

NeoQ, el valor agregado al LAMP

*Adali Pecci, Javier Tiffenberg, Luciana Rocha Viegas, Nicolas Pregi,
Oscar Filevich, Roberto Etchenique.*

NeoQ permite cuantificar la evolución en tiempo real de las reacciones de kits LAMP que utilizan absorción colorimétrica. Permite al operador clasificar reacciones positivas y negativas, suministrando mucha más información que sólo el "end point" o estado final de la reacción. La tecnología NeoQ se basa en un dispositivo óptico-electrónico con software incluido y el know-how necesario para que el adoptante pueda fabricarlo a escala comercial y distribuirlo como acompañamiento para la interpretación de los resultados de los tests colorimétricos basados en tecnología LAMP. NeoQ revaloriza todos los tests colorimétricos en solución, tanto para diagnóstico de COVID19, como otras enfermedades que puedan diagnosticarse mediante la detección molecular de cualquier otro virus o fragmento de ácido nucleico para los cuales se especifique la amplificación LAMP, e.g. Dengue, Chagas, zoonosis, enfermedades de los cultivos, etc.



OPTIMIZACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE INTERÉS BIOTECNOLÓGICO EN SEMILLAS DE *ARABIDOPSIS THALIANA*.

Mora, Emilia^{1,2}; Ibañez, Itatí²; Gudesblat, Gustavo¹.

¹ CONICET-Universidad de Buenos Aires, Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular - Instituto de Biociencias, Biotecnología y Biología Translacional (IB3), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Intendente Güiraldes 2160, Buenos Aires, Argentina. ²CONICET -Universidad de Buenos Aires, Instituto de Química Física de los Materiales, Medio Ambiente y Energía (INQUIMAE), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Intendente Güiraldes 2160, Buenos Aires, Argentina.

La papa es un alimento tradicional en nuestro país, se consumen aproximadamente 60 kg/cápita/año. Los principales virus que afectan a este cultivo son virus de la papa Y (PVY), el virus de la papa X (PVX), y el virus del enrollamiento de la hoja de la papa (PLRV). PVY es un virus que posee un genoma de ARN de cadena simple de unos 10 kb, infecta principalmente a solanáceas y causa grandes pérdidas de rendimiento en los cultivos de papa, tabaco y pimienta. La detección de PVY en papas semilla es obligatoria por el SENASA. Actualmente las pruebas de detección se realizan a mediante kits de ELISA importados, a través de la inmunodetección de la proteína de la cápside (CP) del virus con anticuerpos policlonales o monoclonales.

Las plantas constituyen un sistema de bajo costo y fácilmente escalable para la producción de proteínas recombinantes como anticuerpos o sus fragmentos, aplicables al desarrollo de sistemas de diagnóstico. En particular, se las ha empleado con éxito para la producción de nanoanticuerpos (NAcs) en semillas. En este proyecto proponemos generar NAcs capaces de reconocer a la proteína CP de PVY, y producirlos a bajo costo en semillas de la planta *Arabidopsis thaliana*. Tales anticuerpos se utilizarán para el desarrollo de sistemas de inmunodiagnóstico basados en ELISA u otras técnicas que utilicen anticuerpos, como biosensores o ensayos de flujo.

Hasta el momento se logró expresar la proteína CP en bacteria *Escherichia coli*, la cual será utilizada para inmunizar una llama y realizar una biblioteca inmune a partir de la cual se podrán seleccionar los genes codificantes de NAcs específicos mediante la técnica de *biopanning*.

CIANOTOX. UN ENSAYO DE INHIBICIÓN DE PROTEÍN FOSFATASAS OPTIMIZADO PARA HACER ACCESIBLE LA DETECCIÓN DE MICROCISTINAS.

Alba Posse, Jorge Ezequiel^{1,2}; *Gonzalez, Carolina*^{4,5}; *Carriquiriborde, Pedro*^{2,3}; *Nadra, Alejandro*^{1,2}; *Gasulla Javier*^{1,2,3}

1. *Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular, Instituto de Biociencias, Biotecnología y Biología Traslacional (iB3), Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina*

2. *Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Godoy Cruz 2290, C1425FQB Buenos Aires, Argentina.*

3. *Centro de Investigaciones del Medio Ambiente (CIM), Universidad Nacional de la Plata-CONICET, La Plata, Argentina*

4. *Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Ecología, Genética y Evolución, Instituto IEGEBA (CONICET-UBA), Universidad de Buenos Aires, Argentina.*

5. *Centro de investigaciones, Agua y Saneamientos Argentinos, CABA, Argentina.*

La presencia de toxinas de cianobacterianas en agua dulce constituye un problema de salud pública en aumento, que afecta especialmente a los países en desarrollo, donde el alto costo de los métodos disponibles dificulta los programas de monitoreo. Los ensayos de inhibición de fosfatasa (PPIAs) son métodos sensibles con bajos requerimientos de instrumental, que permiten la cuantificación de las cianotoxinas más frecuentes, las microcistinas (MC). En este trabajo implementamos un kit de PPIAs (CIANOTOX), partiendo de la expresión de Proteína Fosfatasa 1 (PP1) hasta la validación con muestras de floraciones algales de Argentina. Para ello, optimizamos la expresión y liofilización de PP1, y las condiciones de ensayo. Se realizaron análisis de robustez y posibles interferencias. Además, evaluamos los métodos de lisis de cianobacterias más utilizados y determinamos que el calentamiento durante 15 minutos a 95 °C es simple y adecuado para este ensayo. Luego, realizamos ensayos de recuperación de MC en muestras de agua de tres cuerpos de agua de Argentina, lo que resultó en una recuperación que va del 77 al 115 %. El límite de detección (LOD) fue de 0,4 µg/L y el rango lineal es de 0,4 µg/L - 5 µg/L. Finalmente, evaluamos 64 muestras ambientales en las que se midieron MC por ELISA con un contenido de 0 µg/L a 625 µg/L. CIANOTOX mostró una excelente correlación (coeficiente de correlación de Pearson = 0,967), sin falsos negativos ni falsos positivos por encima del valor guía de la OMS de 1 µg/L (tasa total de falsos positivos de 0,11). Actualmente, estamos adaptando CIANOTOX a un dispositivo portátil, para la detección de MC *in situ*.

LIGANDOS DE RECEPTORES TIPO TOLL CON ACTIVIDAD ANTIVIRAL FRENTE A LOS CORONAVIRUS

Vicente, J (1,2); Shayo, C (3); Bueno, CA (1,2).

- (1) Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Química Biológica, Laboratorio de Virología, Buenos Aires, Argentina
- (2) CONICET - Universidad de Buenos Aires. Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN). Buenos Aires, Argentina.
- (3) Laboratorio de Patología y Farmacología Molecular, Instituto de Biología y Medicina Experimental, IBYME, CONICET, Buenos Aires, Argentina

Introducción: Existe una necesidad de antivirales frente a SARS-CoV-2 por múltiples razones. Si bien se han obtenido vacunas, es de especular que no eviten que la circulación viral continúe, y hay un porcentaje, aunque bajo, de vacunados que requieren hospitalización. Además, podrían surgir variantes que favorecerían su evasión de la respuesta inmune. Por otro lado, los coronavirus seguirán circulando entre hospedadores animales, y entonces es de esperar la emergencia de nuevas poblaciones virales. Por lo tanto, resulta indispensable el desarrollo de antivirales como una estrategia complementaria contra SARS-CoV-2 y que, además, presenten actividad de amplio espectro frente a los coronavirus para estar preparados frente a una nueva pandemia. Los ligandos de receptores tipo Toll (TLR) han sido previamente evaluados exitosamente en diversos modelos de infecciones virales. En ese sentido, nosotros hemos caracterizado la actividad anti-RSV del agonista TLR7 imiquimod (IMQ), y se ha descrito que la administración de un agonista TLR2/6 presenta actividad antiviral en hurones infectados con SARS-CoV-2. **Objetivo:** Evaluar la actividad antiviral de los ligandos de TLR contra el coronavirus canino (CCV) y SARS-CoV-2, *in vitro*. **Metodología:** La citotoxicidad de los compuestos en las células calu-3 (células epiteliales de adenocarcinoma de pulmón humanas) y CRFK (células epiteliales de riñón de gato) fue evaluada por el método de MTT, y la actividad antiviral por un ensayo de inhibición del rendimiento viral. La expresión de las proteínas virales *spike* (S) y nucleocápside (N) fue analizada por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI). **Resultados:** En las células calu-3 y CRFK infectadas con SARS-CoV-2 y CCV, respectivamente, y tratadas con distintos ligandos de TLR (Pam2CSK4, TLR2/6; poly (I:C), TLR3; LPS, TLR4; IMQ, TLR7; resiquimod, TLR7/8; CpG ODN, TLR9), se observó una reducción de los títulos virales dependiente de la concentración en las células tratadas con IMQ. Además, IMQ no presentó efectos tóxicos en todas las concentraciones evaluadas. Asimismo, se detectó una reducción de la expresión de las proteínas virales N y S en las células calu-3 infectadas con SARS-CoV-2 y tratadas con IMQ respecto de las células sin tratar. Por otro lado, los tratamientos en simultáneo con inhibidores (KT520 y H89) o estimuladores (Forskolina y AMPc) de la vía de PKA, o inhibidores de la vía de NF- κ B (BAY 11-7085), no afectaron la actividad antiviral de IMQ frente a SARS-CoV-2 y CCV. **Conclusiones:** IMQ exhibe actividad antiviral frente a SARS-CoV-2 y CCV, posiblemente de manera independiente de las vías de señalización PKA y NF- κ B.

COMPORTAMIENTO REOLÓGICO DE NANOGELES DE QUITOSANO ARGENTINO COMO SISTEMAS DE ADMINISTRACIÓN OCULAR

LUCAS, Laura Belén.¹; SILVA NIETO, Ramón¹; FARÍAS, María Edith²; ALAIMO, Agustina¹; PÉREZ, Oscar Edgardo¹.

- 1) *Laboratorio Interdisciplinario de Dinámica Celular y Nanoherramientas, IQUIBICEN-CONICET, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, CABA (1428), Argentina.*
- 2) *Laboratorio avanzado de Alimentos. Departamento de Tecnología, Universidad Nacional de Luján, Luján, Argentina.*

Dirección de e-mail: laurablucas@qb.fcen.uba.ar

La administración oftálmica de fármacos tiene un rol clave en el tratamiento de patologías oculares frecuentes como son el glaucoma, la degeneración macular, las infecciones, etc. Si bien existen diferentes vías de administración (tópica, intravítrea, periocular), todas comparten una misma limitación, baja biodisponibilidad de los activos farmacológicos en su sitio de acción. Los enfoques farmacéuticos basados en nanoestructuras diseñadas a partir de polímeros mucoadhesivos son estrategias emergentes para el tratamiento eficaz de las enfermedades oculares. El quitosano (QS) es un polisacárido lineal compuesto de cadenas de β -(1-4)-D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina. Este polímero se caracteriza por ser biocompatible, biodegradable, mucoadhesivo, no tóxico, antimicrobiano, con solubilidad en múltiples medios. Por esta razón, los nanosistemas a base de QS son atractivos en el área biomédica como vehículo para la liberación controlada de compuestos farmacológicos. En nuestro laboratorio, hemos diseñado nanogeles (NG) a base de QS argentino de alto PM (300 KDa) y 81,5% de desacetilación, mediante el proceso de gelificación iónica empleando como agente reticulante tripolifosfato de sodio (TPP) en una relación QS: TPP de 3:1. El objetivo del presente trabajo fue obtener parámetros reológicos de los NG-QS diseñados. Los NG presentaron un tamaño promedio de $170,3 \pm 1,3$ nm y un índice de polidispersidad de $0,16 \pm 0,03$. Los NG-QS resultaron ser inocuos para la línea ARPE-19 del epitelio pigmentario de la retina humana (ATCC[®] CRL-2302TM). Diluciones 1:10, 1:100, 1:1000 del QS libre (control) y de los NG-QS (3,75 mg/ml ambas disoluciones), pH 5,5 fueron dispuestas en el plato inferior de un reómetro Paar Physica (MCR 301) con esfuerzo de corte controlado. Se empleó la modalidad cono y plato (CP 50), gap de 0,099 mm. La temperatura fue controlada a 25 °C por un sistema Peltier (Viscotherm VT2, Paar Physica) y se registró la evolución del esfuerzo de corte en función de la velocidad de deformación desde 0 a 300 s⁻¹. Los datos recolectados permitieron identificar diferencias en el comportamiento de flujo entre las diluciones de QS y NG-QS. El QS, en todas las concentraciones evaluadas, presentó un comportamiento newtoniano. La viscosidad varió con la concentración, siendo $\eta = 6,24$ [mPa·s] para 3,75 mg/ml. Los NG-QS (3,75 mg/ml) mostraron un comportamiento pseudoplástico con un valor de viscosidad $\eta = 15$ [mPa·s] a 50 s⁻¹. Todas las diluciones de NG-QS fueron newtonianas, siendo la viscosidad $\eta = 1$ mPa·s. La caracterización se completó con barridos de frecuencia tradicionales. Tanto los NG-QS, como la dilución 1/10 de QS se comportan como geles ($G' > G''$) en todo el rango de velocidad analizado (0,1 a 100 s⁻¹), indicando firmeza y rigidez. En conclusión, los resultados reológicos permitieron interpretar que el sistema de NG-QS se encuentra organizado en suspensión acuosa, conocimiento relevante para el diseño de nanomedicinas oftálmicas.

Palabras clave: *Quitosano, nanogeles, viscosimetría, reología oscilatoria.*

Determinantes Moleculares de la Unión de Tetrahidrocannabinol (THC) al Receptor de Glicina

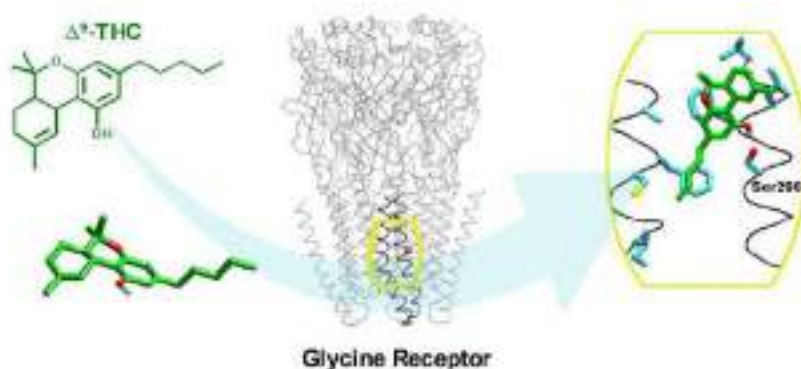
Lautaro D. Alvarez^{1,2} and N. R. Carina Alves^{1,3}

¹Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Química Biológica, C1428EGA Buenos Aires, Argentina.

²CONICET-Universidad de Buenos Aires, UMYMFOR, C1428EGA Buenos Aires, Argentina.

³CONICET-Universidad de Buenos Aires, IFIBYNE, C1428EGA Buenos Aires, Argentina.

