal y Epifluorescencia (UMCE), Facultad de Medicina, Montevideo, Uruguay.; ⁵ Institut Pasteur de Montevideo, Laboratorio de Patologías del Metabolismo y el Envejecimiento, Montevideo, Uruguay.

Las células senescentes presentan un fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP, por sus siglas en inglés) que puede desempeñar un papel importante en la patología de diversas enfermedades asociadas al envejecimiento, incluido el cáncer. Por esta razón, la senescencia se ha convertido en una diana atractiva para el descubrimiento y desarrollo de agentes terapéuticos conocidos como senoterapéuticos. El salicilato presenta actividad antiinflamatoria mediante la inhibición de NF- κ B. En este trabajo se evaluó el potencial senoterapéutico del salicilato y de un compuesto derivado del salicilato (IP2) generado por una empresa uruguaya, en un modelo de senescencia inducida por el quimioterapéutico temozolomida (TMZ) en células de melanoma murino. Los resultados mostraron que IP2 y el salicilato no afectan la viabilidad celular de células senescentes ni de control ($IC_{50} > 600 \mu\text{M}$), ni la actividad de la β -galactosidasa asociada a senescencia. Sin embargo, el compuesto IP2 (100 μM) y el salicilato (100 μM) inhibieron más del 50% la secreción de la interleuquina 6 (IL-6), uno de los principales componentes del SASP. Respecto al mecanismo de acción, los resultados sugieren que el salicilato actúa a nivel transcripcional mientras que el IP2 a nivel postranscripcional. Además, se observó que ninguno de los compuestos inhibió la activación por fosforilación, ni la translocación nuclear de factor nuclear kappa B (NF- κ B), regulador central del SASP. En conjunto, los resultados sugieren que el compuesto IP2 y el salicilato son capaces de inhibir la secreción de componentes del SASP sin revertir otros aspectos de la senescencia, lo que apoya su posible rol como moléculas senomórficas. No obstante, se requieren más estudios para determinar con precisión su mecanismo de acción, su impacto sobre otros componentes del SASP y su potencial como senoterapéuticos en *in vivo*.



5 al 8 de
octubre

Rivera,
Uruguay



VIII Simposio
CEINBIO



Durante la cicatrización de células de endotelio de córnea, cambia la expresión de NOX1 y NOX4 dependiendo de la modalidad de migración

Souto M.¹; Schaffner M.¹; Justet C.1

¹Dpto. de Bioquímica, CEINBIO, Facultad de Medicina

Resumen en: Arial regular 12. Máximo de 300 palabras. Interlineado simple.

La cicatrización involucra gran cantidad de señales y tipos celulares. Para facilitar su estudio frecuentemente se utilizan modelos celulares en cultivo. En 2007, Grasso y colaboradores mostraron que la modalidad de migración durante la cicatrización de células de endotelio de córnea bovino (BCEC) en cultivo depende de la matriz extracelular (ECM). En presencia de ECM las BCEC en cultivo migran por modalidad lamelipódica mientras que, en ausencia de matriz migran formando un cordón de actomiosina contráctil. Por otra parte, se ha demostrado que en el endotelio de córnea la actividad de la NADPH oxidasa 4 (NOX4) tiene efecto negativo sobre la transparencia y capacidad de cicatrización de la córnea. Asimismo, se ha encontrado que la onda fugaz de calcio (FCW) que se produce inmediatamente luego de una lesión, activa NADPH oxidasas en algunos modelos de cicatrización.

En nuestro laboratorio hemos estudiado los cambios de expresión de NOX1 y NOX4 durante la cicatrización de BCEC en cultivo en ausencia y presencia de ECM. Hemos encontrado que la expresión de NOX4 aumenta en el borde de la herida independientemente de la modalidad de cicatrización. Mientras que, la expresión de NOX1 en el borde disminuye en ausencia de matriz, pero aumenta si las células migran sobre ECM. Asimismo, hemos analizado el rol de la FCW sobre los cambios de expresión de estas proteínas. Nuestros ensayos utilizando un antagonista de la SERCA o de la fosfolipasa C sugieren que la FCW es responsable de los cambios de expresión observados para NOX1 y NOX4. Por otro lado, usando antagonistas para las PKC y CaMKII encontramos que la expresión de NOX1 cambia por acción de la PKC y NOX4 dependiendo de la CaMKII.

