

PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

PARTICIPACIÓN DE LA POLI(ADP-RIBOSA)GLICOHIDROLASA EN LAS VÍAS DE INVASIÓN CELULAR POR *TRYPANOSOMA CRUZI*

Maria Clara Chiatellino - LU:1077253

Licenciatura en Biotecnología.

Tutor:

**Dra. Salomé Catalina Vilchez Larrea
INGEBI -CONICET, CABA**

Co-Tutor Interno:

**Dra. María de los Milagros Cámara
Universidad Argentina de la Empresa (UADE), CABA**

Febrero 12, 2020



**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS**

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a Salo por acompañarme, enseñarme y guiarme en estos comienzos en la investigación científica con tanta paciencia, dedicación y pasión. A Silvia por recibirme tan bien y por haberme guiado y aconsejado en tantas oportunidades. A Ailu por ser mi gran compañera en este año y a todo el Lab 209 por la predisposición a ayudarme cada vez que lo necesité y por ser el laboratorio más divertido donde trabajar.

También agradecer a mis papás por apoyarme en cada decisión y motivarme a seguir y perseverar. Por acompañarme, pero también darme tanta libertad. Agradecer también a mi hermano por apoyarme (y aguantarme) en el día a día. Y a todo el resto de mi familia por acompañarme de distintas maneras.

A mis amigas de siempre por ser compañeras durante todo el proceso, por interesarse, por motivarme y aguantarme durante cada segundo que el mismo duró. Por compartir cada alegría y también cada momento donde las cosas se hicieron más difíciles. Porque todo fue más fácil sabiendo que estaban ahí. A Camor, Luz, Clara, Tini, Achu, Pocha, Cani, Pili, y a todas y cada una de este grupo tan grande y para toda la vida.

A mis amigos también, por esperarme tantas veces con un mate o una comida después de días eternos y cansadores, y hacerme reír con tanta facilidad.

A las amigas que la facultad me dió, Sofi y Mela, por ser fieles testigos y hacer que todo haya sido más fácil y divertido. Por las horas de estudio, por las entregas, las presentaciones y también por tanta risa. Porque son de lo mejor que me llevo de todo este proceso.

A mi director Fede Prada por seguir cada paso y brindarme tanta ayuda cuando lo necesité.

Resumen

El parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* es el agente causal de la enfermedad de Chagas, la cual representa uno de los principales problemas de salud pública en América Latina. El mismo posee un ciclo de vida complejo en el cual alterna entre un hospedador mamífero y un insecto vector. Al menos tres vías diferentes de invasión de las células de mamífero hospedadoras fueron descritas hasta la actualidad: la vía dependiente de lisosomas, la vía independiente de lisosomas y la vía autofágica. En el actual trabajo se evaluó la relación de la proteína Poli(ADP-ribosa)Glicohidrolasa (PARG) con estas distintas formas de ingreso del parásito a la célula hospedadora. PARG es la principal enzima que degrada o libera los polímeros de ADP-ribosa, que conforman una modificación post-traducciona de proteínas de vital importancia en una amplia variedad de procesos biológicos como el mantenimiento de la estabilidad genómica, reparación del ADN, regulación transcripcional y apoptosis. Se ha inferido en trabajos previos que la presencia y actividad de las enzimas responsables del metabolismo de ADP-ribosa de la célula hospedadora son importantes para la progresión normal del ciclo de infección de *T. cruzi* en diferentes líneas celulares. Por otro lado, en el actual trabajo se intentó evaluar la posible relación entre la vía de señalización de PI3k/Akt y PARG en nuestro modelo biológico, basándonos en recientes investigaciones que indican una conexión entre ambas en modelos oncológicos. Así, se logró concluir que PARG podría tener un rol importante en la vía dependiente de lisosomas, siendo necesaria dicha proteína para la correcta invasión del parásito a la célula a través de la formación y reclutamiento de lisosomas a la membrana. Sin embargo, PARG no parecería ser fundamental para la correcta infección por medio de las otras dos vías mencionadas. Por su parte, la vía de señalización PI3k/Akt demostró ser necesaria para una correcta invasión mediante la vía independiente de lisosomas. Estos resultados convierten a PARG en un posible blanco terapéutico interesante debido a su rol durante la infección por *T. cruzi*.