La investigación del *Cannabis* como fuente de nuevos compuestos aptos para uso médico ha atraído un fuerte interés de la comunidad científica, y si bien en los últimos años se han producido avances sustanciales en cuanto a la actividad de los cannabinoides, una descripción detallada de sus mecanismos moleculares de acción sigue siendo aún una tarea por completar. Destacando su compleja farmacología, la lista de los blancos moleculares de los cannabinoides se ha expandido enormemente más allá de los receptores de cannabinoides canónicos. Entre ellos, hemos centrado nuestro estudio en el receptor de glicina (GlyR), un canal iónico implicado en la modulación de las respuestas del sistema nervioso, incluida la sensibilidad al dolor periférico. En este trabajo informamos el uso de métodos computacionales para investigar posibles modos de unión entre GlyR y uno de los principales cannabinoides, Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC). Después de obtener una primera pose para la unión de THC a partir de una simulación de docking molecular dirigida, se evaluó la estabilidad del complejo GlyR/THC mediante simulaciones por dinámica molecular, encontrando un sistema altamente dinámico, pero a partir del cual pudo identificarse un modo de unión representativo, caracterizado por la interacción específica con dos residuos transmembrana. Complementariamente, evaluamos el papel del colesterol de membrana en esta interacción y establecimos positivamente su relevancia para la unión de THC a GlyR. Por último, el uso de simulaciones de dinámica molecular restringida nos permitió refinar la descripción del modo de unión y del efecto del colesterol. En conjunto, nuestros hallazgos contribuyen al conocimiento actual sobre el modo de unión de GlyR-THC y proponen un nuevo punto de partida para futuras investigaciones sobre cómo los cannabinoides en general, y el THC en particular, modulan la percepción del dolor en vista de sus posibles aplicaciones clínicas.



Desarrollo de un ELISA competitivo indirecto multiespecie para la detección de anticuerpos contra el virus de la hepatitis E

Arce, LP¹; Pavan, MF²; Bok, M³; Parreño, V³; Gutiérrez, SE⁴; Estein, SM⁴; Tammone Santos A⁴; Condorí WE⁴; Vizoso Pinto, MG¹; Ibañez, LP².

¹Laboratorio de Biología de las Infecciones. INSIBIO (CONICET-UNT). Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Tucumán; ²Instituto de Química, Física de los Materiales, Medioambiente y Energía (INQUIMAE- CONICET). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Buenos Aires (UBA); ³IncuINTA, Instituto de Virología e Innovaciones Tecnológicas, INTA-CONICET; ⁴Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (UNCPBA-CICPBA-CONICET), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

El virus de la hepatitis E (HEV) es un virus zoonótico y emergente causante de hepatitis aguda. La serología para el HEV es de gran importancia tanto en estudios epidemiológicos como para controlar la transmisión de la enfermedad. Recientemente, obtuvimos nanoanticuerpos (VHHs) contra la proteína de cápside (ORF2) del HEV genotipo 3 (HEV-3) para desarrollar un ELISA competitivo (cELISA) que permita detectar inmunoglobulinas (Ig) humanas y de distintas especies animales.

ORF2 HEV-3 fue expresada y purificada usando la resina NiNTA. Después de inmunizar una llama con ORF2 soluble, se construyó una librería de VHHs y se seleccionaron los VHHs específicos para ORF2 mediante la técnica de *pannig* con *display* en fago. Los VHHs anti-ORF2 fueron expresados en *E. coli* TG1, evaluados por ELISA indirecto y los clones positivos enviados a secuenciar. Se expresaron y purificaron 10 VHHs anti-ORF2 seleccionados según la región hipervariable determinante de complementariedad 3 (CDR3). Se puso a punto el cELISA considerando: concentraciones de ORF2 y de VHHs, agentes bloqueantes, dilución de suero y de Ac secundario (anti-HisHRP). Para la validación del cELISA (*cut-off*, sensibilidad, especificidad, AUC, grado de concordancia, precisión y límite de detección) se empleó un panel de sueros caracterizados con el kit DIAPRO. Finalmente, se analizaron 62 muestras de pacientes con hepatopatías y sueros de diferentes animales: cerdo, jabalí, ciervo y ratón.

Mediante análisis ROC (Característica Operativa del Receptor) se determinó una sensibilidad de 97,4 %, especificidad 95,8 %, *cut off* de 69,16% y buena capacidad discriminativa debido a un AUC (área debajo de la curva) de 0,976. La variabilidad intra e interensayo calculado mediante el coeficiente de variación (CV) fue < 10% y <15%, respectivamente, lo que indicó que el inmunoensayo es preciso. El índice *kappa* fue de 0,93 indicando un buen grado de concordancia con respecto al kit comercial; aunque su límite de detección fue menor que el kit DIAPRO. Con el cELISA se determinó una seroprevalencia de 8% en pacientes con hepatopatías (5/62). También fue posible diferenciar muestras seropositivas y negativas en todos los animales testeados.

Reportamos por primera vez la aplicación de VHHs contra el HEV-3 en un inmunoensayo y desarrollamos un cELISA multiespecie para detectar Ig anti-HEV-3 que puede ser usado tanto en humanos con fines epidemiológicos como en el ámbito veterinario para prevenir y controlar la transmisión zoonótica por el HEV-3.

Título: Desarrollo de un ELISA sándwich basado en nanoanticuerpos anti-NS1 para la detección temprana de individuos infectados con dengue.

Autores: María Florencia Pavan, Cristian Malnero, Yesica Rojas, Laura Perez Vidakovits, Gerald McInerney, Leo Hanke, Cybele García, Itatí Ibañez.

Resumen:

El dengue es una enfermedad viral causada por los 4 serotipos de dengue (DENV 1-4), la cual es transmitida principalmente a través de la picadura de mosquitos hembra de *Aedes aegypti*. Cada año se producen alrededor de 390 millones de infecciones y 20.000 muertes en más de 125 países donde la enfermedad es endémica. La notificación temprana de los casos de dengue, luego de una infección primaria o secundaria, es crucial para la identificación de los brotes, el inicio de una respuesta oportuna y el seguimiento del paciente infectado. La proteína no estructural 1 (NS1) del virus representa un biomarcador temprano de la infección ya que se secreta al torrente sanguíneo desde células infectadas durante los primeros días del inicio de los síntomas.

Teniendo en cuenta la importancia de la detección temprana de los casos de dengue, se han seleccionado nanoanticuerpos (VHHs) dirigidos contra la NS1 de los 4 serotipos. Los VHHs corresponden a la región variable de los anticuerpos de cadena pesada de camélidos y poseen ventajas en comparación con los anticuerpos monoclonales, como alta afinidad, especificidad, estabilidad y solubilidad, y bajo costo de producción. En este trabajo proponemos desarrollar un ELISA sándwich utilizando VHHs para la detección temprana de individuos infectados con dengue.

Para la obtención de los VHHs anti-NS1 se inmunizaron dos llamas y posteriormente se construyó una biblioteca desde la que se seleccionaron 11 VHHs únicos mediante la técnica de *panning* con *display* de fagos. Los VHHs fueron modificados para mejorar su capacidad como anticuerpos de captura y/o detección. En particular, se generaron VHHs fusionados a una secuencia de pegado a plástico (VHH PSW) y VHHs biotinilados para ser usados como moléculas de captura; y VHHs fusionados al dominio Fc unido a HRP (VHH HRP) o a la fosfatasa alcalina (VHH PAL) para detección. Se estudió así la capacidad de los 11 VHHs de capturar la NS1 de los 4 serotipos de DENV en diferentes condiciones: según el tipo de placa, con o sin pegado a plástico, utilizando diferentes agentes bloqueantes y distintas concentraciones de NS1.

Se determinó que el VHH 14 fusionado a PSW es capaz de capturar hasta 50 ng/pocillo de NS1 utilizando como agente bloqueante BSA 1%. Estas condiciones serán utilizadas para determinar el/los VHHs de detección. Posteriormente, se estudiará la capacidad para detectar NS1 en sobrenadante de células infectadas y se determinará la sensibilidad y especificidad del ensayo diagnóstico utilizando muestras de suero de pacientes sanos e infectados con dengue.

En este trabajo demostramos que es posible seleccionar, caracterizar y modificar VHHs que reconocen la NS1 de los 4 serotipos de DENV de manera sencilla y con altos rendimientos. El desarrollo de un kit diagnóstico basado en nanoanticuerpos que permita la detección temprana de individuos infectados con dengue y que sea estable a diferentes temperaturas permitiría el uso del mismo en áreas donde no se cuente con refrigeración. Además, los altos rendimientos de producción de estos VHHs en sistemas bacterianos disminuirían los costos de producción.

Caracterización por SAXS y WAXS de emulsiones líquidas-cristalinas liotrópicas hinchadas hospedadoras del fármaco antituberculoso isoniacida

Michel Torino, Mateo^{1*}; Vadra, Nahir¹; Lamas, Diego²; Suarez, Sebastián A.¹.

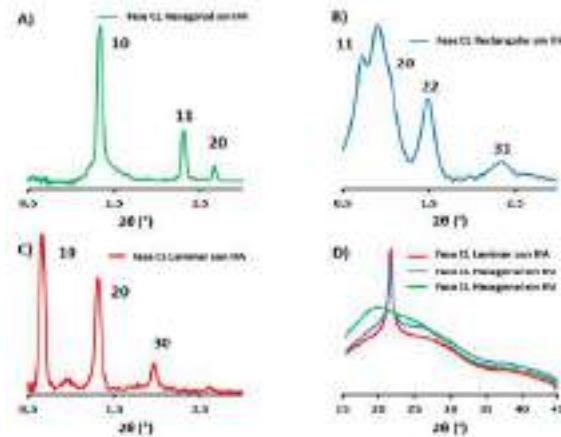
¹ INQUIMAE, CONICET y Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, CABA, Argentina.

² ITECA, CONICET y Universidad Nacional de San Martín, San Martín, Argentina

* mtorino@qi.fcen.uba.ar

Las terapias orales pueden presentar dificultades, como la hepatotoxicidad inducida por fármacos, por lo que evitar la metabolización hepática de primer paso puede llevar a mejor cumplimiento de los tratamientos. Se han explorado sistemas transdérmicos que son no invasivos y administrados por el propio paciente, lo que mejora el cumplimiento del tratamiento, y puede favorecer la liberación del fármaco durante largos períodos.[1,2] En este sentido, las estructuras formadas por las diferentes fases LC pueden actuar como hospedadores de moléculas hidrofílicas, hidrofóbicas o anfífilas, ubicándose en diferentes áreas de la estructura supramolecular,[3] favoreciendo la liberación controlada de principios activos. En este trabajo exploramos completamente un diagrama ternario agua-aceite-surfactante en presencia y ausencia de isoniacida

Figura 1. Dispersión de rayos X de ángulo pequeño para A) fase hexagonal (verde), B) rectangular (azul) y C) laminar (roja) de emulsiones basadas en cristales líquidos liotrópicos, y D) dispersión de rayos X de ángulo grande de las mismas tres muestras, mostrando el halo ancho característico de la fase LC entre $2\theta = 20-30^\circ$. Se indican los índices de Miller correspondientes.



Se han encontrado y caracterizado fases de LC laminar, de malla/mesh, rectangular/ribbon y hexagonal (Figura 1), lo que demuestra que el sistema en estudio tiene una amplia versatilidad. Por otro lado, se ha demostrado que la incorporación del analito no cambia las propiedades de CL de las emulsiones. Además, hemos visto cómo algunas de las fases de LC sufren una transformación de fase a lo largo del tiempo. Por ejemplo, entre los 15 y los 20 días algunas fases rectangulares se vuelven laminares. Finalmente, los resultados preliminares muestran una dependencia de la fase LC presente con la concentración de analito difundido a través de una membrana biológica.

1. Hussain, A. et al., Novel approach for transdermal delivery of rifampicin to induce synergistic antimycobacterial effects against cutaneous and systemic tuberculosis using a cationic nanoemulsion gel, *Int. J. Nanomedicine* 15, (2020) 1073
2. Prausnitz, M. et al., Transdermal drug delivery, *R., Nat. Biotechnol.* 26, (2008) 1261
3. Guo, C. et al., Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery, *Drug Discov. Today* 15, (2010) 1032

Extracción y sulfatación de galactanos del alga roja *Grateloupia indica*: citotoxicidad y actividad antiviral

Mathías Chemen^a, Luana E. Piccini^{a,b}, Bimalendu Ray^c, Sayani Ray^c, Cybele C. García^{a,b}, Elsa B. Damonte^{a,b}

^aDepartamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, ^bIQUIBICEN (UBA/CONICET), Buenos Aires, Argentina, ^cDepartment of Chemistry, University of Burdwan, Burdwan, India.

La continua búsqueda de nuevos agentes antivirales ha llevado a una creciente cantidad de investigaciones basadas en el ensayo de productos naturales como fuente de compuestos líderes para el desarrollo de sustancias con óptima efectividad. En este marco, las algas marinas son una importante fuente de polisacáridos sulfatados, compuestos polianiónicos con actividad inhibitoria de la multiplicación de varios virus envueltos de relevancia en la salud humana, como el virus herpes simplex (HSV). En este trabajo se estudiaron diversos galactanos derivados del alga roja *Grateloupia indica* químicamente modificados mediante sulfatación y esterificación con diferentes reactivos a fin de mejorar su actividad antiherpética. Para ello, se evaluó inicialmente la citotoxicidad en células Vero de los galactanos designados G401, G402, G402D, G403 y G404 empleando el método de MTT, a fin de establecer la concentración citotóxica 50% (CC₅₀). Luego, la actividad antiviral se cuantificó determinando la concentración efectiva 50% (CE₅₀) mediante ensayos de formación de placas del virus HSV tipo 1 (HSV-1) cepa F. Aunque todos los galactanos mostraron capacidad de inhibir la infección de HSV-1 en células Vero, el compuesto G402, producido por extracción y sulfatación en un solo paso con ácido clorosulfónico/piridina/DMF, fue el más efectivo con una CE₅₀ de 0.36 ± 0.01 µg/ml y un índice de selectividad (relación CC₅₀/CE₅₀) > 952. Asimismo, mostró un amplio espectro de acción antiherpética con valores de CE₅₀ similares frente a HSV tipo 2 (HSV-2) y variantes de HSV-1 resistentes a aciclovir, droga en uso clínico para las infecciones humanas con HSV. Al estudiar el mecanismo de acción de G402 frente a HSV-1, se observó la actividad antiviral máxima cuando el galactano (10 µg/ml) estuvo presente en la adsorción del virus a la célula (99.99 % de inhibición en la formación de placas) y sólo se produjo una reducción del 50 % en el efecto citopático viral si se lo adicionaba en la internalización posterior a la adsorción. Estos resultados señalan la posibilidad de obtener moléculas bioactivas a partir de fuentes abundantes de origen natural mediante modificaciones químicas que incrementen su potencial terapéutico.

Neoglycoconjugates of α -gal disaccharide and immunogenic peptides for the diagnosis of Chagas disease

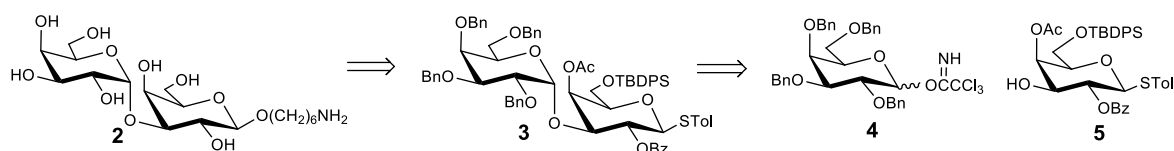
M. Eugenia Giorgi,¹ Carlos A. Buscaglia,² Carla Marino¹

¹ Universidad de Buenos Aires, CIHIDECAR CONICET-UBA, Dpto. de Química. Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Buenos Aires (1428), Argentina. E-mail: cmarino@qo.fcen.uba.ar

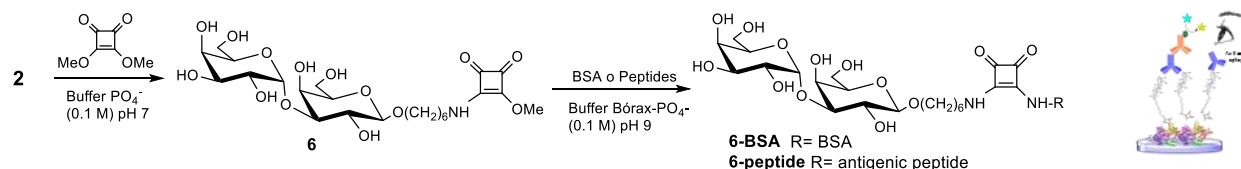
² Instituto de Investigaciones Biotecnológicas "Dr R. Ugalde", IIBIO, Universidad Nacional de San Martín (UNSAM) and CONICET, Buenos Aires, Argentina.