En conjunto nuestros resultados sugieren que la FCW estimula cambios de expresión de NOX1 y NOX4 durante la cicatrización de BCEC en cultivo.



5 al 8 de
octubre

Rivera,
Uruguay



VIII Simposio
CEINBIO



Interfering thiol-redox metabolism of *Leishmania* with drug-like molecules

Benítez D.¹; Medeiros A.^{1,2}; Castro A.³; Miranda P.³; Pardo H.³; Carrión F.⁴; Orban O.⁵; Comini M.A.¹

¹Laboratory Redox Biology of Trypanosomes. Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay. ²Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UDELAR, Uruguay. ³Centro NanoMat, DETEMA, Instituto Polo Tecnológico de Pando, Facultad de Química, UDELAR, Uruguay. ⁴Protein Biophysics Unit, Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay; ⁵Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie, Technische Universität Braunschweig, Germany.

dbenitez@pasteur.edu.uy

Trypanothione provides reducing power to a manifold of biosynthetic, regulatory and protective pathways in trypanosomatids. Trypanothione synthetase (TryS) catalyzes the ATP-dependent biosynthesis of T(SH)₂ by stepwise ligating two molecules of glutathione to the terminal amines of spermidine. TryS ranks as one of the top drug molecular targets within the redox system of trypanosomatids because of lack of homologs in mammals, its essential role and druggability (1). Our laboratory led a drug discovery campaign against TryS from pathogenic trypanosomatids involving: i) medium- and high throughput screening of drug-focused or large drug-like libraries (2-4), ii) *in silico* screening followed by experimental validation (5), iii) phenotypic screening against the clinically relevant stages of trypanosomatids using state-of-the art bioluminescent assays (6-8); iv) on-target effect of the most relevant hits using chemical, reverse genetic techniques and/or redox biosensors (3, 9, 10). A promising drug-like molecule of the family 3-chloro-kenpauillone was found active against *Leishmania spp.* Biochemical (mode of inhibition and binding) and biological properties of this scaffold was optimized through iterative cycles of synthesis and evaluations (3, 10). The most promising hit was subjected to *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* (therapeutic efficacy) studies in models of Visceral leishmaniasis.

References: (1) Manta et al. *Antioxid Redox Signal* 2018; (2) Benítez et al. *PLoS Negl Trop Dis* 2016. (3) Benítez et al. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2022; (4) Phan et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 2022; (5) Alice et al. *Mol Divers*, 2021; (6) Benítez et al. *Drug Dev Res*, 2019; (7) Benítez et al. *Methods Mol Biol*, 2022; (8) Quiroga et al. *Front Chem Biol*, 2024; (9) Mesías et al. *Free Radic Biol Med*, 2019; (10) Medeiros & Benítez et al. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2020.

Acknowledgments: DYCIT-MEC-FVF_2023_441; PEDECIBA; CSIC_3404 FOCM_COF_03/11; Pasteur Network_ACIP_17-2015; German BMBF (KMUinnovativ 5)_0315814 and DFG_KU 1371/9-1.



5 al 8 de
octubre

Rivera,
Uruguay



VIII Simposio
CEINBIO



Structural and proteomic characterization of MetSO-cytochrome c in cellular contexts

Herrera L.¹, Mastrogiovanni M.¹, Pose M.¹, Zeida A.¹, Piacenza L.¹, Radi R.¹

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina and CEINBIO, Universidad de la República, Uruguay

Cytochrome c (cyt c) is a mitochondrial protein located in the intermembrane space, where it plays a central role in electron transport within the respiratory chain. In the cytosol, cyt c functions as a pro-apoptotic factor. Under oxidative stress, cyt c undergoes structural modifications that potentially redirecting its function toward alternative cellular roles. This conformational change can be specifically recognized by the R1D3 antibody and is recapitulated by oxidation of methionine-80, yielding the MetSO-cyt c proteoform. Previous findings from our research group demonstrated that MetSO-cyt c, when delivered to cells via micropinocytosis, is translocated to the nucleus and does not induce apoptosis.