Abstract

The protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* is the causative agent of Chagas disease, which represents one of the main public health problems in Latin America. It has a complex life cycle, in which it alternates between a mammalian host and a vector insect. To achieve infection in host mammalian cells, at least three different invasion pathways were described to date: the lysosome-dependent pathway, the lysosome-independent pathway and the autophagic pathway. In the current study, the relationship of Poly(ADP-ribose)glycohydrolase (PARG) with these different forms of entry into the host cell was evaluated. PARG is the main catabolizing enzyme of ADP-ribose polymers, a post-translational modification of proteins implicated in a wide variety of biological processes such as maintenance of genomic stability, DNA repair, transcriptional regulation and apoptosis. It has been inferred from previous studies that the presence and activity of the enzymes responsible for ADP-ribose metabolism in the host cell are important for the normal progression of the *T. cruzi* infection cycle in different cell lines. On the other hand, in the current work we also tried to verify the possible relationship between the PI3k/Akt signaling pathway and PARG in our biological model, based on recent research that indicates a connection between both. Thus, it was concluded that PARG could have an important role in the lysosome-dependent pathway, being necessary for the correct invasion of the parasite to the cell through the formation and recruitment of lysosomes to the membrane. However, PARG does not seem to be essential for the correct infection through the other two pathways mentioned. On the other hand, the PI3k/Akt signaling pathway proved to be necessary for a correct invasion via the lysosome-independent pathway, but it does not appear to be related to PARG. These results make PARG a possible target due to its necessary role for a correct *T. cruzi* infection.

Abreviaturas

Akt: Proteína kinasa B

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol

EDTA: ácido etiléndiaminotetraacético

GFP: Green Fluorescent Protein

IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

pADPr: poli ADP-ribósidos

PARG: Poli(ADP-ribosa)Glicohidrolasa

PARP: Poli(ADP-ribosa)Polimerasa

PBS: buffer fosfato salino

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PI3k: fosfatidilinositol-3 kinasa

PIP3: fosfatidilinositol (3,4,5) -trisfosfato (PtdIns (3,4,5) P_3)

SDS: dodecilsulfato de sodio

SFB: Suero fetal bovino

TBST: Buffer Salino Tris- Tween

TcPV: Vacuola parasitófora

Tris: tris (hidroximetil) aminoetano

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

Contenidos

1	Introducción	9
1.1	Enfermedad de Chagas	10
1.2	<i>Trypanosoma cruzi</i> : ciclo de vida, invasión e infección	11
1.2.1	Vías de invasión celular utilizadas por <i>Trypanosoma cruzi</i>	13
1.2.2	Vía de invasión dependiente de lisosomas	15
1.2.3	Vía de invasión independiente de lisosomas	15
1.2.4	Vía de invasión autofágica.....	16
1.3	Vía de señalización PI3k/Akt.....	16
1.4	Metabolismo de polímeros de ADP-ribosa.....	17
2	Hipótesis y objetivos	19
2.1	Hipótesis	20
2.2	Objetivos	20
2.2.1	Objetivo General	20
2.2.2	Objetivos Específicos	20
3	Antecedentes	21
3.1	Metabolismo de ADP-ribosa en la célula hospedadora y rol de PARG en la infección por <i>T. cruzi</i>	22
3.2	Posible relación entre PARG y la vía PI3k/Akt.....	22
4	Metodología	24
	Metodología: Materiales y métodos.....	25
4.1	Materiales.....	25
4.1.1	Cultivos celulares: Células Vero	25
4.1.2	Cepa bacteriana	25
4.1.3	Infecciones y cepa utilizada de <i>T. cruzi</i>	25
4.1.4	Solución de lisis	25
4.1.5	Solución de hambreado (Earle´s saline solution):.....	26
4.2	Métodos: Técnicas generales	26
4.2.1	PCR.....	26
4.2.2	Digestiones.....	27
4.2.3	Ligaciones	27
4.2.4	Purificación del ADN plasmídico	28