Trypanosoma cruzi is the etiological agent of Chagas disease, the most prevalent human parasitosis in Latin America, for which no vaccines or appropriate drugs are available. The routine diagnosis of this disease is based on the detection of antibodies against *T. cruzi*, using conventional serological techniques that present limitations in terms of their reproducibility, sensitivity and specificity. Therefore, the development of new tools or strategies for optimization of diagnosis of *T. cruzi* infection is of great interest. In our laboratory we develop and evaluate new diagnostic tools for Chagas disease, based on neoglycoconjugates containing, on one hand the epitope α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- β -D-Galp (**1**, disaccharide α -gal), which is recognized by anti- α -galactosyl lytic antibodies present in sera of chronic chagasic patients,¹ and on the other hand, antigenic peptides, whose structures are based on parasite mucin-associated surface proteins in mammal stages.² The purpose is to improve the response of certain peptidic antigens, currently used as reagents for the serodiagnosis of Chagas disease, in mixed serological neoglycoproteins containing both epitopes, simultaneously.

We synthesized disaccharide **1**, derivatized with a spacer arm with an amino group (**2**), useful for conjugation. To obtain **2**, precursors **4** and **5** were proposed. Acceptor **5** was prepared from tolyl β -D-1-thio-Galp through a sequence of reactions that did not require intermediate purifications. By glycosidation of **4** with **5**, disaccharide **3** was stereoselectively obtained in good yield, which was later activated to introduce the 6-aminohexyl spacer arm.



Compound **2** was conjugated to BSA and antigenic peptides, by the dialkyl squarate method, obtaining neoglycoconjugates **6-BSA** and **6-peptides**. Their immunoassays against anti- α -Gal antibodies developed in chronic chagasic patient sera, using the indirect ELISA technique, will be discussed.



References

1. Almeida, I. C., Ferguson, M. A. J., Schenkman, S. & Travassos, L. R. (1994). Lytic anti- α -galactosyl antibodies from patients with chronic Chagas' disease recognize novel O-linked oligosaccharides on mucin-like glycosyl-phosphatidylinositol-anchored glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.* **304**, 793.
2. Mucci, J. *et al.* Next-generation ELISA diagnostic assay for Chagas Disease based on the combination of short peptidic epitopes. (2017). *PLoS Negl. Trop. Dis.* **11**, 1.

Desarrollo del diagnóstico de amiloidosis por espectrometría de masas

**Ricardo Neme Tauil¹, Maria Pia Valacco¹, German Fernández¹, Elsa Nucifora²,
Maria Soledad Saez², Patricia Sorroche², Maria Adela Aguirre², Maria Lourdes
Posadas², Pablo Pomata³, Victoria Lux-Lantos³, Silvia Moreno³**

¹CEQUIBIEM, IQUBICEN/CONICET, Depto Química Biológica, FCEN, UBA

²Hospital Italiano de Buenos Aires,

³IBYME, CONICET

e-mail: smoreno@qb.fcen.uba.ar

La amiloidosis es una enfermedad severa poco frecuente que afecta en el mundo 1 en 10000 personas. Se produce cuando proteínas circulantes normalmente solubles sufren un plegamiento incorrecto y se acumulan como depósitos fibrilares insolubles en diferentes partes del organismo causando principalmente daño cardíaco, renal o neurológico.

El tejido blanco, así como la progresión y la severidad de la enfermedad dependen de la proteína que forma el depósito fibrilar. La identificación de esta proteína es central para determinar la terapia adecuada. Se han descrito alrededor de 30 proteínas amiloidogénicas

Las fibras amiloides son visibles con una birrefringencia color verde manzana en microscopios con luz polarizada en preparados de tejidos fijados con formalina y embebidos en parafina (FFPE) teñidos con Rojo Congo. El "gold standard" de la identificación de la proteína amiloide es el denominado LMD/MS que consiste en una microdissección laser del material birefringente teñido con Rojo Congo y posterior análisis de ese material por espectrometría de masa en tandem¹. Este ensayo fue desarrollado en la Clínica Mayo por Ahmet Dogan. Actualmente se realiza en muy pocos lugares del mundo; ninguno en América Latina. En un convenio con el grupo Amiloidosis del Hospital Italiano de Buenos Aires y el IBYME/Conicet el CEQUIBIEM está desarrollando esta técnica diagnóstica para poder ofrecerla luego en el país y en América Latina.

El primer conjunto de muestras consistió en muestras patológicas de corazón (9), cavidad oral (2), hígado (1), laringe (1), recto (1) y 3 muestras control de corazón. Las muestras provistas por el HIBA consistieron en preparados histopatológicos teñidos con Rojo Congo, y trozos de biopsias fijadas y embebidas en parafina. En el IBYME, se puso a punto la microdissección laser; en el CEQUIBIEM, se estandarizó el protocolo de extracción de las microdissecciones (9 muestras), y de los trocitos de biopsias fijados (14). Las 14 muestras patológicas y las 3 muestras control fueron analizadas por nano HPLC, acoplado a un Orbitrap (QExactive) de Thermo Scientific. En todos los casos el HIBA disponía ya de un diagnóstico de la amiloidosis de cada paciente, a partir de datos clínicos y datos de laboratorio e histopatológicos

Los resultados fueron muy promisorios. En 6 de las 9 muestras analizadas por LMD/MS, se detectó la proteína amiloidogénica. En las 14 muestras de biopsias analizadas directamente por LC/MS se detectó la proteína amiloidogénica. En todos los casos se pudieron identificar las 5 proteínas que en la literatura se describen como "signature", y que acompañan a la fibra amiloide (Apolipoproteína A-IV, Apolipoproteína A-I, Apolipoproteína E, Serum amyloid y Vitronectina).

Llama mucho la atención que se hayan podido detectar las proteínas amiloidogénicas con tanta abundancia en las muestras de biopsia, en las cuales las fibras amiloides se encuentran diluidas respecto al análisis en muestras LMD/MS. Esto sugiere que debe haber en estos tejidos una acumulación granular de estas proteínas; esto ha sido sugerido en la literatura pero no reportado en experimentos de por espectrometría de masa.

El desarrollo de esta técnica diagnóstica aun aguarda el análisis de más muestras patológicas provenientes de otros tejidos así como de muestras control para cada tejido.

¹Dogan, A. (2017) Amyloidosis: Insights from Proteomics. *Annu Rev Pathol.* 24(12):277-304.

Desarrollo de cápsulas de Ca(II)-alginato para la formulación de productos potencialmente funcionales: evaluación sensorial orientada a consumidores y bioaccesibilidad.

Aguirre-Calvo T.R (1), López T.A(2), Sosa N. (2,3), Quintanilla-Carvajal M.X(4), Perullini M. (5) y Santagapita P.R (1)

(1) Universidad de Buenos Aires, FCEyN, Departamento de Química Orgánica y Departamento de Industrias. CONICET- Centro de Investigación en Hidratos de Carbono. Buenos Aires, Argentina.

(2) Universidad Nacional de Entre Ríos, Facultad de Bromatología, Desarrollo y mejoramiento de alimentos de calidad a partir de recursos de la provincia de Entre Ríos (DyMACRER), Gualaguaychú, Entre Ríos, Argentina.

(3) CONICET - Universidad Nacional de Entre Ríos, Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de Entre Ríos (ICTAER), Entre Ríos, Argentina.

(4) Facultad de Ingeniería, Universidad de La Sabana, Chía, Colombia

(5) Universidad de Buenos Aires, FCEyN, Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física. CONICET, Instituto de Química Física de los Materiales, Medio Ambiente y Energía. Buenos Aires, Argentina
traguic@gmail.com; patricio.santagapita@qo.fcen.uba.ar

RESUMEN

Las hojas y los tallos de remolacha (un subproducto alimenticio) representan la mitad del peso fresco de la remolacha cultivada y poseen compuestos bioactivos valiosos (betacianina y compuestos fenólicos). El uso de la encapsulación como técnica para proteger dichos compuestos ha sido previamente estudiado y analizado. En este trabajo, se utilizaron cápsulas previamente optimizadas para el desarrollo de tres alimentos con dichos agregados: galletas dulces, delicias turcas y caviar molecular. La evaluación sensorial se realizó con 100 consumidores a los cuales se les aplicó una encuesta con pruebas descriptivas de intensidad de los atributos, pruebas afectivas y asociación de palabras. Como resultados se obtuvo que para el caviar molecular predomina la categoría de agrado en relación con la apreciación visual, atribuible al color de las cápsulas -que además fue clasificado como justo (en la escala JAR)-. Sin embargo, los atributos relacionados con el gusto no estuvieron categorizados en el agrado y fueron penalizados por los consumidores, por lo que deberían ser mejorados para que el caviar sea aceptado como alimento per se. Al evaluar tanto las galletas como las delicias turcas conteniendo las cápsulas, estas fueron aceptadas por los consumidores en mayor proporción que el caviar, mostrando relaciones de agrado no solo en atributos de color sino en gusto. Además, la percepción de las cápsulas en los productos no representó un problema a la hora de la aceptación. Al hacer una valoración global de los alimentos y de acuerdo con los resultados de la evaluación sensorial, los atributos fueron descritos en su mayoría como justos para los alimentos formulados y anclados como agrado para los consumidores. Además, en comparación con sus homólogos sin cápsulas, los alimentos presentaron una mejor aceptabilidad y agrado a la hora de calificarlos en la satisfacción global, de acuerdo con las respuestas de la encuesta abierta y en consonancia con el vocabulario empleado por los consumidores, que permite inferir una aceptación por parte de estos. La prueba de penalidades indicó que para las galletas no se observaron atributos de mejora, probablemente debido a que se partió de un producto muy conocido y habitual en su consumo; diferencia que se veía en las delicias turcas, al ser un alimento más innovador y menos conocido en el mercado argentino, aunque es importante destacar que dicha penalización no generó sensación de rechazo. Finalmente, los alimentos fueron evaluados por digestión in vitro mostrando que hay un contenido significativo de compuestos fenólicos que son liberados (y plausibles de ser absorbidos) en el intestino, con bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos de alrededor de 80%, conservando su capacidad antioxidante (medida por ABTS+ y FRAP). Se puede concluir que la inclusión de las cápsulas con extracto en ambos alimentos conduce a un aumento significativo del contenido de compuestos fenólicos y de la capacidad antioxidante. Estos resultados permiten generar sistemas mejorados de alginato de Ca(II) con propiedades funcionales prometedoras para el desarrollo de ingredientes y alimentos funcionales.

Palabras Clave: biopolímeros, aceptación, subproductos, antioxidantes, digestión.

Levels of circulating IgG antibodies against CFP10 and ESAT6 proteins differentiate active TB patients and recently infected individuals from latently infected subjects

Agustín Vitti^{1,2}, Rocío Zuazo^{1,2}, Alejandro Castello³, Estefanía Peri Ibañez³, M. Paula Morelli^{1,2}, Lucía Donolli^{1,2}, Ana Bazan^{1,2}, Rita Armitano⁴, Juan Stupka⁴, Claudio Gallego⁴, Domingo Palmero⁵, Nancy Tateosian^{1,2}, Juan Iovanna⁶, Verónica García^{1,2}, Nicolás Amiano^{1,2}

1 Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN), CONICET, 2 Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA, 3 Laboratorio de Inmunología y Virología, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes 4 Hospital General de Agudos Parmenio Piñero, 5 Hospital de Enfermedades Infecciosas Dr. Francisco J. Muñiz, 6 Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), INSERM U1068, CNRS

Mycobacterium tuberculosis (*Mtb*), the agent responsible for the tuberculosis disease (TB) has been historically one of the deadliest infectious human pathogens. *Mtb* is characterized by its capacity to enter into a dormancy state that allows it to persist in an individual for years. This latent condition makes direct detection of bacterial components difficult and results in a significant obstacle for diagnosis. We have previously generated a fusion protein (Fp) of CFP10 and ESAT6 antigens that can be used for detecting *Mtb* infected individuals in an IGRA test. We have also demonstrated that the antigen Rv2626c allows to discriminate individuals with an established latent tuberculosis infection (LTBI) from tuberculosis patients (TBP), recently infected subjects (RI) and healthy controls (HC). Here, we analyzed levels of circulating IgG antibodies against Fp in these mentioned study groups. We used Fp to sensitize ELISA plates and measured IgG specific antibodies in plasma samples. We first observed that levels of IgG antibodies against ESAT6 and CFP10 could differentiate TBP and HC (O.D. TB = 0.67 ± 0.09 ; O.D. HC = 0.14 ± 0.03 ; **** $p < 0.0001$) with ROC analysis showing 54.2% sensitivity and 81.5% specificity for a cut-off value of O.D.: = 0.21. Furthermore, anti-Fp IgG levels were able to distinguish asymptomatic individuals positive for QuantiFERON®-TB Gold Plus (QFT) or tuberculin skin test (TST) from TB patients. Surprisingly, RI QFT+ subjects showed significantly higher levels of IgG against Fp than LTBI (O.D. RI = 0.45 ± 0.1 ; O.D. LTBI = 0.15 ± 0.03 ; ** $p < 0.007$) and, in a similar manner, individuals with low and high cellular immune responses against Rv2626c could also be differentiated by levels of IgG against Fp. In summary, our findings suggest that Fp could be used to detect specific IgG antibodies in serodiagnostic tests to identify TBP and individuals at risk of developing active TB.

Prediction of epitopes recognized by primary response IgM antibodies to chicken egg lysozyme by means of homology modeling and docking experiments

Cauerhff, Ana^{1,2}; Corró, Guillermo^{2,3}; Lagúa-Becher, Melina^{2,4}; Fossati, Carlos Alberto⁵; Goldbaum, Fernando Alberto².

1.Depto de Química Biológica-FCEyN-UBA-CONICET; 2.IIBBA-FIL-CONICET; 3.Htal Juan P Garrahan-CONICET; 4.CEBBAD-Univ Maimónides-CONICET; 5.IIFP-UNLP-CONICET

Studies of IgM-antigen (Ag) interaction focused on epitope mapping and cross-reactions are important issues in the design of vaccines and diagnostic kits. In previous research, it was observed that IgM isotype antibodies (Ab) are encoded by germline genes with few or no mutations, being of low to medium affinity compared to IgG isotype Abs. In this work, chicken egg lysozyme (HEL) as Ag model has been used, since it was widely studied, from the structural and physicochemical point of view, both in its free form and bound to Ab. Our goal is to characterize the structure of the epitopes recognized by anti-HEL monoclonal (Mabs) IgM Fvs, on HEL surface. Two populations of anti-HEL IgM were obtained: one by intraperitoneal immunization with complete Freund's adjuvant and another by intrasplenic immunization (without adjuvant). In both groups, the average of affinity constants obtained by means biosensor SPR experiments, was about 10^6 M⁻¹ (published in previous presentations). To identify residues that are part of putative epitopes recognized by both IgM groups, we use immunoinformatic techniques such as: homology modeling of the Fvs IgM and docking experiments. Primary sequences of anti-HEL IgM VH and VL regions were modeled by homology modeling at three web server portals: AbodyBuilder, abYmod and SI Repertoire Builder. The assessment of obtained models was performed by QMEAN-Disco and SAVESv6.0 online servers. Docking experiments were performed at HADDOCK, ClusPro and AbAdapt servers. As a first approach, we studied a set of anti-HEL IgM that, according to ELISA and Biosensor SPR competitive assays, would recognize the same epitope or epitopes with a high overlapping degree on HEL surface. Such epitope would be the same or in the vicinity of that recognized by the anti-HEL IgG F.9.13.7 and the recombinant ScFv F1F9, which contains the HEL catalytic site. The epitope or epitopes near the catalytic site present certain rigidity since are formed mainly by alpha helix secondary structures. Also, adjacent to that epitope a second epitope is recognized by IgG D44-F10 and IgM antibodies such as HEL2. This particular epitope involves beta strands and disordered structures. The identification of the residues that comprise the first epitope formed mainly by alpha helices was easier to perform than those from the second epitope. However, it was observed that the results obtained with the docking servers depend on the structural conformation of IgM Fvs used in the in silico experiments. Better results, consistent with those obtained in ELISA and SPR biosensor experiments have been acquired with modeled IgM Fvs by the SI Repertoire Builder server more than with those modeled by AbBuilder platform. At the same time, better results were obtained by performing in silico experiments with servers HADDOCK and AbAdapt than ClusPro. Further experiments with the models from all anti-HEL IgM Fvs will give statistically more confident results.