The objective of this study is to investigate the structural changes associated to MetSO-cyt c and to elucidate the functional implications characterize the proteomic changes of this proteoform within the cellular context.

Were generated MetSO-cyt c and apo-cyt c and structural characterization was conducted using UV-vis spectrophotometry, circular dichroism and mass spectrometry.

In order to study the biological implications of MetSO-cyt c, micropinocytosis assays were performed in HeLa cells. Proteomic analyses of cell lysates were conducted to evaluate protein-level changes. Early time points (4 h) were assessed using native cyt c and MetSO-cyt c, while 24 h time points included MetSO-cyt c and a control condition. Protein extraction was followed by trypsin digestion and triplicate analysis using the ZenoTOF7600 system (SCIEX). Chromatographic separation was performed on a reversed-phase bioZen column using an acetonitrile gradient. Data-dependent acquisition was executed in positive mode and bioinformatic analysis was carried out using PatternLab for Proteomics V5. The present work shows the protein identification and differential expression analysis, which will be validated through additional biological replicates and subsequent biochemical assays.

This framework aims to elucidate the alternative conformation of cytochrome c and its functional implications at the cellular level.



5 al 8 de
octubre

Rivera,
Uruguay



VIII Simposio
CEINBIO



MV14: un compuesto liberador de óxido nítrico como agente terapéutico frente al cáncer de vejiga

López M.^{1,6}; **Varela M.**⁶; **Ingold M.**⁶; **Perelmuter K.**²; **Bollati-Fogolín M.**²; **Fernández M.**³; **Fontes F.**³; **Breijo M.**³; **Reyes L.**⁴; **Bentura M.**⁴; **Savio E.**⁴; **Ramírez J.**⁵; **Yozzi V.**⁵; **Romero C.**⁵; **Verdes J. M.**⁵; **López G. V.**^{6,7}; **Hernández P.**¹

¹Departamento de Genética, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, MEC. ²Cell Biology Unit, Institut Pasteur Montevideo. ³Unidad de Reactivos y Biomodelos de Experimentación (URBE), Facultad de Medicina, Udelar. ⁴Centro Uruguayo de Imagenología Molecular (CUDIM). ⁵Unidad de Patología, Departamento de Patobiología, Facultad de Veterinaria, Udelar. ⁶Laboratorio de Síntesis Orgánica y Desarrollo de Fármacos, Institut Pasteur Montevideo. ⁷Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Udelar.

El cáncer de vejiga (CV) es una neoplasia frecuente caracterizada por elevadas tasas de recurrencia y resistencia a los tratamientos convencionales, lo que resalta la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas. Los agentes liberadores de óxido nítrico emergen entre las estrategias más prometedoras para el tratamiento de esta patología. En este contexto, nuestro grupo de investigación ha identificado el compuesto liberador de óxido nítrico **MV14** como un potencial agente frente a esta patología por su elevada actividad antiproliferativa y selectividad hacia células derivadas de cáncer de vejiga. En este estudio hemos explorado el posible modo de acción de **MV14**, observando que modula los niveles del factor de transcripción NF-κB generando una reducción de los niveles de expresión de survivina, una proteína clave en el desarrollo y progresión del CV. Con el fin de evaluar su posible aplicación terapéutica, realizamos ensayos de mutagenicidad que confirmaron la seguridad del compuesto, permitiendo desarrollar de un modelo murino ortotópico de CV inducido con BBN en el cual determinamos la actividad antitumoral de **MV14** a través de tratamientos intravesicales secuenciales con el compuesto. El desarrollo del CV fue monitoreado mediante imagenología de resonancia magnética (MRI). La progresión de la enfermedad se analizó a través de estudios histopatológicos. Los resultados revelaron una disminución en la disrupción del urotelio, lo que indica que **MV14** posee un efecto antitumoral en el cáncer de vejiga. En conjunto, estos hallazgos refuerzan el potencial de los liberadores de óxido nítrico como moléculas prometedoras para el desarrollo de una nueva terapia dirigida a los mecanismos subyacentes del desarrollo del CV.