4.2.5	Electroforesis en gel de agarosa.....	29
4.2.6	Purificación de ADN de los geles de agarosa.....	30
4.2.7	Transformación de <i>Escherichia coli</i> DH5 α F'.....	30
4.2.8	Transfecciones de células Vero.....	31
4.2.9	Cuantificación de células mediante la cámara de Neubauer.....	32
4.2.10	Congelamiento de células.....	33
4.2.11	Inhibición de la vía PI3k/Akt.....	33
4.2.12	Inhibición de PARG.....	33
4.2.13	Extracción de proteínas.....	34
4.2.14	Cuantificación de proteínas por Bradford.....	34
4.2.15	SDS-PAGE y Western Blot.....	34
4.2.16	Inmunofluorescencia.....	37
4.3	Métodos vía autofágica.....	38
4.3.1	Ensayo β -Galactosidasa.....	38
4.3.2	Ensayo de viabilidad Alamar Blue.....	39
4.4	Procesamiento de datos y estadística.....	40
5	Resultados y discusión.....	41
5.1	Vía independiente de lisosomas.....	42
5.1.1	Construcción de la sonda FYVE_eGFP o FYVE_HA para la evaluación del reclutamiento de vacuolas ricas en PIP3.....	42
5.1.2	Verificación de la expresión de FYVE_eGFP mediante Western Blot.....	53
5.1.3	Marcación con epítipo fluorescente para la verificación de la línea transfectada	54
5.1.4	Evaluación de la formación de vacuolas ricas en PIP3 en el modelo de infección utilizado	55
5.2	Silenciamiento de la expresión de PARG en células Vero.....	61
5.3	Vía dependiente de Lisosomas.....	62
5.3.1	Inmunofluorescencia células Vero silvestres vs células Vero silvestre + infección.....	62
5.3.2	Evaluación del reclutamiento de lisosomas a la periferia celular en distintas condiciones.....	63
5.4	Vía autofágica.....	67
5.4.1	Evaluación de los niveles de infección mediante ensayo β -Galactosidasa.....	67
5.4.2	Ensayo viabilidad (Alamar Blue).....	68

5.4.3	Detección de autofagosomas en células infectadas	69
6	Conclusiones	75
6.1	Vía independiente de lisosomas	76
6.2	Vía dependiente de lisosomas	77
6.3	Vía autofágica	78
6.4	Conclusión final	80
7	Bibliografía	82

1 INTRODUCCIÓN

Introducción

1.1 Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas es una antropozoonosis causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*, que afecta entre 6 y 8 millones de personas en todo el mundo y causa aproximadamente 50.000 muertes por año. Otros 65–100 millones de personas viven en áreas con riesgo de infección. A pesar de haber pasado más de un siglo desde su descubrimiento, la enfermedad de Chagas sigue siendo uno de los principales problemas de salud pública para la mayoría de los países latinoamericanos. En las últimas décadas, la enfermedad de Chagas también ha sido una preocupación para zonas no endémicas como Canadá, EE.UU, Europa, Australia y Japón, debido a la constante migración de individuos desde áreas endémicas. En esta situación, la transmisión ocurre principalmente a través de transfusiones de sangre, trasplante de órganos o transmisión vertical de madre a hijo (Lidani *et al.*, 2019).

La enfermedad de Chagas es una enfermedad asociada a la extrema pobreza. *T. cruzi* es transmitido por un insecto vector de la familia de los triatomíneos, llamado popularmente vinchuca, chinche picuda o barbeiro, según la zona geográfica. Este insecto vive en las grietas de paredes y techos de las viviendas construidas con ladrillos de adobe, ramas o paja, es decir, las viviendas más precarias (Médicos sin fronteras, 2019).