Vesículas extracelulares bacterianas como novedosas nanoherramientas terapéuticas

Ana Paula Domínguez Rubio^{1,2*}, Cecilia L. D'Antoni^{1,2}, Antonio Marcilla^{3,4}, Mariana Piuri^{1,2}, Oscar E. Pérez^{1,2}

¹Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. ²Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Buenos Aires, Argentina. ³Àrea de Parasitologia, Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i Parasitologia, Universitat de València, Burjassot, Valencia, Spain. ⁴Joint Research Unit on Endocrinology, Nutrition and Clinical Dietetics, Health Research Institute La Fe, Universitat de Valencia, Valencia, Spain. *apaudr@qb.fcen.uba.ar

Las vesículas extracelulares (VEs) son de tamaño nanométrico y están compuestas por una bicapa lipídica con componentes citosólicos como ácidos nucleicos (ADN, ARN) y proteínas. Lo que hasta el momento está claro es que estos nanovehículos bacterianos son producidos constantemente y se les ha atribuido participación en la comunicación la microbiota-hospedador (comunicación interreino).

Nuestros resultados indican que en las VEs producidas por *Lactocaseibacillus casei* BL23 tienen un tamaño de 50 ± 3 nm y su concentración varía a lo largo de las fases de cultivo, según lo indican los resultados obtenidos por Nano Tracker Analysis. A su vez, contienen ADN, ARN y proteínas y por análisis proteómicos demostramos que el contenido proteico no es estocástico y hemos identificado proteínas asociadas a la actividad probiótica¹. A su vez, resultados de Microscopía Confocal mostraron que las VEs, son internalizadas por la línea celular de epitelio intestinal Caco-2 y su contenido de ARN se libera en el núcleo, mientras que su membrana permanece en el citosol. Por otro lado, resultados con las VEs de la bacteria *Bacillus subtilis* 168, cuyo tamaño fue de 115 ± 27 nm, mostraron que son internalizadas y transportadas desde la cara apical a la basal de manera tiempo dependiente (Microscopía Confocal y Nano Tracker Analysis). Las VEs intactas fueron transportadas en un lapso de tiempo de entre 60 y 120 min con una eficiencia de absorción del 30%. A su vez, demostramos que el transporte de las VEs a través de la monocapa de células polarizadas es dosis-dependiente (Nano Tracker Analysis). Por otro lado, las VEs bacterianas no afectaron la proliferación celular, ni la viabilidad, ni presentaron efectos citotóxicos en las células de la línea celular Caco-2².

El transporte a través del epitelio intestinal podría ser el primer paso que le permitiría a las VEs bacterianas llegar al torrente sanguíneo para luego poder ser transportadas y liberar su contenido a los tejidos y órganos extraintestinales donde ha demostrado el efecto benéfico de los probióticos³. A futuro, la expresión y encapsulación de pequeños ARN, proteínas y/o antígenos en las VEs de bacterias probióticas podría representar una novedad científica con aplicaciones en nutraceuticos y terapias clínicas (Fig. 1).

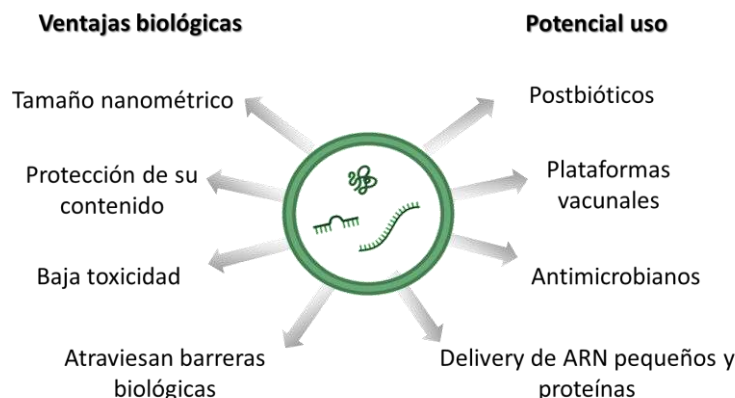


Fig. 1. Ventajas biológicas y potencial uso de las VEs bacterianas para uso terapéutico

Referencias:

- 1 A. P. Domínguez Rubio, J. H. Martínez, D. C. Martínez Casillas, F. Coluccio Leskow, M. Piuri and O. E. Pérez, *Front. Microbiol.*, 2017, **8**, 1–12.
- 2 A. P. Domínguez Rubio, J. H. Martínez, M. Palavecino, F. Fuentes, C. M. Sánchez López, A. Marcilla, O. E. Pérez and M. Piuri, *Sci. Rep.*, 2020, **10**, 1–7.
- 3 A. P. Domínguez Rubio, C. L. D'Antoni, M. Piuri and O. E. Pérez, *Front. Microbiol.*, 2022, **13**, 1–20.

DESIGN OF NANO CARRIERS FOR THE IMMOBILIZATION AND CONTROLLED RELEASE OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES

Brianne Salvati^{1,2}, Gloria Smith Ramírez³, Patricio Román Santagapita^{4,5}, Johanna Marcela Flórez-Castillo³, and Mercedes Perullini^{1,2}

¹Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física. Buenos Aires, Argentina.

²CONICET-Universidad de Buenos Aires. Instituto de Química Física de los Materiales, Medio Ambiente y Energía (INQUIMAE). Buenos Aires, Argentina. ³Universidad de Santander UDES, Grupo de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas para la Sostenibilidad-CIBAS.

⁴Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamentos de Industrias y Química Orgánica. Buenos Aires, Argentina. ⁵CONICET-Universidad de Buenos Aires. Instituto de Tecnología de Alimentos y Procesos Químicos (ITAPROQ). Buenos Aires, Argentina.

Antimicrobial peptides (AMPs) have attracted importance as new potential drugs due to the advantages that they exhibit regarding conventional antibiotics. These compounds are characterized by having a broad antimicrobial spectrum and multiple mechanisms of action, which hinders the development of resistance in microorganisms. Despite the above, the clinical use of this type of compounds is limited due to their short half-life, mainly because they are susceptible to degradation by proteases. Therefore, a proposed alternative to overcome these disadvantages is the immobilization and/or encapsulation of peptides on biocompatible carriers. Based on works described in the literature and previous experience of our group, we focused on the design of two different carrier systems: 1) rigid mesoporous silica nanoparticles (MSNPs) with or without a chitosan shell to allow for covalent immobilization of the peptide, and 2) alginate (a natural biopolymer) nanogels (ANGs). Unlike biopolymers nanogels, MSNPs are physically and chemically stable and their physicochemical properties can be tuned to allow for a controlled release of their content and they offer the possibility of surface functionalization allowing the active targeting of different cell populations. On the other hand, for several biomedical applications such as formulations meant for intravenous route administration, the possibility of having a stable aqueous solution of ANGs is far more promising.

Taking into account the above, this work presents the design, synthesis, characterization and bioactivity of bioconjugates composed of the Ib-M6 antimicrobial peptide immobilized both on ANGs and MSNPs. This peptide has been reported as bioactive against gram-negative bacteria such as *Escherichia coli* O157:H7, presenting a half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) in the range 6-9 μM. The bioconjugates Ib-M6/ANGs were prepared by direct crosslinking of the negatively charged alginate polymer with Ca²⁺ cations and the Ib-M6 peptide, which exhibits a net charge +6, in aqueous medium. The MSNPs were synthesized by a sol gel process, using tetraethoxysilane as silica precursor, and then the peptide was incorporated by adsorption in aqueous media (Ib-M6/MSNPs) or the MSNPs were coated with chitosan (1% w/w in acetic acid 2% v/v) and the immobilization of Ib-M6 was carried out by the formation of an amide bond

between carboxyl groups of the peptide and amine groups of chitosan. The as-prepared nanocarriers and the Ib-M6 bioconjugates were characterized by DLS, SEM, FT-IR, and SAXS. The antibacterial activity of the Ib-M6 bioconjugates was evaluated by the microdilution procedure using a synthetic aqueous sample contaminated with *Escherichia coli* O157:H7. The antibacterial activity of the free Ib-M6 peptide and the three different nanocarriers were also performed for comparative purposes. The results showed that it was possible to reach a high percentage of inhibition of the growth of *E. coli* O157:H7 after 24 h with the designed nanocarriers, which also confer protection against protease attack (trypsin).

Keywords: Bioconjugates, Co-precipitation method, Chitosan

Presenting author's email: brianne.salvati@gmail.com

Desarrollo de un método por HPLC MS/MS para la obtención del perfil de disolución de MCOs de Levotiroxina

Camila Olivera^{a,b,c,*}, Cecilia Henestrosa^d, Silvina Favier^d, Sabrina Flor^{a,b,c}, Silvia Lucangioli^{a,b,c}

^a Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

^b Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Departamento de Tecnología Farmacéutica, CABA, Argentina.

^c Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Instituto de Tecnología Farmacéutica y Biofarmacia (InTecFyB), CABA, Argentina.

^d Universidad Nacional de San Luis, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Área de Farmacotecnia, Ética y Legislación Farmacéutica, Departamento de Farmacia, San Luis, Argentina.

* camiolivera9@gmail.com, slucangi@ffyba.uba.ar

El hipotiroidismo es considerado como una de las enfermedades endémicas más comunes, en la que la glándula tiroidea no logra cumplir su función al producir insuficiente T4¹. Durante la etapa neonatal, en la cual continúa el desarrollo y maduración cerebral, las hormonas tiroideas tendrán un rol fundamental. La tiroxina (T4) deriva en triyodotironina (T3) en los tejidos periféricos y ésta será la encargada de desencadenar la regulación génica que involucra a proteínas requeridas en la regulación de la respiración celular, termogénesis, crecimiento y diferenciación celular². La levotiroxina sódica (LTX) actúa como terapia de reemplazo para estos casos donde la secreción de T4 es inadecuada y cuya función implicaría el normal desarrollo del sistema nervioso central en infantes. Si bien se encuentran disponibles numerosas formulaciones de administración oral de LTX, no existe aún una formulación apropiada para la administración de este activo en pacientes neonatos, debido que la dosis utilizada se encuentra en una concentración de 10-15µg/kg/día. Como respuesta a esta necesidad, nuestro grupo de trabajo ha desarrollado minicomprimidos orodispersables (MCOs) de LTX, que presentan un tamaño menor a 3 mm y una rápida disgregación al ser colocados en la cavidad oral, lo que los hace apropiados para este grupo etario y permiten una adecuada dosificación mejorando la eficacia terapéutica del tratamiento.

Antes de ser administrados, estos minicomprimidos deben cumplir con todos los parámetros requeridos por la autoridad sanitaria. Entre estos parámetros se encuentra el perfil y ensayo de disolución. Dado las pequeñas concentraciones de LTX utilizadas en los MCOs (10 y 15µg/comp) y a las bajas concentraciones con las que se cuenta una vez disuelto el MCO en el vaso de disolución, fue necesario desarrollar y adaptar un método que sea selectivo y altamente sensible para poder llevar adelante el ensayo.

El análisis se llevó a cabo por un método por HPLC-MS/MS donde la columna cromatográfica utilizada fue Hypersil GOLD C18 (100mm x 2.1 mm, tamaño de partícula de 3µm) de Thermo Scientific. Se empleó un método isocrático Metanol: Ácido fórmico 0,05% (55:45) con un flujo de 0,3 mL/min. La temperatura de la columna se mantuvo a 25°C y el volumen de inyección fue de 5µL. La detección se llevó a cabo mediante un espectrómetro de masas en tándem con ESI como fuente de ionización. Se trabajó en modo SIM [M+H]⁺ y en modo SRM (transición 777,6↔731,6) ambos en modo positivo. Parámetros como temperatura de vaporización, gas carrier, temperatura del capilar y energía de colisión, entre otros, fueron optimizados mediante infusión directa de 1ppm de estándar.

Mediante este método, se logró obtener el perfil de disolución de los MCOs donde se observó que antes de los 2 minutos se producía la liberación del 100% de activo.

¹ Braverman LE, Cooper DS (Ed). (2013) Introduction to Hypothyroidism. In Braverman LE, Cooper DS (eds.). *Werner & Ingbar's: The thyroid: a fundamental and clinical text*. 10th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; Págs.523-5.

² Vella, Kristen R.; Hollenberg, Anthony N. (2017). The actions of thyroid hormone signaling in the nucleus. *Molecular and Cellular Endocrinology*, (), S0303720717301697-. doi:10.1016/j.mce.2017.03.001.

ACTIVIDAD ANTIHERPÉTICA DE EXTRACTOS DE PLANTINES DE *MELIA AZEDARACH* L MICROPROPAGADOS *IN VITRO*

Montalbetti Carlos A(1); Bueno Carlos(1); Zelada Alicia(2); Alché Laura E.(1); Galdeano Ernestina(3); Petrera Erina(1);

1. Laboratorio de Virología: Agentes antivirales y citoprotectores. IQUBICEN-UBA-CONICET. Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
2. Laboratorio de Agrobiotecnología y Virología Molecular. IBBEA-UBA- CONICET. Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires
3. Instituto de Botánica del Nordeste, (CONICET-UNNE), Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste.

La OMS estima que aproximadamente el 67% de la población mundial menor a 50 años se encuentra infectada con Herpes Simplex Tipo 1 (HSV-1) y un 13% con Herpes Simplex Tipo 2 (HSV-2). El aciclovir y análogos de nucleósidos relacionados pueden tratar las infecciones por HSV, pero presentan alta probabilidad de generar resistencia. Debido a la urgencia por encontrar nuevas terapéuticas antivirales, nuestras investigaciones se han focalizado en el estudio de moléculas de origen natural. Demostramos que extractos semipurificados obtenidos a partir de hojas de *Melia azedarach* L inhiben la multiplicación de virus DNA y RNA, en ausencia de citotoxicidad. Asimismo, inhiben la replicación de los virus HSV-1 y HSV-2 en modelos de infección murina. Con el objetivo de obtener un potencial fitomedicamento de acción tópica contra el herpes y para hacer más sustentable la obtención de los extractos, comenzamos a trabajar con 4 clones de plantines de *M. azedarach* L. micropropagados *in vitro*. Las extracciones de los plantines se realizaron con acetato de etilo, se les evaporó el solvente y luego se resuspendieron en medio de cultivo. Se obtuvieron 4 extractos correspondientes a cada clon: R, E, J1 y J2. Se evaluó la citotoxicidad de los extractos en células Vero tratadas durante 48 horas, mediante la técnica de MTT. Los valores de CC_{50} obtenidos fueron: 518 $\mu\text{g/mL}$ (R), 690 $\mu\text{g/mL}$ (E), 265,5 $\mu\text{g/mL}$ (J1) 796,1 $\mu\text{g/mL}$ (J2). Seguidamente, se evaluó la actividad antiviral mediante un ensayo de rendimiento viral a las 24 horas p.i. y posterior titulación por formación de placas. Se determinaron las CE_{50} frente a los virus HSV-1 KOS: 59.61 $\mu\text{g/mL}$ (R) 21.89 $\mu\text{g/mL}$ (E) 13.71 $\mu\text{g/mL}$ (J1) 242.3 $\mu\text{g/mL}$ (J2); HSV-2 G: 101.6 $\mu\text{g/mL}$ (R), 157.3 $\mu\text{g/mL}$ (E), 8.21 $\mu\text{g/mL}$ (J1), 389.9 $\mu\text{g/mL}$ (J2); HSV-2 MS: 17.14 $\mu\text{g/mL}$ (R), 20.14 $\mu\text{g/mL}$ (E), 10.71 $\mu\text{g/mL}$ (J1), 22.31 $\mu\text{g/mL}$ (J2). De la misma manera evaluamos la actividad antiviral frente a dos cepas de HSV-1 TK- y se determinaron las CE_{50} , HSV-1 B2006: 54 $\mu\text{g/mL}$ (R), 0,28 $\mu\text{g/mL}$ (E), 0,26 $\mu\text{g/mL}$ (J1), 25,12 $\mu\text{g/mL}$ (J2); HSV-1 Field: 44 $\mu\text{g/mL}$ (R), 10,5 $\mu\text{g/mL}$ (E), 5,84 $\mu\text{g/mL}$ (J1), 42,4 $\mu\text{g/mL}$ (J2). Por otro lado, se evaluó la inhibición de la replicación de HSV-1 KOS en células de retina humana (H-RPE) producida por el extracto del clon J1 obteniéndose la CE_{50} 0,47 $\mu\text{g/mL}$.