5 al 8 de
octubre

Rivera,
Uruguay



VIII Simposio
CEINBIO



Desarrollo y evaluación de compuestos obtenidos a partir de biomasa como agentes fotoprotectores frente a la radiación UVA y UVB

Sanders-Pons A.¹; López M.^{1,2}; Pallas G.¹; Tassano T.²; Porcal W.²; López G. V.²; De la Sovera V.²; Hernández P.¹

¹Departamento de Genética, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Ministerio de Educación y Cultura.

²Laboratorio de Síntesis Orgánica y Desarrollo de Fármacos, Institut Pasteur de Montevideo.

La radiación ultravioleta (UV) induce daño en el ADN y estrés oxidativo, lo que favorece el fotoenvejecimiento celular y el desarrollo de cáncer de piel. Los fotoprotectores derivados de petróleo de uso actual presentan algunos efectos adversos para la salud humana y el ambiente. Estudios recientes describen las propiedades fotoprotectoras e inocuidad de derivados de biomasa que los hacen prometedores sustitutos de los filtros UV de uso común. El principal objetivo de nuestro trabajo es la síntesis y evaluación biológica de nuevas moléculas obtenidas a partir de derivados de biomasa lignocelulósica y en condiciones de química verde, que sean capaces de ejercer un efecto fotoprotector frente a la radiación UV. Para esto se evaluó una quimioteca de más de 40 compuestos, seleccionando aquellos capaces de absorber en el rango UVA/UVB y ser fotoestables. Se determinó la citotoxicidad en la línea celular derivada de queratinocitos HaCaT por el método de MTT y con los fluorocromos AO/PI. La actividad antioxidante fue evaluada mediante las técnicas espectrofotométricas ABTS y ORAC-FL, así como también mediante la técnica DCFH-DA por microscopía confocal. La evaluación del daño en el ADN se realizó mediante ensayos de inmunocitoquímica mediante la marcación de fracturas en el ADN por γ -H2AX y a la formación de dímeros de pirimidina (CPD), lo que permitió determinar el efecto protector de los compuestos frente a lesiones genómicas específicas. Finalmente, se determinó el efecto estrogénico *in silico* e *in vitro* en la línea celular MCF-7. Se emplearon como referencia el octinoxato y la avobenzona, moléculas derivadas del petróleo utilizadas en filtros solares comerciales. Se identificaron compuestos fotoestables frente a la radiación UVA/UVB que no presentaron citotoxicidad y mostraron un efecto fotoprotector superior a los compuestos de referencia. En suma, los compuestos derivados de biomasa son potenciales fotoprotectores frente a la radiación UV.



5 al 8 de
octubre

Rivera,
Uruguay



VIII Simposio
CEINBIO



Secreción de vesículas extracelulares con componentes mitocondriales en la senescencia inducida por la quimioterapia en melanoma

Grünwaldt Guillermo¹, Goñi Magdalena¹, Fagúndez Pablo², Tosar Juan Pablo^{2, 3}, Celia Quijano¹, Martínez Jennyfer¹

1. Universidad de la República, Departamento de Bioquímica y Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Facultad de Medicina, Montevideo, Uruguay.

2. Universidad de la República, Unidad de Bioquímica Analítica, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Montevideo, Uruguay. 3. Institut Pasteur de Montevideo, Laboratorio de Genómica Funcional, Montevideo, Uruguay.