El hombre se encuentra dentro de los hospedadores mamíferos de *T. cruzi*. Generalmente, la infección ocurre durante la noche a través del contacto con las heces de triatomíneos chupadores de sangre. A menudo, los insectos defecan en el huésped mientras se alimentan y las gotitas fecales infectadas pueden pasar inadvertidamente a la mucosa de los ojos, la nariz o la boca. La probabilidad de infección humana a través del contacto con un triatomíneo infectado es de aproximadamente uno de cada mil. Otro mecanismo de transmisión, responsable de aproximadamente el 10% de los casos, es la transfusión de sangre completa o derivados de la sangre que provienen de un paciente infectado (excepto los productos liofilizados). El riesgo de contraer la infección después de recibir una transfusión de sangre de un donante infectado es de aproximadamente el 20%. Esta es la principal vía de transmisión en las zonas urbanas. La tercera vía de transmisión más importante es la congénita, con aproximadamente 5.000-18.000

casos por año. La probabilidad de transmisión congénita en niños de madres infectadas varía de menos del 1% al 10% (Prata, 2001).

A pesar de los esfuerzos realizados durante décadas, la falta de éxito en la erradicación de esta enfermedad está relacionada con varios factores. Por un lado, como se mencionó anteriormente, la transmisión y persistencia de la infección está relacionada con condiciones socio-económicas de pobreza que no han sido abordadas en profundidad en la región. Aunque en los últimos 30 años se ha avanzado mucho gracias al control vectorial en los países endémicos, existe una gran brecha en la disponibilidad y acceso al diagnóstico y tratamiento: se cree que más de 95% de los infectados desconocen su estado y, por ende, tampoco han recibido tratamiento (Médicos sin fronteras, 2019).

Por otro lado, tanto la biología del parásito como las bases de la patogenia de la enfermedad no han podido ser comprendidas en su profundidad (Organización Mundial de la Salud, 2019).

Por último, si bien la enfermedad puede tratarse con Benznidazol o Nifurtimox, ambos medicamentos tienen una eficacia cercana al 100% solo si se administran al comienzo de la infección en la etapa aguda, pero la misma disminuye a medida que transcurre más tiempo desde el inicio de la infección. Ambos medicamentos, además, conllevan a efectos secundarios severos (Organización Mundial de la Salud, 2019).

Teniendo estas razones en cuenta, se están buscando constantemente nuevas vías de ataque para generar terapias o drogas contra el parásito y el avance de la enfermedad. Entre ellas, recientes investigaciones enfocaron interés en la ADP-ribosilación de proteínas (Vilchez Larrea *et al.*, 2012), una modificación post-traducciona que ocurre en células eucariotas, y su relación con el parásito durante la invasión celular. El presente estudio ahonda en la investigación de estos conceptos para poder, eventualmente, encontrar nuevos tratamientos eficaces contra la enfermedad de Chagas.

1.2 *Trypanosoma cruzi*: ciclo de vida, invasión e infección

Trypanosoma cruzi posee un ciclo de vida complejo, el cual comienza con insectos de la familia Reduviidae (como la vinchuca) que se alimentan de la sangre de vertebrados en la que se encuentran los tripomastigotes, las formas infectivas de *T. cruzi*, que circulan en el torrente

sanguíneo (Figura 1). Una vez ingeridos, la mayoría de los tripomastigotes se lisan en el estómago del insecto y los tripomastigotes sobrevivientes se transforman, en pocos días, en el estadio de epimastigote. Estos epimastigotes migran al intestino, donde se dividen activamente. Luego, en las regiones posteriores del intestino y en el recto, muchos epimastigotes se desprenden de la superficie intestinal y se transforman en tripomastigotes metacíclicos (otra forma infectiva de *T. cruzi*) que luego se liberan junto con heces y orina del insecto vector. Por lo general, la nueva infección de mamíferos se lleva a cabo mediante la inoculación directa de estos tripomastigotes a través de la mucosa ocular o la piel lesionada debido a la picadura del insecto (De Souza, De Carvalho and Barrias, 2010).