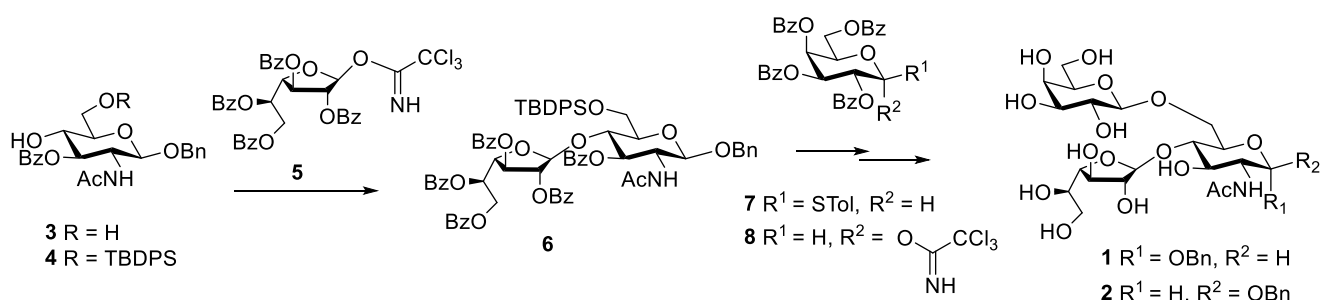
Se comprobó que los cuatro extractos de los clones de plantines evaluados presentan actividad antiviral tanto contra los virus HSV-1 como HSV-2, siendo el CJ1 el más activo. Asimismo, todos inhiben las cepas de HSV-1 TK- resistentes al aciclovir. Debido a estos resultados tan alentadores, actualmente estamos tratando a los plantines con distintos elicitores para aumentar la producción de metabolitos secundarios y así su bioactividad.

Síntesis del análogo β del determinante trisacárido en la adhesión de mucinas de *Trypanosoma cruzi*

Cori CR^{1*}, Altaleff L¹, de Lederkremer R¹, Gallo-Rodríguez C¹

¹ CIHIDECAR, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Pabellón II. Ciudad Universitaria (1428), Buenos Aires, Argentina. *carmencori@qo.fcen.uba.ar

Las glicoproteínas tipo mucinas son componentes principales en la superficie del protozoo *T. cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas. Los oligosacáridos en las mucinas están unidos *O*-glicosidicamente a la proteína *via* α -GlcNAc que se encuentra sustituida, a su vez, con residuos de β -Galp y β -Galf dependiendo de la cepa. En la cutícula interna de la ampolla rectal del insecto vector triatomino, se adhieren las formas epimatigotes constituyendo un paso crítico para su diferenciación en formas tripomastigotes metacíclicos, altamente infectivos. Los ensayos de adhesión *ex vivo* en presencia de oligosacáridos sintetizados químicamente como α -bencil glicósidos por parte de nuestro grupo permitieron la identificación de la estructura trisacárida bencil β -D-Galp(1 \rightarrow 6)-[β -D-Galf(1 \rightarrow 4)]-D-GlcNAc α (**1**) como determinante de adhesión [1]. En este trabajo, presentamos la síntesis de un análogo del trisacárido **1**, el bencil glicósido β **2**, con el objetivo de estudiar la influencia de la configuración anomérica de la unidad de GlcNAc en la adhesión a la cutícula interna de la ampolla rectal de *Triatoma infestans*. El compuesto **1** se había sintetizado mediante la introducción de una unidad Galp en OH-6 primario seguido de una unidad Galf en OH-4 de un derivado de GlcNAc [2]. Sin embargo, esta estrategia no fue exitosa para su análogo β **3**. Por ese motivo, se llevó a cabo una estrategia alternativa cambiando el orden de introducción de las unidades de glicosilo. Se protegió el OH-6 de **3** con un grupo sililo (TBDPS) y luego se siguió una secuencia de glicosilación de 4-OH de **4** con un donador de Galf, desprotección de la posición 6 de **6** y glicosilación del 6-OH con un donador de Galp. Se discutirán los resultados de las estrategias.



Palabras clave: Galactofuranosa, Glicosilación, *Trypanosoma cruzi*, mucinas

Referencias:

- [1] M. d. I. M Cámara, V. Balouz, C. Centeno Cameán, C. R. Cori, G. A. Kashiwagi, S. A. Gil, N. P. Macchiaverna, M. V. Cardinal, F. Guaimas, M. M. Lobo, R. M. de Lederkremer, C. Gallo-Rodríguez, C. A. Buscaglia, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2019, 13, e0007418.
- [2] C. Gallo-Rodríguez, O. Varela, R. M. de Lederkremer, *Carbohydr. Res.* 1998, 305, 163.
- [3] Agustí, R., Giorgi, M. E., Mendoza, V. M., Kashiwagi, G. A., De Lederkremer, R. M., & Gallo-Rodríguez, C. (2015). *Bioorganic and Medicinal Chemistry* (Vol. 23, Issue 6, pp. 1213–1222), y referencias ahí citadas.

Enzymatic rational design guided by structural bioinformatics: Enhancing the affinity of PP1 to microcystin-LR with saturated mutagenesis followed by docking.

Alba-Posse Ezequiel^{1,2}, Bruque Carlos David³, Gasulla Javier^{1,2}, Nadra Alejandro^{1,2}

1 - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

2 - Universidad de Buenos Aires (UBA)

3 - Unidad de Conocimiento Traslacional Hospitalaria Patagónica, Hospital de Alta Complejidad El Calafate SAMIC, CP: 9405. El Calafate, Santa Cruz, Argentina.

ABSTRACT

BACKGROUND

The group is working on the development of an enzymatic colorimetric biosensor based on the inhibition of the Ser/Thr phosphatase PP1. The objective is to improve the biodetection of the cyanobacterial toxin microcystin-LR (MC-LR) in water samples.

RESULTS

From the 6270 possible variants of PP1, we filtered 129 candidates that incremented both affinity and stability according to a FoldX Stability and Autodock Vina rigid docking compared to *wild-type*. Those 129 were reduced to 19 after full-flexible active site docking stage. From them, 3 variants were chosen for *in vitro* evaluation (p.Q249Y; p.D197F; p.S129W).

Site-directed mutagenesis were performed on PP1 plasmids with the Q5 Hot Start kit (NEB). *E.coli* BL21 were transformed with the mutated plasmids and each recombinant mutant protein was expressed and purified. They were evaluated in stability (by fluorescence spectroscopy), activity (pNpp dephosphorylation measured at 405 nm), and affinity to MC-LR (percentage of inhibition compared to wt). Although 2 of the 3 proteins (p.S129W; p.Q249Y) showed less affinity or significantly less activity, one of the 3 proteins (p.D197F) not only showed significantly more affinity to MC-LR than wild type, but also presented significantly more activity in solution. The proposed mechanism is due to the increment in hydrophobicity (ASP to PHE) of the hydrophobic pocket of PP1, where MC-LR "Adda" aromatic residue buries.

CONCLUSIONS

In order to obtain PP1 variants that perform better in an activity assay used for MC-LR biodetection, we conducted a saturated-mutagenesis bioinformatic screening. 3 variants were chosen for *in vitro* evaluation. One of the proteins (p.D197F) not only showed significantly more affinity to MC-LR than wild type, but also presented significantly more activity in solution.

H⁺/K⁺ competition in the inhibition of the H,K-ATPase by acid pump antagonists

Cerf N.T.^{a,b}, Faraj S.E.^{a,b}, Fernandez G.A.^a, Beraza J.^a, Rossi R.C.^{a,b}, Montes M.R.^{a,b}

a Universidad de Buenos Aires. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Departamento de Química Biológica. Buenos Aires, Argentina.

b Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) – Universidad de Buenos Aires. Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas "Prof. Alejandro C. Paladini" (IQUIFIB). Buenos Aires, Argentina.

The gastric H,K-ATPase is a membrane protein located in the parietal cells of the stomach, responsible for acidifying gastric juice. Driven by ATP hydrolysis, the H,K-ATPase couples H⁺ extrusion to the uptake of K⁺. The reaction cycle of the H,K-ATPase includes the interconversion between two main states of the enzyme, E1 and E2. The ion binding sites alternate between being exposed toward the cytoplasmic side (E1, with high affinity for H⁺) and the extracellular side (E2, with high affinity for K⁺). The H,K-ATPase is the molecular target of different drugs for the treatment of diseases related to acid secretion. The presence of a hydrophobic pocket exposed to the extracellular medium was determined from the analysis of the protein structure. Such a pocket has been proposed as the potential interaction site of compounds belonging to two families of inhibitors: the classic *proton pump inhibitors* (PPIs) and the *acid pump antagonists* (APAs), recently marketed in Asia.

This work aims to evaluate the effect of [H⁺] on the competition of K⁺ and APAs (vonoprazan and tegoprazan) for the binding to the extracellular side of the gastric pump. We measured enzyme activity and the kinetics of E1–E2 conformational changes using a non-compartmentalized preparation in order to evaluate the conditions that increase the potency of APAs. To explore the contribution of individual amino acids to ligand binding, we performed a prediction of pKa values in both states.

We found that APAs bind preferentially to the luminal-facing E2 state; binding to the cytoplasmic side of the enzyme also occurs, even though with low affinity. Data were fitted by non-linear regression to a minimal model that adequately describes the interaction between the H,K-ATPase, APAs and K⁺ at different pH. Our results suggest that the competition between K⁺ and H⁺ could explain the increased potency of APAs at acidic pH, as an alternative to the protonation of the inhibitors, which is currently the only proposed explanation.

Keywords: H,K-ATPase, kinetic, conformational states, inhibitors.

Acknowledgment: Funding: This work was supported by Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica [grant number PICT1053]; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas [grant number PIP11220150100250CO]; Universidad de Buenos Aires [grant number UBACyT20020130100302BA].

DESARROLLO DE COMPRIMIDOS DISPERSABLES PEDIÁTRICOS PARA EL TRATAMIENTO DE INFECCIONES POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA

Filia MF^(1,4); Sandrone CA⁽¹⁾; Bernabeu E^(2,3,4); Fuentes P^(2,4); Moretton MA^(2,3,4); Chiappetta DA^(2,3,4); Mouriño V^(1,3,4) y **Prado HJ**^(1,3,4,*)

¹Cátedra de Tecnología Farmacéutica II (FFyB, UBA),

²Cátedra de Tecnología Farmacéutica I (FFyB, UBA),

³Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

⁴Instituto de Tecnología Farmacéutica y Biofarmacia (InTecFyB-UBA)

*hjprado@yahoo.com

Introducción

A pesar de que más de un millón de niños menores de nueve años están afectados por la infección con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) (1), los medicamentos específicamente destinados a este grupo etario son escasos. Por ello, es una práctica general el empleo de comprimidos destinados a los adultos, que son fraccionados y molidos manualmente para ser administrados a los niños. Esta práctica genera incertezas en la dosis administrada y en su biodisponibilidad. Entre las máximas prioridades en el tratamiento de las infecciones pediátricas por HIV se encuentra el desarrollo de formulaciones que sean seguras, eficaces, aceptables, con óptima farmacocinética y dosificación, particularmente con sistemas de administración novedosos. También se buscan estrategias o intervenciones que mejoren la adherencia al tratamiento (2). Los comprimidos dispersables para suspensión oral resultan una alternativa interesante, ya que estas formas farmacéuticas se desintegran en unos pocos segundos en contacto con el agua (3).

Objetivos

Desarrollar comprimidos dispersables pediátricos para suspensión oral, basados en la asociación de tres ingredientes farmacéuticos activos de acción antiviral zidovudina (AZT, 60 mg), lamivudina (3TC, 30 mg) y nevirapina (NVP, 50 mg)

Metodología

Se prepararon distintos comprimidos, mediante la técnica de compresión directa, aplicando un diseño experimental. Se realizaron estudios farmacotécnicos de los mismos en cuanto a su aspecto, geometría, dureza, tiempo de desintegración y friabilidad. Se seleccionó la formulación con las mejores características a la que se le determinó la uniformidad de contenido y su disolución (aparato II de la USP, paletas, en medio HCl 0,1 N). La concentración de los tres antivirales se determinó mediante cromatografía líquida de alta performance con detector de arreglo de diodos.

Resultados y Discusión

La formulación seleccionada contenía los tres principios activos y los excipientes dextratos, crospovidona y estearil fumarato sódico. Los valores obtenidos de tiempo de desintegración de 13 s, de friabilidad del 0,4% y de dureza de 12 kp resultaron muy adecuados. La formulación cumplía con los requerimientos de uniformidad de contenido y de disolución, liberándose más del 80 % de los tres principios activos luego de una hora.

Conclusiones

Los comprimidos dispersables para suspensión oral desarrollados y caracterizados cumplen con los requisitos preestablecidos y podrían constituir un aporte en el tratamiento de las infecciones por VIH en niños, ya que se adaptan a los requerimientos de dosificación y a las dificultades de deglución de la población pediátrica, mejorando así la adherencia terapéutica.

Referencias:

¹<https://data.unicef.org/topic/hiv/aids/global-regional-trends/>

²Penazzato *et al.* 78 (2018). *Journal of acquired immune deficiency syndromes* S10.

³Lal *et al.* *Journal of Pharmaceutical Sciences* 106 (2017) 2173-2177

Producción biotecnológica en larvas de insectos de las principales toxinas del veneno de *Lonomia obliqua*

Joaquin M. Birenbaum* (1), Lucia Moura (1), Ignacio Smith (1), Luciano Montero (1), Leonardo G. Alonso (1), Joaquín Poodts (1), Sol Rodriguez (1), Micaela A. Gritti (2), Alexandra M. Targovnik (1), María E. Peichoto (2), María V. Miranda (1).

1: Instituto de Nanobiotecnología (UBA-CONICET) Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina. 2: Instituto Nacional de Medicina Tropical (INMeT) ANLIS "Dr. Carlos G Malbrán", Puerto Iguazú, Misiones, Argentina.

* Correo electrónico: joaquinbiren@gmail.com

Los envenenamientos causados por artrópodos venenosos tales como arañas, escorpiones y lepidópteros son un problema sanitario emergente en las áreas rurales principalmente. *Lonomia obliqua* es un lepidóptero venenoso perteneciente a la familia Saturniidae. El contacto con las espículas de la oruga de esta especie causa un dolor instantáneo en la zona de contacto. El cuadro clínico puede evolucionar a una coagulopatía con hemorragias y, eventualmente, falla renal y muerte del individuo. El único tratamiento existente en el mundo para contrarrestar las complicaciones sistémicas de este envenenamiento es el antiveneno *Lonomia* producido por el Instituto Butantan de Brasil, el cual es producido en caballos hiperinmunizados con el veneno obtenido a partir de las espículas de la oruga de *L. obliqua*. En Argentina no se dispone de un recurso terapéutico propio y efectivo para dar respuesta a este evento de Salud Pública.