La quimioterapia y otros agentes que dañan el ADN pueden inducir senescencia tanto en células tumorales como no tumorales, y estas células senescentes se asocian a diversos efectos adversos del tratamiento. Se trata de células no proliferativas que secretan factores capaces de contribuir al desarrollo de múltiples patologías. Dentro de este secretoma senescente se incluyen biomoléculas solubles (proteínas, ácidos nucleicos, lípidos) y vesículas extracelulares (EVs).

Nuestro grupo investiga la senescencia inducida por temozolomida, un agente alquilante, en células de melanoma murino. Mediante proteómica shotgun caracterizamos el fenotipo secretor de las células senescentes e identificamos proteínas con propiedades inmunosupresoras, potencialmente implicadas en la progresión tumoral y en la respuesta a la quimioterapia. El análisis de enriquecimiento de vías mostró una representación significativa de compartimentos asociados a EVs y exosomas, lo que motivó evaluar su secreción en este modelo.

Las EVs se aislaron de células senescentes y no senescentes mediante cromatografía de exclusión por tamaño, y se caracterizaron en un analizador de partículas por pulsos resistivos (MRPS). Las células senescentes liberaron una mayor cantidad de EVs por célula que las células control, con un tamaño predominante de 70–100 nm. El western blot confirmó la presencia de los marcadores CD81, TSG101 y ALIX en las fracciones con EVs. Además, detectamos componentes mitocondriales (como SDHa y ADN mitocondrial) en dichas fracciones.



5 al 8 de
octubre

Rivera,
Uruguay



VIII Simposio
CEINBIO



En conjunto, nuestros resultados muestran que la senescencia inducida por temozolomida en células de melanoma se asocia a un aumento en la secreción de EVs y a la incorporación de proteínas y ADN mitocondrial en ellas, lo que sugiere que las células senescentes podrían liberar componentes mitocondriales (o incluso mitocondrias enteras) a través de estas vesículas. Estos hallazgos abren nuevas líneas de investigación sobre las propiedades de las EVs senescentes y su impacto en el microambiente tumoral.



5 al 8 de
octubre

Rivera,
Uruguay



VIII Simposio
CEINBIO



Cinética y mecanismos de tiolación de peroxirredoxina 3 mitocondrial

Nicolás Viera¹, **Lucía Turell**², **Giuliana Cardozo**¹, **Mauricio Mastrogiovanni**¹, **Ivan Gout**³, **Rafael Radi**¹, **Madia Trujillo**¹

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina y Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Universidad de la República, Uruguay; ²Laboratorio de Enzimología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay;

³Department of Structural and Molecular Biology, University College London, London WC1E 6BT, UK

La peroxirredoxina 3 (Prdx3) es una peroxidasa dependiente de tioles que cataliza la reducción de diferentes hidroperóxidos. Se expresa en la matriz mitocondrial y el espacio intermembrana y puede ser reducido por tiorredoxina 1 (Trx1), tiorredoxina 2 (Trx2) y glutarredoxina 2 (Grx2). La enzima se ha detectado formando disulfuros mixtos con glutatión (GSH) y con coenzima A (CoA) en modelos celulares o animales de estrés oxidativo. Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos y la cinética de las reacciones de Prdx3 con glutatión y CoA, tioles de bajo peso molecular presentes en la matriz mitocondrial a concentraciones en el rango milimolar.

La prdx3 oxidada a ácido sulfénico (Prdx3-SOH) reaccionó con GSH y con CoA con constantes de velocidad de 64 M⁻¹s⁻¹ a pH 7.8 y 1173 M⁻¹s⁻¹ a pH 7.4, respectivamente. Además, GSH y CoA reaccionaron con la forma disulfuro de Prdx3 para formar formas tioladas de Prdx3. Los disulfuros mixtos de Prdx3 con el tiol correspondiente se detectaron tanto por western blot como por espectrometría de masas. Grx2 redujo la forma glutationilada de Prdx3 y catalizó la reducción de Prdx3 en presencia de GSH. Aunque se reportó que algunas tiorredoxinas y proteínas relacionadas con la tiorredoxina reducen los disulfuros mixtos de proteínaS-S-CoA, Grx2 no redujo Prdx3S-S-CoA, aunque tabto Trx1 como Trx2 pudieron reducir el disulfuro mixto de Prdx3 con CoA. La CoA inhibió la oxidación de NADPH en un ensayo acoplado utilizando tiorredoxina reductasa, Trx1, Prdx3 y 50 μM H₂O₂. A concentraciones más altas de H₂O₂, se evidenció el efecto protector del CoA contra la hiperoxidación de Prdx3.