Una vez en el huésped vertebrado, los tripomastigotes metacíclicos invaden las células en el sitio de inoculación (p. ej., fibroblastos, macrófagos y células epiteliales) a través del reconocimiento entre parásitos y células del huésped vertebrado, en un proceso que involucra una gran variedad de moléculas presentes en ambas células. Es ahí donde comienza el ciclo de vida intracelular de *Trypanosoma cruzi*. Este ciclo implica varios pasos como la formación de una vacuola endocítica que alberga al tripomastigote al comienzo de la infección, conocida como la vacuola parasitófora (TcPV). Luego de la diferenciación de la forma tripomastigote, larga y delgada, a una forma redondeada con un flagelo corto, llamada amastigote, esta última es liberada al citoplasma de la célula hospedadora tras la lisis de la membrana de la TcPV llevada a cabo por enzimas secretadas por el parásito (De Souza, De Carvalho and Barrias, 2010). Los amastigotes se replican dentro de las células hospedadoras de vertebrados y después de varios ciclos de replicación, las células se lisan y los parásitos se liberan en la sangre como tripomastigotes sanguíneos, que infectarán nuevas células o serán ingeridos por el vector triatomino (Figura 1) y así se completa el ciclo (Goldenberg and Ávila, 2011).

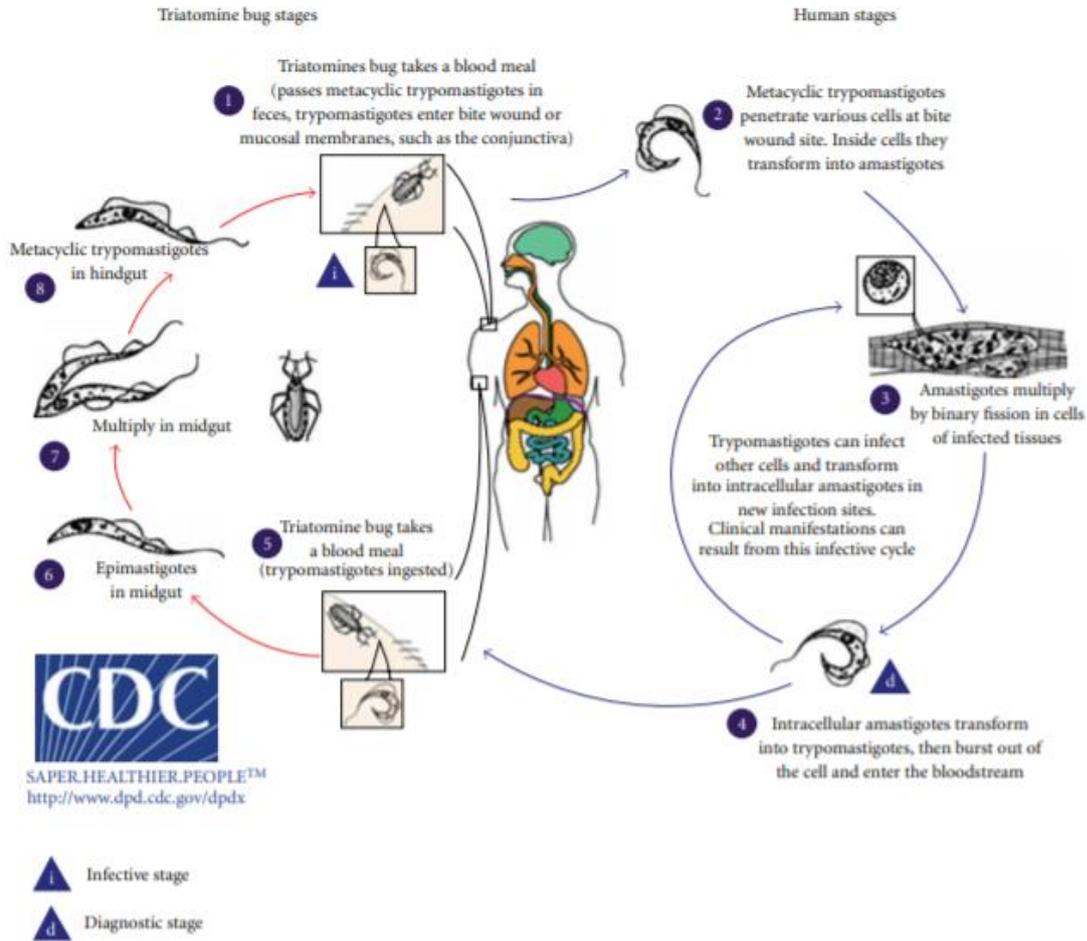


Figura 1: Ciclo de vida de *T. cruzi*,: formas variantes del parásito en los hospedadores tanto vertebrados como invertebrados (De Souza, De Carvalho and Barrias, 2010).