La proteína activadora de protrombina (LOPAP) y la proteína activadora del Factor X (LOSAC) son dos componentes muy importantes del veneno de *L. obliqua*, siendo responsables de los principales disturbios hemostáticos causados por el mismo en el ser humano. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un proceso biotecnológico basado en el sistema Baculovirus-Larvas de insecto para producir ambas toxinas recombinantes para su potencial aplicación como inmunógenos en reemplazo del veneno en la producción nacional de un antiveneno *Lonomia*.

LOPAP y LOSAC fueron expresadas en larvas de último estadio de *Rachiplusia nu* y *Spodoptera frugiperda*. Los baculovirus recombinantes contenían bajo el promotor de poliedrina el gen de cada toxina fusionado a una etiqueta de histidinas. El rendimiento alcanzado por gramo de larva en *S. frugiperda* fue de 54,5 ug para LOSAC y de 46,9 ug para LOPAP. Las larvas fueron procesadas y las proteínas recombinantes purificadas mediante Cromatografía de Afinidad de Iones metálicos inmovilizados (IMAC). Las fracciones de elución fueron estudiadas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa (RP-HPLC) y el grado de pureza alcanzado fue de 85,6% para LOSAC y 70% para LOPAP. Ambas toxinas recombinantes purificadas demostraron tener actividad procoagulante sobre plasma humano y, además, fueron eficientemente reconocidas por el antiveneno de *Lonomia* producido por el Instituto Butantan de Brasil. Los resultados permiten concluir que el proceso de producción biotecnológico de LOSAC y LOPAP en larvas de insectos fue eficiente, abriendo la oportunidad de su utilización para suplementar o reemplazar al veneno *L. obliqua* en la producción del antiveneno.

DISEÑO DE UN ENZIMOINMUNOENSAYO QUE PERMITA LA SEROTIPIFICACIÓN DEL VRUS DEL DENGUE EN SUEROS DE PACIENTES INFECTADOS BASADO EN UNA ESTRATEGIA INTEGRADA PARA LA EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DEL DOM III DE LA PROTEÍNA E DEL DENV FUSIONADOS A HIDROFOBINAS.

Julieta Cerezo¹, Alexandra Targovnik¹, María E. Smith¹, Eugenia Corrales Aguilar² Victoria Miranda¹, Julián Rodríguez Talou¹.

¹Cátedra de Biotecnología, Facultad de Farmacia y Bioquímica - Instituto NANOBIOTEC (UBA-CONICET). Junín 956, 6º (1113). Buenos Aires, Argentina. jrtalou@ffyb.uba.ar

²Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales CIET, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, Costa Rica

Introducción. El virus del dengue (DENV) presenta cuatro serotipos (1-4) antigénicamente diferentes. El dominio III (DomIII) de la proteína E, contiene múltiples epitopes neutralizantes que son serotipo-específicos, y carece de otros que desencadenan anticuerpos no neutralizantes de reactividad cruzada. Recientemente ha sido descrita una secuencia consenso para el DomIII, del DENV, la cual demostró capacidad de generar una respuesta inmune contra los 4 serotipos. En trabajos previos se produjo las distintas variantes del DomIII fusionados a hidrofobinas que permite una purificación en sistemas de dos fases acuosas y una inmovilización directa por adsorción del producto en placas multiwell usadas en técnicas de ELISA.

Objetivos. El objetivo del presente trabajo es presentar una estrategia integrada producción, purificación e inmovilización de un antígeno del DENV para el diseño de un enzimoimmunoensayo que permita detectar anticuerpos contra Dengue y además poder diferenciar los diferentes serotipos.

Metodología. Los antígenos se produjeron en sistemas de larvas de insectos y *P. pastoris*. Los sueros empleados fueron serotipificados por una técnica de micro neutralización por reducción de placas.

Resultados. Con el fin de evaluar los ELISA *in house* desarrollados, se construyeron curvas ROC según cada serotipo y sistema de expresión de los antígenos de sensibilización, a partir de las absorbancias para los sueros obtenidas en los ELISA clasificados como verdaderos positivos y verdaderos negativos según el ensayo de neutralización, considerado *gold standard*.

Conclusiones. Los ELISA *in house*, demostraron una exactitud general aceptable, a excepción del que utiliza el antígeno DomIII4HFBI expresado en larvas de insecto, el cual no demostró capacidad de discriminación. El ELISA *in house* puesto a punto en donde se utiliza el antígeno DomIII-consenso-HFBI expresado en *P. pastoris* presentó la mayor exactitud global, demostrando la mejor performance entre los ensayos evaluados.

Detección de biomarcadores proteicos a partir de un método rápido basado en aptámeros/CRISPR-Cas

Lautaro Otero Maffoni¹; Nerina Martinez²; Marcelo Kauffman^{2*}; Ana Sol Peinetti^{1*}

1. INQUIMAE, Departamento Química Inorgánica, Analítica y Química Física, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina
2. Instituto de Investigación y Medicina Traslacional, Universidad Austral, Buenos Aires, Argentina

E-mail: lautimaffoni@gmail.com

Los métodos de diagnóstico clínico son esenciales para la identificación, tratamiento y prevención de muchas patologías, siendo en algunos casos el determinante entre la vida o la muerte del paciente. El diagnóstico de varias enfermedades o formas de una enfermedad es un desafío debido a que muchos síntomas son inespecíficos, el diagnóstico involucra biopsias invasivas o costosas técnicas de secuenciación de última generación. Avances en el campo de la metabolómica y proteómica han generado nuevas oportunidades para identificar moléculas pequeñas y proteínas que funcionan como biomarcadores de la enfermedad. Así, a través de la identificación y obteniendo los perfiles de concentración de estas moléculas que difieren entre los pacientes que presentan la enfermedad de los que no, es posible encontrar biomarcadores presentes en las etapas tempranas que permitan predecir cómo se desarrollará la enfermedad. Debido a ello es necesario el desarrollo de nuevas tecnologías que permitan la detección y cuantificación de estos biomarcadores de manera rápida y sensible.

Los sistemas CRISPR/Cas son poderosas herramientas de edición de genes debido a su capacidad para reconocer y manipular con precisión los ácidos nucleicos. En los últimos años, además de la función de edición de genes, también muestran una gran promesa en aplicaciones de biodetección debido a su actividad secundaria de clivar ADN simple cadena (1, 2) y a la posibilidad de acoplar ésta con diferentes formas de detección fluorescente y electroquímica (3–5). En este trabajo hemos diseñado y puesto a punto un método de detección y cuantificación de biomarcadores de origen proteico (en particular, trombina) basado en aptámeros altamente específicos a éstas proteínas que permiten regular la actividad secundaria de CRISPR-Cas 12 y cuantificar el analito en concentraciones del picomolar de manera fluorescente (Figura 1). La incorporación de las técnicas de amplificación aumenta en gran medida la sensibilidad y disminuyen los tiempos del ensayo. Por otro lado, el uso de aptámeros permite la detección muy selectiva y amplía el rango de *targets* detectables, expandiendo el uso de la tecnología CRISPR/Cas, a analitos que no son ácidos nucleicos, y permitiendo adaptar la misma estrategia a múltiples proteínas con solo cambiar la secuencia del aptámero.

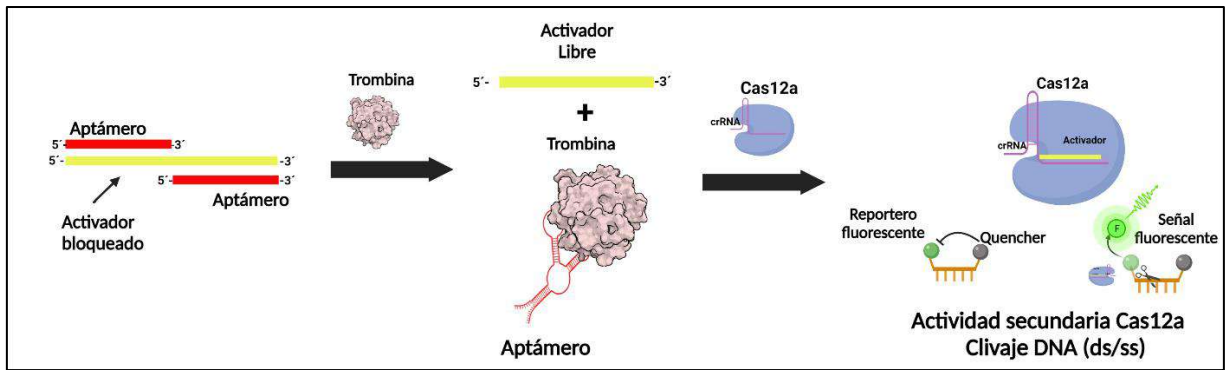


Figura 1: Esquema del sistema basado en Aptámeros/CRISPR-Cas

Referencias

1. C. Myhrvold, C. A. Freije, J. S. Gootenberg, O. O. Abudayyeh, H. C. Metsky, A. F. Durbin, M. J. Kellner, A. L. Tan, L. M. Paul, L. A. Parham, K. F. Garcia, K. G. Barnes, B. Chak, A. Mondini, M. L. Nogueira, S. Isern, S. F. Michael, I. Lorenzana, N. L. Yozwiak, B. L. MacInnis, I. Bosch, L. Gehrke, F. Zhang, P. C. Sabeti, Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13. *Science (80-.)*. **360**, 444–448 (2018).
2. J. S. Gootenberg, O. O. Abudayyeh, M. J. Kellner, J. Joung, J. J. Collins, F. Zhang, Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a and Csm6. *Science (80-.)*. **360**, 439–444 (2018).
3. Y. Xiong, J. Zhang, Z. Yang, Q. Mou, Y. Ma, Y. Xiong, Y. Lu, Functional DNA Regulated CRISPR-Cas12a Sensors for Point-of-Care Diagnostics of Non-Nucleic-Acid Targets. *J. Am. Chem. Soc.* **142**, 207–213 (2020).
4. R. Aman, A. Mahas, M. Mahfouz, Nucleic Acid Detection Using CRISPR/Cas Biosensing Technologies. *ACS Synth. Biol.* **9**, 1226–1233 (2020).
5. Y. Dai, R. A. Somoza, L. Wang, J. F. Welter, Y. Li, A. I. Caplan, C. C. Liu, Exploring the Trans-Cleavage Activity of CRISPR-Cas12a (cpf1) for the Development of a Universal Electrochemical Biosensor. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **58**, 17399–17405 (2019).

Desarrollo y caracterización de formulaciones orales de ácido ursodesoxicólico con aplicación en pediatría

Oriana Boscolo^{1,2}, Leandro Salvo¹, Fabian Buontempo¹, Sabrina Flor^{1,2}, Silvia Lucangioli^{1,2}

¹Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Departamento de Tecnología Farmacéutica, Ciudad de Buenos Aires, Argentina.

²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), Buenos Aires, Argentina.

En la actualidad la falta de formulaciones que se adecuen a la necesidad de determinados grupos etarios, como los pacientes pediátricos, es un problema frecuente a nivel mundial. Por lo que esta terapéutica debe ser cubierta por la formulación y elaboración de medicamentos que la industria farmacéutica no produce, sea por la complejidad de realizar ensayos clínicos o por la falta de rédito económico; o alguna otra causa que impida al paciente acceder al medicamento en tiempo y forma. Esto sucede con el ácido ursodesoxicólico (UDCA), el cual se encuentra disponible en las formas farmacéuticas para adultos: comprimidos y cápsulas. Ante la imposibilidad de ingerir comprimidos, los padres se ven obligados a colocar el contenido del mismo en agua para administrárselos a sus hijos. Sin embargo, esta práctica, dada la insolubilidad del UDCA en agua, disminuye notablemente la cantidad ingerida. Esto lleva a una terapéutica huérfana, siendo las formas farmacéuticas líquidas recomendadas para su administración en estos casos, reduciendo los errores en la dosificación y ayudar a la adherencia al tratamiento. El UDCA, también conocido como ursodiol, es un ácido biliar secundario que se sintetiza en el hígado y está presente en pequeñas cantidades en la bilis humana (1-2%). El UDCA reduce el contenido de colesterol de la bilis, por lo que se administra para disolver cálculos biliares (litolítico), como coadyuvante en el tratamiento de enfermedades hepáticas colestásicas y como terapia de puente para el trasplante hepático. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es desarrollar formulaciones líquidas huérfanas (suspensiones) de UDCA, evaluar la estabilidad fisicoquímica y microbiológica de las suspensiones a tres temperaturas durante 120 días y realizar un estudio preliminar de la biodisponibilidad oral relativa.

Se desarrollaron dos suspensiones de UDCA de 25 mg/ml, una de ellas se formuló con un vehículo completo, incluyendo humectantes y agentes de suspensión, edulcorantes, tampones y conservantes; la otra, con un número mínimo de excipientes. Para evaluar la estabilidad fisicoquímica de UDCA las muestras se envasaron en frascos de vidrio de color ámbar de 30 ml, rotulándose y almacenándose a tres temperaturas ($5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/ 60\% \text{ HR} \pm 5\% \text{ HR}$ y $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/ 75\% \text{ HR} \pm 5\% \text{ HR}$) con un periodo de evaluación de 4 meses y la toma de muestra a los intervalos de 7, 14, 30, 60, 90 y 120 días. Los parámetros fisicoquímicos evaluados fueron apariencia, pH, resuspendibilidad, volumen de sedimentación, tamaño de partícula y reología, y el contenido de UDCA en cada suspensión se determinó mediante HPLC-UV. las suspensiones fueron evaluadas *in vivo* en ratas para la determinación de los parámetros farmacocinéticos, tales como, concentraciones plasmáticas máximas ($C_{\text{máx}}$), tiempo hasta la $C_{\text{máx}}$ ($T_{\text{máx}}$) y el (IAUC_{0-12 h}) que representa el aumento en el área por encima de la línea de base después de la ingestión de UDCA.

Se lograron desarrollar dos suspensiones orales de UDCA con vehículos adecuados para permitir una correcta medición de la dosis. Ambas suspensiones mostraron adecuada estabilidad física, química y microbiológica. Mostraron una distribución unimodal del tamaño de las partículas, lo que se tradujo en una distribución homogénea. Así, se garantiza la dosis correcta cuando se administra a pacientes pediátricos. Ambas suspensiones, SA y SB, pueden conservarse a temperatura ambiente y en la heladera durante al menos 120 días y a 40°C durante 90 y 120 días, respectivamente. El UDCA presentó una biodisponibilidad oral relativa similar cuando se administró a través de las formas SA o SB, sin diferencias significativas. Se demostró que cuando se carga UDCA en suspensiones como SA y SB, su biodisponibilidad oral fue notablemente mayor comparada con una tableta comercial que se dispersa en agua para facilitar la administración oral a los niños.

Las suspensiones desarrolladas demostraron ser seguras y adecuadas y son ideales para uso pediátrico por su aceptabilidad, administración precisa de la dosis y adherencia al tratamiento. A su vez, se pueden almacenar en un hospital pediátrico o en la farmacia sin condiciones especiales de conservación, siendo una potencial transferencia a la farmacia hospitalaria y oficial.

Detección de autoanticuerpos del receptor de folato alfa: implicancias para posibles tratamientos en el trastorno del espectro autista

Lucio Maldonado¹, Marisol Toma^{2,3}, Santiago Flesler³, Luciana Capece¹, Itatí Ibañez¹

¹Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. ²Hospital Fernández, Ciudad de Buenos Aires.

³Hospital Alemán, CINNES, Ciudad de Buenos Aires.