5 al 8 de
octubre

Rivera,
Uruguay



VIII Simposio
CEINBIO



Consecuencias estructurales y funcionales de la nitración de tirosina en la chaperona Hsp90

Taboada A.^{2,3,4}; Chatterjee T.¹; Radi R.^{3,4}; Zeida, A.^{3,4}; Franco MC^{5,6}

¹Department of Biochemistry and Biophysics, Oregon State University, U.S.A;

²Departamento de Métodos Cuantitativos, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay; ³Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay; ⁴Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay; ⁵Center for Translational Science, Florida International University, U.S.A; ⁶Department of Cellular and Molecular Medicine, Herbert Wertheim College of Medicine, Florida International University, U.S.A

La tirosina es un aminoácido aromático con un anillo fenólico. Su nitración consiste en sustituir el hidrógeno en la posición 3 del anillo por un grupo nitro. Esta modificación postraduccional puede alterar funciones celulares al modificar la estructura proteica. Una de las proteínas humanas particularmente sensibles es la chaperona Hsp90, miembro de una familia conservada que participa en la homeostasis y en la respuesta al estrés celular. La Hsp90 actúa como un homodímero con tres dominios: el N-terminal, con actividad ATPasa; el dominio medio, que interactúa con proteínas y cofactores; y el C-terminal, esencial para la dimerización. Su ciclo catalítico depende de cambios conformacionales, como la apertura y cierre del dímero y la dinámica del ATP-lid.

Estudios de nuestros colaboradores demostraron que la nitración de un único residuo de la tirosina en la Hsp90 puede inducir la muerte de motoneuronas. En particular, las nitraciones en las posiciones 33 y 56 generan una ganancia de función tóxica que promueve neurodegeneración, mientras que la nitración en la tirosina 33 reduce el metabolismo mitocondrial, crítico en células tumorales. Así, según el contexto celular, diferentes estados nitrados de la Hsp90 regulan aspectos distintos del metabolismo. Sin embargo, los cambios estructurales y dinámicos asociados a esta modificación aún no están caracterizados.

El objetivo de este proyecto fue explorar las bases moleculares que vinculan la nitración de tirosinas clave con alteraciones estructurales y funcionales de la Hsp90. Para ello, se emplearon simulaciones de dinámica molecular que permitieron observar con resolución atómica las consecuencias de esta modificación. La comprensión de estos mecanismos contribuirá a explicar cómo una oxidación postraduccional puede conferir una función tóxica y abrirá la puerta a posibles estrategias de intervención terapéutica.



5 al 8 de
octubre

Rivera,
Uruguay



VIII Simposio
CEINBIO



Entendiendo la modulación de propiedades clave y los mecanismos de activación y acción de profármacos antitumorales de Pt(IV)

Salazar F.¹; Coitiño, E.L¹

¹Laboratorio de Química Teórica y Computacional, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias y Centro de Investigaciones Biomédicas (CeInBio), Universidad de la República, Iguá 4225, Montevideo 11400, Uruguay