1.2.1 Vías de invasión celular utilizadas por *Trypanosoma cruzi*

Las vías que utiliza *T. cruzi* para invadir a la célula eucariota fueron estudiadas exhaustivamente durante mucho tiempo. Es interesante mencionar que *T. cruzi* puede ingresar a los macrófagos ya sea por un mecanismo fagocítico o no fagocítico, mientras que células no fagocíticas, como fibroblastos o células epiteliales, son infectadas solo por el último mecanismo (Romano *et al.*, 2012). Haciendo foco en las células no fagocíticas, se sabe que *T. cruzi* tiene dos métodos principales de invasión o entrada a ellas: una vía dependiente de lisosomas y una vía independiente de lisosomas (Figura 2).

La vía dependiente de lisosomas es iniciada por la exocitosis de lisosomas mediada por Ca^{2+} , los cuales se fusionan a la vacuola parasitófora en la vecindad de la membrana plasmática. En la vía independiente de lisosomas, en cambio, los parásitos entran a las células mediante la

invaginación de la membrana plasmática que acumula PIP3 (producto de la activación de la vía PI3k). Posteriormente, los parásitos internalizados son contenidos en vacuolas formadas a partir de esta membrana que maduran con la adquisición de marcadores de endosomas tempranos y, luego, con marcadores lisosomales.

Inicialmente, también se había propuesto la existencia de una vía de internalización dependiente de actina, en la que los tripomastigotes penetran a la célula hospedadora a través de una extensión de la membrana plasmática que finaliza en la formación de una vacuola parasitófora (Figura 2). Tanto endosomas tempranos como lisosomas pueden fusionarse a dicha vacuola (De Souza, De Carvalho and Barrias, 2010). Sin embargo, más recientemente se ha descrito que la remodelación del citoesqueleto de actina no es importante en la internalización de tripomastigotes, los cuales pueden penetrar a la célula ya sea de manera dependiente o independiente a los filamentos de actina, aunque si tiene un rol importante en la internalización de amastigotes (Fonseca Rosestolato *et al.*, 2002).

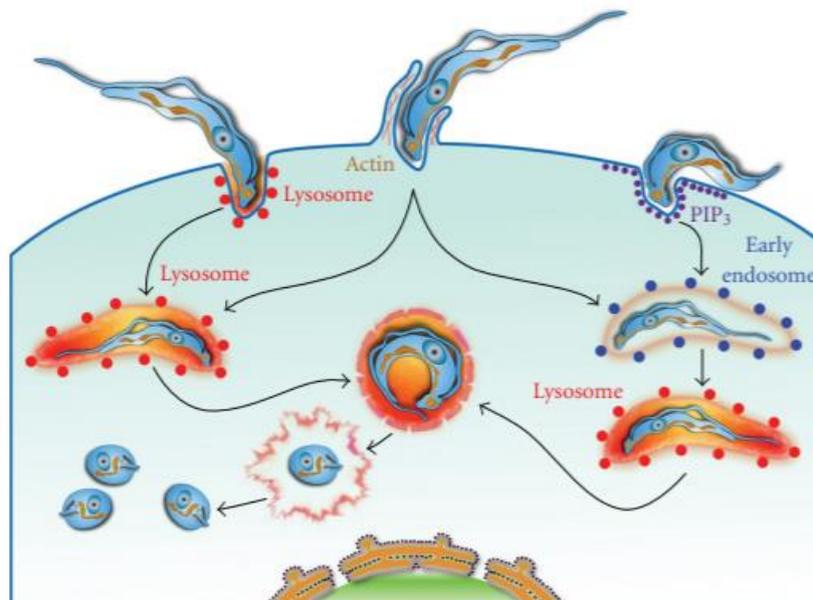


Figura 2: Modelo de invasión de *T. cruzi*: El modelo indica las dos principales vías mediante las cuales *T. cruzi* es capaz de entrar a la célula hospedadora: vía dependiente de lisosomas (sobre la izquierda) y la vía independiente de lisosomas (sobre la derecha). La vía dependiente de actina (centro) presenta mayor relevancia en la internalización de amastigotes.