El trastorno del espectro autista (TEA) agrupa diversos síndromes que ocurren durante el neurodesarrollo, con una incidencia en la población de hasta el 2% y con un diagnóstico generalmente tardío. Se asocian al autismo variadas comorbilidades que pueden empeorar con el tiempo si no hay un tratamiento adecuado. Se ha reportado una deficiencia cerebral de folato en personas que presentan autismo. Diversas investigaciones demuestran que esta deficiencia se produce en algunos casos, aproximadamente en un 75%, por una baja actividad del receptor de folato alfa (FR α) debido a la presencia de autoanticuerpos (FR α *autoantibodies*, FRAA) que impiden el buen funcionamiento.

El objetivo principal del proyecto es generar herramientas para el estudio y determinación de autoanticuerpos contra el receptor FR α . Se destaca el desarrollo de reactivos para desarrollar un *kit* de detección de FRAA aplicando la técnica de ELISA y la generación, a través de herramientas computacionales, de modelos estructurales del complejo FR α -anticuerpo que permitan estudiar su interacción y cómo la misma repercute en el funcionamiento del receptor.

Para poder cumplir con los objetivos del proyecto se utilizará un plásmido que permite expresar el FR α en células eucariotas. Las proteínas se purificarán según un protocolo establecido y se analizarán las fracciones obtenidas mediante Western Blot y tefido de geles con coomassie blue brilliant para determinar concentración, pureza e identidad de la proteína en estudio. Posterior a la expresión de FR α se buscará determinar la presencia de FRAA utilizando un protocolo basado en la técnica ELISA. Se sensibilizarán placas con diferentes diluciones del FR α recombinante y se bloquearán los sitios sin reaccionar. Para la puesta a punto del ensayo se agregarán diluciones de un fragmento de anticuerpo humano (VH) cuya secuencia está disponible para síntesis y que será previamente expresado utilizando un sistema procariota. Una vez establecido el sistema, se utilizarán diluciones de plasma o suero de pacientes y se incubarán durante 2 h a temperatura ambiente. Luego de los lavados correspondientes, se detectará la presencia de VH o FRAA utilizando anticuerpos anti-his o anti-human (según corresponda) acoplados a la peroxidasa HRP y se utilizará el reactivo TMB para realizar la lectura correspondiente. Las muestras de pacientes se obtendrán por contribuciones voluntarias con el debido consentimiento informado y los donantes recibirán de forma gratuita el resultado.

El trabajo se complementará con métodos computacionales. Para el modelado estructural se tomará la estructura cristalográfica del FR α y el VH humano se modelará utilizando *AlphaFold*. Luego de tener ambas estructuras, se usará la herramienta *Colabfold* para obtener el complejo estructural receptor/anticuerpo. A partir de la estructura del complejo y de las partes por separado, se realizarán simulaciones extensas de dinámica molecular clásica utilizando el paquete de programas AMBER. Recolectada la información, se analizarán cambios estructurales y dinámicos, con presencia y ausencia de sustrato. También se evaluarán interacciones y sitios de unión claves para la interacción entre ambas proteínas.

Como resultado del proyecto esperamos generar un método de detección de FRAA que facilite el diagnóstico a bajo costo. Además, esperamos generar resultados de estudios computacionales del complejo receptor-anticuerpo que a futuro permitan definir los mecanismos de acción de los FRAA.

Jornadas "Aportes de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y la Facultad de Farmacia y Bioquímica al desarrollo de nuevas herramientas terapéuticas y de diagnóstico"

23 y 29 de noviembre de 2022.

Caracterización estructural de derivados del ácido quinurénico y estudio del comportamiento como ligandos de iones lantánidos como potenciales sondas fluorescentes

Oppezzo G.A., Shmidt M.S., Guerberoff C.L., Arceo I., Di Salvo F., Blanco M.M.

El ácido 3-hidroxiquinurénico (3-HOKA), un derivado hidroxilado en posición 3 del ácido quinurénico (ácido 4-quinolinona-2-carboxílico), presenta una intensa fluorescencia a 474 nm y un alto rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_f : 0,73).¹ Debido a estas características y a la ausencia de efectos citotóxicos significativos,¹ resulta una molécula muy atractiva como sonda fluorescente en aplicaciones biológicas. Conjuntamente, un importante número de compuestos de coordinación de iones lantánidos son empleados para la marcación celular en estudios por bioimágenes, entre otras aplicaciones. En particular, los sistemas de Eu(III) y el Tb(III) son los más utilizados, debido a sus bandas de emisión finas y definidas². Teniendo en cuenta que los derivados del 3-HOKA contienen grupos funcionales tales como hidroxilo fenólico, carboxilo y amino, adecuados para establecer uniones de coordinación con iones metálicos, se consideró la posibilidad de conjugar las propiedades fluorescentes del 3-HOKA con aquellas de los lantánidos mediante la síntesis de una nueva familia de compuestos coordinación.

Por un lado, se llevó a cabo la cristalización y el estudio estructural por DRX de monocristal de una serie de derivados del ácido quinurénico (KYNA) incluido el 3-HOKA. El estudio cristalográfico aportó información estructural adicional y complementaria a los estudios de caracterización y propiedades reportados recientemente.¹

Por otro lado, se utilizó al 3-HOKA como ligando para la obtención de compuestos de coordinación de iones lantánidos. Se exploraron diferentes variables de síntesis, tales como concentración, anión de la sal utilizada como compuesto de partida ($\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{TbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), relación estequiométrica, pH, base empleada, solvente, temperatura y la presencia de ligandos auxiliares (ácido oxálico, ácido trimésico). Se emplearon síntesis del tipo hidro y solvotermal, empleando instrumental específico. Se ensayaron variedad de solventes y condiciones para mantener los complejos en solución y promover su cristalización, con el objetivo de elucidar su estructura por DRX de monocristal. En todos los casos se evidencia la formación de compuestos de coordinación de forma inmediata, observando la aparición de precipitados color amarillo, que se distinguen del ligando aislado, o una coloración amarilla intensa en el caso que permanezcan en solución. Si bien hasta el momento no se ha logrado obtener material cristalino adecuado para llevar a cabo el estudio estructural por DRX de monocristal, se han empleado diferentes técnicas de caracterización, como DRX de polvos, FTIR y análisis elemental sobre los sólidos obtenidos. La similitud observada en los espectros IR y en los difractogramas de polvos de los complejos obtenidos a partir de las sales de cloruros de Eu(III), Gd(III) y Tb(III) empleando las mismas condiciones de síntesis, podría asociarse con sistemas isoestructurales. Para los derivados de La(III), se observa un diferente patrón de señales lo que indica que la presencia del anión en el material de partida juega un rol importante en el sistema resultante. Los estudios fotofísicos están en proceso.

Referencias:

1. Shmidt M.S. *et al.* Dyes and Pigments 2019; Vol 162, 552 - 561.
2. Gai *et al.* Inorg. Chem. 2012 Dec 17; 51(24):13128 - 13137.

P 8654**Proyecto FICELTAR: Filtro de Células Tumorales Argentino**Felix-Pozzi M¹, Mercado D¹, Perez D¹, Ostapchuk G^{2 1}, Catalano P^{2 1 3}, Berlín G¹¹ *Departamento de Micro y Nanotecnología - Centro Atómico Constituyentes - Comisión Nacional de Energía Atómica*² *INSTITUTO DE NANOCIENCIA Y NANOTECNOLOGIA -CONICET/CNEA- NODO CONSTITUYENTES*³ *Facultad de Farmacia y bioquímica*

Las responsables de diseminar un tumor primario localizado en un órgano determinado hacia otros distantes, son las Células Tumorales Circulantes (CTCs) al infiltrarse en la sangre periférica del paciente. Este proceso compuesto de varias fases conocido como metástasis, es el responsable de más del 90% de los fallecimientos asociados al cáncer. La detección de pocas unidades de CTCs en volúmenes de sangre extraídos de un paciente y su correcto recuento, permitiría realizar una detección temprana del tumor y/o conocer la evolución de una terapia. Es por ello que desarrollamos este filtro cuyo objetivo primario es aportar un dispositivo para biopsia líquida basado en las propiedades físicas de las células tumorales (tamaño y deformabilidad). Este sistema está compuesto por una bomba de jeringa, dos descartables, un portafiltro de diseño propio y una membrana porosa microfabricada mediante la técnica electroplating, cuya sección circular es de 1 cm de diámetro, con más de 200.000 poros y cuyos diámetros varían entre 8, 10 y 12 μm . Los ensayos de pasaje de medio de cultivo y células a través de la membrana porosa, fueron llevados adelante empleando las líneas celulares correspondientes a linfoma de Hodkin clásico: KMH2, UH01 y L1236, y tuvieron como objetivo primario estudiar la performance de captura del sistema. Aunque fue concebido como un dispositivo para diagnóstico, puede ser adaptado para funcionar como *cell sorter* además de dejar abiertas las posibilidades de modificarlo para ser utilizado con el fin que se desee.

Evaluación del impacto sobre la salud de nanopartículas inorgánicas

Mariana Garcés, Natalia Magnani, Pablo Evelson

E-mail de contacto: mgarces@ffyb.uba.ar

La nanotecnología es una ciencia emergente que involucra la manipulación de la materia a escala nanométrica. Estos materiales se utilizan con fines comerciales ya que se incorporan a los artículos de uso cotidiano a un ritmo cada vez mayor. Se incluyen dentro de esta última categoría productos farmacéuticos, cosméticos, alimentos, y productos para el hogar, entre otros. Las propiedades únicas fisicoquímicas que hacen que las nanopartículas (NP) sean tan atractivas desde el punto de vista comercial, podrían a su vez estar asociadas con efectos potencialmente peligrosos. Por ello, el estudio del potencial toxicológico de los nanomateriales hizo que una rama particular de la nanotecnología, la nanotoxicología, emergiera unos años después de que comenzaran los primeros desarrollos nanotecnológicos. En este sentido, la nanotoxicología avanzó en el desarrollo de estrategias específicas para evaluar las interacciones de las NP con sistemas biológicos, siendo su objetivo principal dilucidar si las propiedades de las NP producen efectos no deseados en el medio ambiente o los seres vivos. Numerosos estudios han evidenciado que diferentes NP pueden presentar propiedades fisicoquímicas diferentes, como composición, tamaño, forma, carga o recubrimiento, y esto afecta no solo su interacción con otros materiales, sino también tienen su biodistribución y unión con los sistemas. En lo que refiere a los posibles mecanismos toxicológicos iniciados por la exposición a NP, los estudios *in vivo* como *in vitro* muestran que la toxicidad de las NP está estrechamente asociada con la capacidad de aumentar los niveles de especies activas del oxígeno intracelulares modificando el estado redox celular, y/o los niveles de mediadores proinflamatorios (Figura 1). Tanto el pulmón como la piel constituyen las principales vías de entrada de NP, ya sea por el uso directo de las mismas o por su presencia en el ambiente. Este trabajo resume la importancia de una caracterización fisicoquímica exhaustiva y la importancia de establecer una correlación entre estas propiedades y los efectos toxicológicos en los sistemas biológicos, con especial énfasis en las NP de origen inorgánico como las de plata, oro, hierro y níquel tanto en modelos *in vivo* como *in vitro*. Los resultados presentados contribuyen a la comprensión de los mecanismos subyacentes en el aumento de patologías asociadas a la exposición a NP en el sistema cardiorrespiratorio y la piel. A nivel pulmonar, las características fisicoquímicas de las NP le confieren la capacidad de alterar el metabolismo del O₂, iniciando daño oxidativo y cambios del epitelio pulmonar que llevarían a alteraciones en la función pulmonar. Además, la respuesta a nivel local puede generar una respuesta fisiopatológica en órganos a distancia mediante una respuesta sistémica. Los resultados sugieren que las NP de oro serían más seguras mientras que, en las de plata, hierro y níquel debería tenerse en cuenta la dosis y el tiempo de exposición.

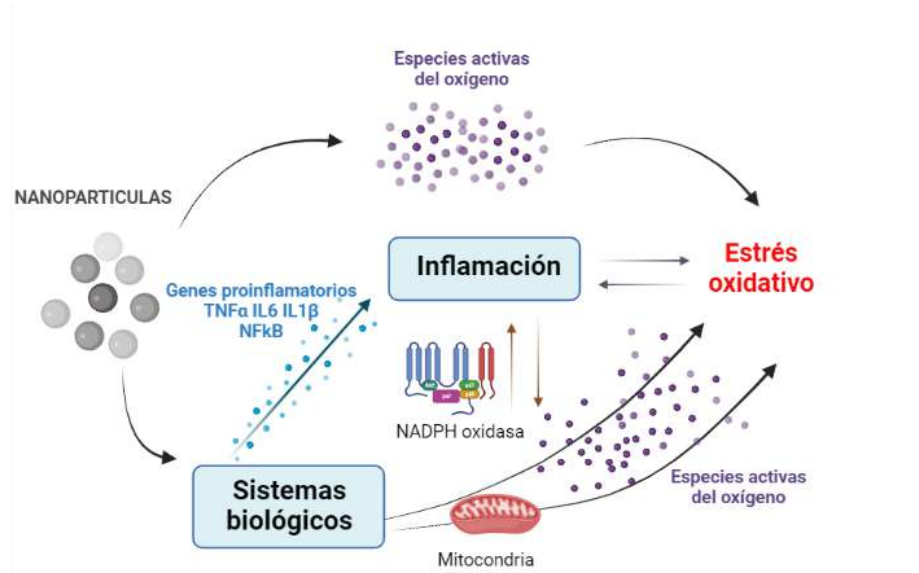


Figura 1: Factores principales que inducen estrés oxidativo como consecuencia de la exposición a NP. Los mecanismos por los cuales las NP inducen la formación de especies activas del oxígeno está relacionada con factores relacionados a las NP y la interacción con sistemas biológicos. Luego de ser internalizadas en las células, las NP generan especies activas del oxígeno como consecuencia de la interacción con la mitocondria y la NADPH oxidasa (NOX). Sumado a esto, la interacción de las NP con las células estimula una respuesta inflamatoria a través de la síntesis de mediadores proinflamatorios como IL-1 β , IL-6 and TNF- α .

Diseño y caracterización de películas comestibles orodispersables de ácido ursodesoxicólico aplicadas a la farmacoterapia pediátrica

Boscolo Oriana^{1,2}, Sabrina Flor^{1,2}, Silvia Lucangioli^{1,2}, Ana Rojas^{2,3}

¹Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Departamento de Tecnología Farmacéutica, Ciudad de Buenos Aires, Argentina.

²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), Buenos Aires, Argentina.

³Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Industrias - ITAPROQ (CONICET, UBA), Ciudad Universitaria, C1428BGA - Ciudad de Buenos Aires, Argentina.

El ácido ursodesoxicólico (UDCA) es un agente terapéutico utilizado inicialmente en la disolución de cálculos biliares. Actualmente se lo aplica al tratamiento de enfermedades colestásicas crónicas, produciendo una mejora en los parámetros bioquímicos, síntomas clínicos, principalmente el prurito, y la remisión a largo plazo de los síndromes colestásicos y, en algunos de ellos, representa la terapia de puente para el trasplante. Químicamente, el UDCA es un ácido biliar. Los ácidos biliares (AB) son compuestos esteroides, derivados hidroxilados del ácido 5 β -colan-24-oico, sintetizados en el hígado. Las formulaciones comerciales de UDCA se encuentran disponibles en comprimidos y cápsulas con concentraciones de UDCA las cuales no son aptas para pacientes pediátricos. En la actualidad las formas farmacéuticas sólidas convencionales son prescriptas para niños desde los 6 años en adelante debido a problemas en la deglución, en la dosificación, así como también el riesgo de asfixia. Debido a esto, el objetivo de este trabajo consistió en el desarrollo y caracterización de películas comestibles buco-dispersables u orodispersables (PODs), las cuales consisten en una película delgada que, cuando simplemente se la coloca en la cavidad oral del paciente, se humecta inmediatamente con la saliva, se desintegra rápidamente y se disuelve para liberar el medicamento.