Los compuestos de Pt(IV) han sido propuestos como profármacos antitumorales por sus posibles ventajas frente a los análogos de Pt(II). La naturaleza de sus ligandos, en especial los axiales (L/L'), es una de las claves para modular su actividad biológica y la incorporación de L/L' bioactivos ha mostrado causar efectos sinérgicos que emulan a las terapias de combinación. Se reconoce que la naturaleza de L/L' modula propiedades críticas de estos compuestos, como su interacción con proteínas plasmáticas y la activación por reducción disociativa, que en última instancia determinan la llegada del metabolito activo de Pt(II) al ADN nuclear (y su eventual unión previa a Histona H1). Los mecanismos que gobiernan tal modulación no están completamente elucidados y a su conocimiento se buscó aportar en la tesis doctoral aquí resumida. Mediante modelado computacional de la estructura molecular —incluyendo métodos DFT/PCM-IEF y cribado *in silico*, simulaciones de dinámica molecular MD y enfoques QM/MM— se exploró el papel de los ligandos sobre propiedades intrínsecas de una serie de profármacos de Pt(IV), su transporte por albúmina sérica humana (HSA) con una selección representativa y las reacciones entre HSA-Cisplatino tras su activación anticipada en torrente sanguíneo, y la propia activación por agentes reductores presentes en distintos compartimientos del organismo. Los resultados muestran por una parte que: **(a)** la naturaleza de su esfera de coordinación toda —con mayor peso sus ligandos salientes ecuatoriales— modula el perfil fisicoquímico de estos compuestos, mientras que **(b)** el par L/L' define su interacción con HSA —respaldando su papel transportador de estas especies, especialmente para L/L' semejantes a ácidos grasos FA— y **(c)** tras la reducción anticipada, como reservorio/inactivador de Pt(II) —donde accesibilidad y reactividad de los residuos His/Met modulan los sitios de unión principal, afectados además por la presencia de FA ó similares— con un mecanismo de reacción donde la disposición inicial del cisplatino, la presencia de moléculas de agua y restricciones al cloro saliente definirían si HSA actúa como reservorio o inactivador. Finalmente, el modelado DFT/PCM de la activación de especies de Pt(IV) sustenta **(d)** una propuesta mecanística novedosa que involucra en su paso limitante a los tiolatos de Cys/Hcy/GSH y agua y cuya cinética TST/VTST es modulada por la asincronía del TS de forma acorde al conocimiento empírico reportado para la serie y **(e)** la corroboración para ascorbato de un mecanismo donde la naturaleza de L/L' modula las barreras de reacción y los eventos de formación/ruptura.



5 al 8 de
octubre

Rivera,
Uruguay



VIII Simposio
CEINBIO



4-Quinolona vs 4-Hidroxiquinolina: Análisis de los efectos del medio sobre el par ceto-enol y la reactividad de un motivo de reconocida actividad biológica

Delgado F.^{1,2}; Romero A.²; Coitiño E.L.¹

¹Laboratorio de Química Teórica y Computacional (LQTC) y ²Grupo de Química Orgánica Medicinal, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Igúá 4225, Montevideo 11400, Uruguay

Desde la década de los 60, el núcleo estructural de *4-quinolona* viene siendo considerado por su actividad biológica en distintas especies, siendo un esqueleto químicamente versátil, que puede modificarse prácticamente en todas sus posiciones según estrategia seguida.^[1] Como núcleo farmacofórico privilegiado en biomedicina, buscando diversos perfiles de actividad (*antimicrobiano, antitumoral, anti/prooxidante en hemólisis, etc.*) ha dado lugar a miles de derivados y un gran volumen de información a racionalizar.^[1,2] En solución establece tautomerismo ceto-enólico con *4-hidroxiquinolina*, equilibrio sensible a las condiciones, a considerar al valorar disponibilidad y reactividad de cada tautómero y su mezcla hacia la producción de nuevos derivados.^[3] Aquí se examinó *in silico* la termodinámica a 298.15K del par *4-oxoquinolina:4-hidroxiquinolina* y su reactividad en formas neutra y O/N-protonada en medios de diferente polaridad ($\epsilon=2-78$) describiendo la estructura geométrica y electrónica a nivel DFT/IEFPCM con Gaussian16. La capacidad de reconocimiento molecular y sitios de protonación se evaluaron con el MEP mapeado sobre la superficie molecular, afinidades protónicas e índices de Wiberg de los pares O–H⁺/(HN)–H⁺ y (HO)–H⁺/N–H⁺. El análisis mostró que mientras el tautómero 4-oxo predomina en forma neutra, la estabilidad del par se invierte bajo protonación, con modulación del medio. La reactividad se evaluó con descriptores de la DFT conceptual globales (*dureza/blandura, η/S*) y locales/regionales (*función de Fukui f^- de pérdida electrónica mapeada y condensada; blandura local s*) concluyendo que sólo los sistemas neutros muestran diferencias sustantivas entre tautómeros, atenuadas tras su protonación, que restringe la cantidad de centros de ataque electrofílico, más allá del medio. Todo esto corrobora y extiende el conocimiento detallado relevante hacia plantear y racionalizar nuevas estrategias de producción de derivados de estos motivos y explicar la regioselectividad reportada en su nitración.^[4]