En los últimos años, estudios demostraron que existe un posible tercer mecanismo de invasión, que relaciona al parásito con la vía autofágica de la célula hospedadora. Este modelo propone que *T. cruzi* explota una vía autofágica previamente inducida para colonizar eficientemente el célula hospedadora (Romano *et al.*, 2012).

1.2.2 Vía de invasión dependiente de lisosomas

La invasión dependiente de lisosomas ocurre por reclutamiento directo y fusión de lisosomas en la membrana plasmática, o por invaginación de la membrana plasmática seguida de la fusión intracelular con lisosomas. La vacuola parasitófora es de tipo lisosomal y al lisarse libera los parásitos para su replicación en el citosol (Andrade and Andrews, 2004).

Este mecanismo de internalización del parásito implica la exocitosis dirigida de los lisosomas de la célula hospedadora en el sitio de unión del parásito. En respuesta a las señales provocadas por *T. cruzi*, los lisosomas se reclutan a la membrana plasmática a lo largo de los microtúbulos de manera dependiente de kinesina, donde se someten a una fusión dependiente de Ca^{2+} para establecer la TcPV (Woolsey *et al.*, 2003).

El ambiente ácido de los lisosomas facilita el escape de los parásitos de la vacuola y su ingreso al citosol del huésped, un paso crítico en el desarrollo de *T. cruzi*. Además, la fusión temprana de lisosomas con parásitos invasores o recientemente internalizados es importante para la retención celular de parásitos. La presencia de un pH ácido favorece la expresión y actividad de Tc-Tox, una toxina perteneciente a *T. cruzi* formadora de poros, que permite el escape al citosol después de la ruptura de la membrana de la TcPV (Romano *et al.*, 2012).

1.2.3 Vía de invasión independiente de lisosomas

Este mecanismo de entrada implica la invaginación de la membrana plasmática de la célula hospedadora inducida por la presencia de parásitos, dando lugar a la formación de una vacuola derivada de la membrana plasmática, inicialmente desprovista de marcadores lisosomales. Se demostró que una fracción significativa (50% o más) de tripomastigotes explotan esta vía de entrada. Las vacuolas que contienen a *Trypanosoma cruzi* resultantes de esta vía están enriquecidas en los productos lipídicos de las PI 3-quinasas de clase I, PtdInsP3 / PtdIns (3,4) P2 y presentan a la proteína EEA1 (Antígeno Endosómico Temprano 1) como marcador característico. Luego son sometidas a un proceso de maduración en el que se produce la adquisición gradual de marcadores endosomales y/o lisosomales (Woolsey and Burleigh,

2004). Entre estos marcadores se encuentran la proteína de membrana asociada al lisosoma 1 (LAMP-1) y el marcador endosomal Rab5 (Woolsey et al., 2003).

1.2.4 Vía de invasión autofágica

Una vía novedosa de internalización del parásito en la célula eucariota se basa en la relación entre *T. cruzi* y la vía autofágica de la célula hospedadora: la vacuola parasitófora que contiene *T. cruzi* se puede encontrar decorada por la proteína autofágica LC3 de la célula hospedadora (Romano *et al.*, 2009). Este modelo propone que, bajo la inducción autofágica, las células hospedadoras producen un nuevo conjunto de vesículas autolisosomales disponibles para migrar a la superficie celular y proteger a los parásitos después de la fusión con la membrana plasmática. La proteína LC3 se recluta en la superficie citoplasmática en los sitios de invasión de *T. cruzi*, que conducen a la formación de vacuolas parasitóforas. El tripomastigote reside temporalmente en una vacuola con características autofagolisosomales antes de escapar a citosol (Romano *et al.*, 2012).