Se desarrollaron PODs a dos concentraciones diferentes de UDCA, 25 mg/ml y 50 mg/ml, mediante la técnica de casting seleccionando adecuadamente el polímero, plastificante, conservante y aromatizante para la obtención de películas flexibles. Se realizaron tres lotes de películas por concentración, se distribuyeron en desecadores protegidos de la luz y se almacenaron a 25°C al vacío sobre soluciones saturadas de MgCl₂ de actividad de agua conocida (a_w°) para mantener una humedad relativa constante del 33,3% para el equilibrio de la película. Por otro lado, las películas fueron caracterizadas determinando el pH de las soluciones formadoras de películas, las coordenadas del color de la película en el espacio CIELab (colorímetro Minolta CM-508d, Japón), esto es, la luminosidad L^* (0% negro - 100% blanco), a^* ($-a^*$ verde y $+a^*$ rojo) y b^* ($-b^*$ azul y $+b^*$ amarillo). El contenido y uniformidad de dosis de UDCA presente en la matriz polimérica se determinó mediante técnicas de HPLC-UV y se realizó un control microbiológico.

Las películas desarrolladas resultaron ser visualmente translúcidas y blanquecinas-tenuemente amarillentas ($a^* = -1.0 \pm 0.0$; $b^* = +14 \pm 1$; $L^* = 87 \pm 1\%$). El contenido inicial de UDCA en las películas de 25 mg y de 50 mg fue de 24,6 mg de UDCA por película con una eficiencia de carga del 96,6% y de 49,6 mg de UDCA por película con eficiencia de carga del 97,3%, respectivamente. En cuanto al ensayo microbiológico, se observó ausencia de *E. coli* y < 10 UFC/película de aerobios totales, hongos y levaduras.

Se lograron desarrollar películas orodispersables a dos concentraciones diferentes de UDCA, las cuales resultaron flexibles, seguras, de aspecto homogéneo y con una adecuada eficiencia de carga para ambas concentraciones. Por lo expuesto, las películas de UDCA pueden ser potencialmente útiles para ser administradas a pacientes pediátricos.

Nanoformulaciones de quitosano para la protección y suministro de betanina presente en el extracto de remolacha

Ramón Silva Nieto¹, Cecilia Samaniego López^{2,3}, Marcela A. Moretton⁴, Diego A. Chiappetta⁴ Agustina Alaimo^{1,3}, Oscar E. Pérez^{1,3}

¹Departamento de Química Biológica, FCEN-UBA. ²Departamento de Química Orgánica, FCEN-UBA. ³Instituto IQUIBICEN-CONICET. ⁴Departamento de Tecnología Farmacéutica, FFyB-UBA.

Las remolachas *Beta vulgaris* contienen betalainas, las cuales son polifenoles con poderosa actividad antioxidantes y antiinflamatoria. Las betalainas se clasifican en dos grupos: betacianinas (coloración rojo-violeta), y betaxantinas (coloración amarillo-naranja). El extracto de remolacha se ha utilizado como pigmento en las industrias cosmética, farmacéutica y alimenticia. La *betanina* (BET) es un pigmento natural que se encuentra de manera abundante en extracto de remolacha y que posee propiedades beneficiosas para el organismo dada su gran capacidad antioxidante y anti-inflamatoria. Además, se destaca por ser soluble en agua y estable en el rango de pH 3-7. No obstante, es susceptible a la luz y a los cambios de temperatura, lo cual limita su uso en las industrias alimenticias y farmacéuticas. Los bioactivos, como la betanina, pueden ser preservados utilizando diversas técnicas de encapsulación, lo que contribuye a protegerlos del medio que los rodea hasta su liberación controlada. En este caso realizamos la encapsulación de BET con *quitosano* (QS). Este biopolímero se caracteriza por ser biocompatible, biodegradable, no tóxico, antimicrobiano, con solubilidad en múltiples medios y mucoadhesivo. En este trabajo, se empleó un QS de alto PM nacional obtenido a partir de la desacetilación de la quitina extraída del exoesqueleto del langostino *Pleoticus muellieri*. Se desarrollaron diferentes nanoformulaciones (NFs) de QS por entrecruzamiento con tripolifosfato de sodio (TPP) mediante la técnica de gelificación iónica. Cada una de las NFs fueron sometidas a un proceso de ultrasonido durante 10min (Cole-Parmer, 750W, 20KHz, A = 20%). Luego, a través del análisis por dispersión dinámica de la luz (DLS; Malvern Zetasizer) se determinó el tamaño medio de partículas presentes en las NFs cargadas con BET en función de la relación QS:TPP. Los valores fueron: NF-2:1 ($130.3 \pm 7.9\text{nm}^a$), NF-3:1 ($157,2 \pm 5.6\text{nm}^b$), NF-4:1 ($170.1 \pm 2.5\text{nm}^c$), NF-5:1 ($182.3 \pm 4.1\text{nm}^d$). Por su parte, la NF-3:1 *per se* presentaba un tamaño significativamente mayor a su equivalente con bioactivo encapsulado ($170.3 \pm 1.3\text{nm}^c$). Cabe destacar que todas las NFs presentaron un perfil de monodispersidad con Pdl bajos (NP: $0,16 \pm 0,03$; NP-BET: $0,22 \pm 0,02$; $p < 0,01$). Por otra parte, se determinó la eficiencia de encapsulación (%EE) de la BET de manera indirecta cuantificando su absorbancia ($\lambda = 536$, Jasco V-570 UV-Vis) en el sobrenadante de las NFs previamente centrifugadas (9000 rpm, 10min). Los %EE fueron: NF-2:1 (15 ± 9^a), NF-3:1 (40 ± 3^b), NF-4:1 (41 ± 4^b), NF-5:1 (42 ± 5^b). A partir de los datos obtenidos, se eligió trabajar con la NF-3:1 considerando que es la que permite maximizar el %EE al mismo tiempo que presenta el menor tamaño con respecto a las otras NFs. Así, se determinó que la NF-3:1 presentaba un potencial ζ de $+37,6 \pm 6,7$, el cual disminuyó significativamente en presencia de BET ($+28,1 \pm 5,2$; $p < 0,01$). El análisis de ultraestructura (TEM) permitió identificar partículas con formas esféricas. Como conclusión, las NFs desarrolladas por nuestro grupo serían óptimos sistemas de protección y suministro de este bioactivo.

Diferentes estrategias para el desarrollo de sensores impedimétricos no enzimáticos de glucosa

Ana Laura Rinaldi^{a*}, Santiago Sobral^a, M. Celina Bonetto^a, José Iván González Jorge^a, Romina Carballo^a

a Cátedra de Química Analítica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA / IQUIFIB, CONICET, Ciudad de Buenos Aires, Argentina, 1113

* e-mail: alrinaldi@ffyb.uba.ar

En los últimos años, el desarrollo de sensores no enzimáticos de glucosa ha sido de gran interés debido a que éstos presentan ventajas por sobre aquellos que emplean sistemas biológicos para el sensado tales como: versatilidad en el diseño de fases de reconocimiento, rapidez de respuesta, bajo costo y fácil miniaturización. Por otra parte, el uso de impedancia como método de transducción de la señal permite mejorar significativamente la sensibilidad de la detección. En el presente trabajo, se expone el desarrollo de nuevos sensores de glucosa para el control de la diabetes, basados en dos estrategias de medición (figura 1): por un lado, se trabajó en la inmovilización, sobre la superficie de electrodos de oro, de ácido fenilborónico, cuya interacción con la glucosa produce el bloqueo de la señal de una cupla redox externa (Estrategia de Bloqueo). Por otro lado, mediante la electrodeposición de nanopartículas de níquel sobre electrodos impresos de grafito, se desarrolló una metodología donde el principio de sensado se basa en la oxidación directa de la glucosa sobre la superficie del electrodo, catalizada por la cupla $\text{NiOOH}/\text{Ni}(\text{OH})_2$ (Estrategia Catalítica)¹. A partir de la **Estrategia de Bloqueo** se logró la cuantificación de glucosa considerando los valores de R_{ct} surgidos del ajuste del modelo ($y = 18,716 \Omega \cdot \text{mM}^{-1} x + 53,263 \text{ mM}$; $R^2 = 0,985$) para el rango de concentración de glucosa de 0 a 6,6 mM (0-130 mg/dL). Por su parte, la **Estrategia Catalítica** permitió la obtención de un sistema de sensado basado en el registro del valor de ZI a una frecuencia de 0,1 Hz, con una curva de calibración $y = 0,218 \Omega^{-1} \cdot \text{mM}^{-1} x + 0,292 \Omega^{-1}$ ($R^2 = 0,991$, rango 0-2 mM). Asimismo, la inclusión de nanopartículas de oro en la superficie del electrodo contribuyó con un aumento significativo en la sensibilidad. El sistema pudo además aplicarse a la cuantificación de glucosa en muestras de saliva artificial.

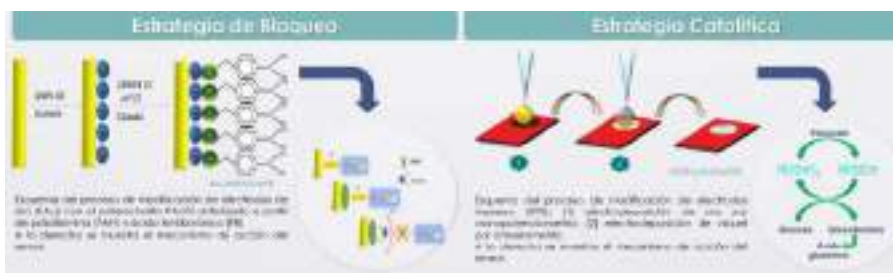


Figura 2. Prototipo sensor de glucosa

Figura 1. Esquema de estrategias de medición de glucosa

Los resultados demuestran que ambos sistemas son factibles de ser aplicados a la cuantificación de glucosa en el rango de concentraciones fisiológicas, sin empleo de enzimas y con elevada sensibilidad y selectividad y bajo costo (dispositivo prototipo actualmente en construcción, figura 2). De esta manera, el uso de la impedancia como técnica de transducción de la señal permitiría alcanzar el objetivo de desarrollar plataformas multidetección que lleven a la cuantificación de diferentes analitos, cada uno a su frecuencia óptima, sobre un mismo dispositivo².

¹Rinaldi AL, Rodríguez-Castellón E, Sobral S, Carballo R. Journal of Electroanalytical Chemistry 832 (2019) 209.

² Lin C, Ryder L, Probst D, Caplan M, Spano M, LaBelle J. Biosensors and Bioelectronics 89 (2017) 743.

Agradecimientos: A.L.R. agradece a CONICET por su beca doctoral. Los autores agradecen el subsidio UBACyT 2018-2020 20020170100155BA.

Diseño racional de agentes antiparasitarios dirigidos al camino de isoprenoides

Sergio Hernán Szajnman

Dpto. de Química Orgánica, FCEyN, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

shs@qo.fcen.uba.ar

Trypanosoma cruzi es el agente etiológico de la tripanosomiasis americana. El número de personas infectadas con *T. cruzi* disminuyó de 18 millones (1991) a 6 millones (2010), pero sigue siendo la enfermedad parasitaria más prevalente en las Américas. Por otro lado, *Toxoplasma gondii* es un parásito Apicomplexan oportunista responsable de la toxoplasmosis, que es capaz de infectar a humanos y animales de sangre caliente afectando a más de mil millones de personas en todo el mundo. La quimioterapia actual para la enfermedad de Chagas y la toxoplasmosis esta insatisfactoria y existe una necesidad crítica de desarrollar nuevos medicamentos seguros. Por ejemplo, la quimioterapia de la enfermedad de Chagas sigue siendo deficiente y se basa en dos drogas descubiertas empíricamente: nifurtimox (Lampit[®], Bayer-El Salvador) y benznidazol (Abarax[®], Elea-Argentina), que no están aprobados por la FDA en los Estados Unidos, donde solo están disponibles en los CDC bajo protocolos de investigación. Sin embargo, el benznidazol fue recientemente aprobado por la FDA, pero solo para uso pediátrico. Nuestro objetivo a largo plazo es encontrar medicamentos alternativos para el tratamiento de estas enfermedades parasitarias. Se ha informado que las enzimas del camino de isoprenoides son excelentes objetivos farmacológicos contra parásitos patógenos. Por ejemplo, los bifosfonatos tienen actividad contra el crecimiento de *T. cruzi* dirigida a la farnesil difosfato sintasa de *T. cruzi* (*TcFPPS*). La escualeno sintasa de *T. cruzi* (*TcSQS*) demostró ser un target interesante para el diseño de fármacos. Los selenocianatos de ariloxietilo son potentes inhibidores de la proliferación de *T. cruzi* dirigidos a *TcSQS*, actuando también en *T. gondii*. *T. gondii* no sintetiza colesterol y lo importa del huésped, lo que sugiere que los inhibidores del SQS del huésped podrían afectar potencialmente el crecimiento de *T. gondii*. Nuestra hipótesis es que la vía isoprenoide constituye un objetivo importante para el tratamiento de enfermedades parasitarias. Para probar esta hipótesis, nuestros objetivos específicos son: investigar el efecto de los bifosfonatos contra *TcFPPS* y *TgFPPS*, y contra las células de *T. cruzi* y *T. gondii*, y realizar estudios SAR para ayudar al diseño de fármacos; estudiar el efecto del ariloxietil selenocianatos contra *TcSQS*, y también contra *T. cruzi* y células de *T. gondii*.

Título: “ESTRATEGIAS DE TECNOLOGÍA ADITIVA PARA EL DESARROLLO DE PRODUCTOS MÉDICOS APLICABLES A DISTINTAS PROBLEMATICAS DEL SIGLO XXI”

Autores: Farm. Verónica Gerber - Dra. Viviana Mouriño

El empleo de tecnologías aditivas, particularmente el empleo de la impresión en tres dimensiones (3D), en el campo médico refleja el advenimiento de soluciones innovadoras a diferentes problemáticas que se han implementado globalmente desde los últimos 20 años. Ante las posibilidades que evidencia este avance tecnológico, se observa una vacancia del recurso en el país. Se colige, por lo tanto, necesario reconocer la importancia de la fiabilidad y seguridad de los procesos y materiales implementados en la fabricación 3D y en el funcionamiento adecuado de los productos resultantes.

Desde investigaciones recientes se ha indicado que en el 2019 la implementación de impresiones 3D en el campo médico de mayor recurrencia fue la de prótesis craneofaciales, seguida de prótesis. La producción tradicional de dispositivos médicos usualmente requiere de procesos costosos y de equipos de compleja utilización. La impresión 3D puede reducir el costo del producto final, el tiempo de fabricación y problemáticas de descarte de residuos con su consiguiente impacto ambiental entre otros factores de la producción. En consideración de las oportunidades de generar acceso a nuevos tratamientos, la impresión 3D puede permitir la fabricación de productos médicos o sus componentes para ser incorporados mediante evaluaciones de rigor.

Una posibilidad es diseñar y fabricar, mediante impresión 3D, posibles productos médicos o componentes de éstos, en particular un tapón para balón gástrico que pueda ser colocado en el extremo opuesto a la válvula y se degrade al alcanzar el período de 6 meses de colocado. Ante la mínima degradación del tapón, el balón se vaciaría espontáneamente. Luego se esperaría que pasara a través del píloro hacia los intestinos y se excrete naturalmente. De esta manera se evita tener que realizar una endoscopia o intervención quirúrgica para el retiro del balón utilizando los balones actualmente existentes en el mercado local. Estos ensayos podrían ser en un futuro actividades de transferencia tecnológica.

Otra opción es la de diseñar y desarrollar biomateriales, aplicables en la elaboración de andamios en tres dimensiones, los cuales tendrán un potencial empleo como apósitos multifuncionales para optimizar el proceso de cicatrización de heridas y que contengan activos terapéuticos con efectos antimicrobianos y angiogénicos.