

DNasa I EN CÉLULAS DEL CRISTALINO BOVINO

De María, A. y Arruti, C.

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

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

MODULACIÓN DEL CICLO CELULAR POR EL PAPILOMAVIRUS HUMANO

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

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

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

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

Navillat, M

Cátedras de Reumatología y Bioquímica, Facultad de Medicina.

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

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

Thomson, L.¹, Denicola, A.² y Radi, R.³

¹Enzimología, Facultad de Ciencias

²Fisicoquímica Biológica, Facultad de Ciencias

³Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República.

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

ROL DEL METABOLISMO DE LAS POLIAMINAS EN *TRYPANOSOMA CRUZI*

Peluffo, G., Piacenza, L. y Radí, R.

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República gonzapel@fmed.edu.uy

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