[1] Sissi C & Palumbo M. *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents* **2003**, 3(6), 439-450. || [2] Liu Z-Q, Han K, Lin Y-J, Luo X-Y. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, 1570(2), 97-103. || [3] Horta P, Kuş N, Henriques MSC, Paixão JA, Coelho L, Nogueira F, O'Neill PM, Fausto R, Cristiano MLS. *J. Org. Chem.* **2015**, 80(24), 2244-12257. || [4] Schofield K. *Quarterly Rev. Chem. Soc.* **1950**, 4(4), 382-403.



5 al 8 de
octubre

Rivera,
Uruguay



VIII Simposio
CEINBIO



¿Cómo influye la polaridad del entorno en la etapa limitante del mecanismo catalítico de la NADH-fumarato reductasa de *T. cruzi*?

Schmidt-Smerdiner J.¹; Salazar F.¹; Coitiño E. L.¹

¹Laboratorio de Química Teórica y Computacional (LQTC), Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias y Centro de Investigaciones Biomédicas (CelnBio), Universidad de la República, Iguá 4225, Montevideo 11400, Uruguay.

La enzima fumarato reductasa del parásito *T. cruzi* (**NADH-TcFR**) cataliza la conversión anaerobia de fumarato a succinato, con la concomitante conversión de su cofactor NADH a NAD⁺ y participación directa de un residuo Arg de su dominio catalítico. Desde hace una década y media nuestro grupo viene aportando al conocimiento de estructura y dinámica de esta enzima, proponiendo modelos 3D (*Merlino & Coitiño, 2014; Salazar & Coitiño, 2023*) utilizados hacia el diseño racional de inhibidores selectivos con acción antichagásica y para avanzar en la comprensión detallada del mecanismo catalítico (*Sastre & Coitiño, 2017*) a partir de un modelo de mínima del sitio activo derivado de nuestra primera predicción estructural. La transformación del sustrato se lograría así en dos etapas sucesivas con participación de moléculas de agua que estabilizan su doble carga negativa: **(a)** transferencia de un H⁺ desde el C4 nicotinámico acoplada a la transferencia de 2e⁻ del anillo nicotinamida del NADH al doble enlace central del fumarato; **(b)** rotación interna y transferencia protónica post-TS al intermediario formado en **(a)** desde el residuo Arg clave para formar succinato.

En este trabajo se determinó la sensibilidad a la variación de polaridad del entorno circundante al sitio activo de aspectos clave del mecanismo catalítico previamente propuesto para **NADH-TcFR** con el modelo reducido del sitio activo. Así se modeló a nivel DFT/IEFPCM la estructura geométrica y electrónica de cada una de las especies participantes, estables e inestables (*complejo de Michaelis, TS1, conformeros intermediarios, TS2 y productos*) y los caminos de reacción IRC que las conectan en 5 medios diferentes con constantes dieléctricas en el rango $\epsilon = 78-10$. Estos estudios permiten determinar la modulación ejercida globalmente por el medio sobre el avance del proceso al llegar al primer estado de transición y la termoquímica y cinética de esta etapa limitante.