1.3 Vía de señalización PI3k/Akt

La fosfoinositol 3-quinasa (PI3k) es el principal componente de señalización río abajo del receptor del factor de crecimiento tirosina quinasas (RTK). PI3k cataliza la producción del segundo mensajero lipídico fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) en la membrana celular. PIP3, a su vez, contribuye al reclutamiento y activación de una amplia gama de proteínas, incluida la serina-treonina proteína quinasa Akt (también conocida como proteína quinasa B). La vía de señalización PI3k-Akt regula muchos procesos celulares fisiológicos, incluida la proliferación celular, la supervivencia, el crecimiento y la motilidad (Luo, Manning and Cantley, 2003).

Las moléculas presentes en la membrana plasmática de tripomastigotes desencadenan señales de activación de PI3k y PKB/Akt en la célula hospedadora. Estas señales están asociadas con la capacidad infectiva del parásito, ya que extractos de membranas de epimastigotes no son capaces de inducir este efecto. Además, la activación de la vía PI3k y PKB/Akt de la célula hospedadora es un requisito para una infección exitosa por *T. cruzi*, ya que la invasión de parásitos se reduce fuertemente cuando esta vía es bloqueada por inhibidores selectivos o células mutantes en las que la vía está inactiva. Además, la participación de un tipo

de PI3k de *T. cruzi* en la invasión de la célula hospedadora indica que están involucradas vías comunes entre el parásito y la célula hospedadora (Wilkowsky *et al.*, 2001).

1.4 Metabolismo de polímeros de ADP-ribosa

La poli(ADP-ribosil)ación es una modificación post-traducciona de proteínas en células eucariotas catalizadas por una familia de NAD⁺ ADP-ribosil transferasas, las poli (ADP-ribosa)polimerasas (PARP). Los genes codificantes para PARPs constituyen una superfamilia de al menos 18 miembros. Todas ellas comparten un dominio catalítico homólogo al dominio catalítico del miembro de proteínas PARP fundador, PARP-1. El metabolismo de poli ADP-ribósidos (pADPr) es de importancia central en una amplia variedad de procesos biológicos, incluido el mantenimiento de la estabilidad genómica, reparación del ADN, regulación transcripcional, función de centrómero, modulación de la longitud de los telómeros, regulación del proteasoma, degradación de proteínas y apoptosis, entre otros (Diefenbach and Bürkle, 2005).

Como una modificación reversible de muchas proteínas nucleares, la poli(ADP-ribosil)ación está regulada por un delicado equilibrio de síntesis y degradación. La poli-ADP-ribosilación es un proceso dinámico: PARP sintetiza pADPr, mientras que la Poli (ADP-ribosa) glicohidrolasa (PARG) representa la actividad principal de hidrolisis de pADPr en la célula, generando oligómeros y unidades de ADPr libres como producto. Así, la actividad de PARG revierte la acción de las enzimas PARP y regresa las proteínas a su estado nativo (Vilchez Larrea *et al.*, 2013) (Figura 3).

PARG, por su parte, posee varias funciones celulares y fisiológicas importantes en eucariotas superiores, particularmente durante la señalización o las respuestas al estrés. En condiciones de estrés celular, PARP-1 se activa, modifica las proteínas diana en las vías de respuesta al estrés. Sin embargo, con la activación continua frente a un estímulo mayor, puede promover la muerte celular. La actividad catalítica de PARG puede contribuir a la muerte celular durante la hiperactivación de PARP-1 de dos maneras: degradando rápidamente polímeros pADPr sintetizados por PARP-1, contribuyendo así al agotamiento de NAD⁺ y, en última instancia, de ATP, en un proceso de muerte celular necrótica; y por otro lado, mediante la endoglicohidrólisis de cadenas pADPr y la posterior exportación de los mismos a las mitocondrias, donde son necesarios y suficientes para promover una muerte celular mediada

por factor inductor de apoptosis (AIF). PARG también es importante para la respuesta al daño del ADN: es rápidamente reclutada a sitios de daño de ADN, y trabaja junto con PARP-1 para garantizar la rotación del polímero, así como el reclutamiento y la liberación de factores en sitios de daño en el ADN (Gibson and Kraus, 2012).

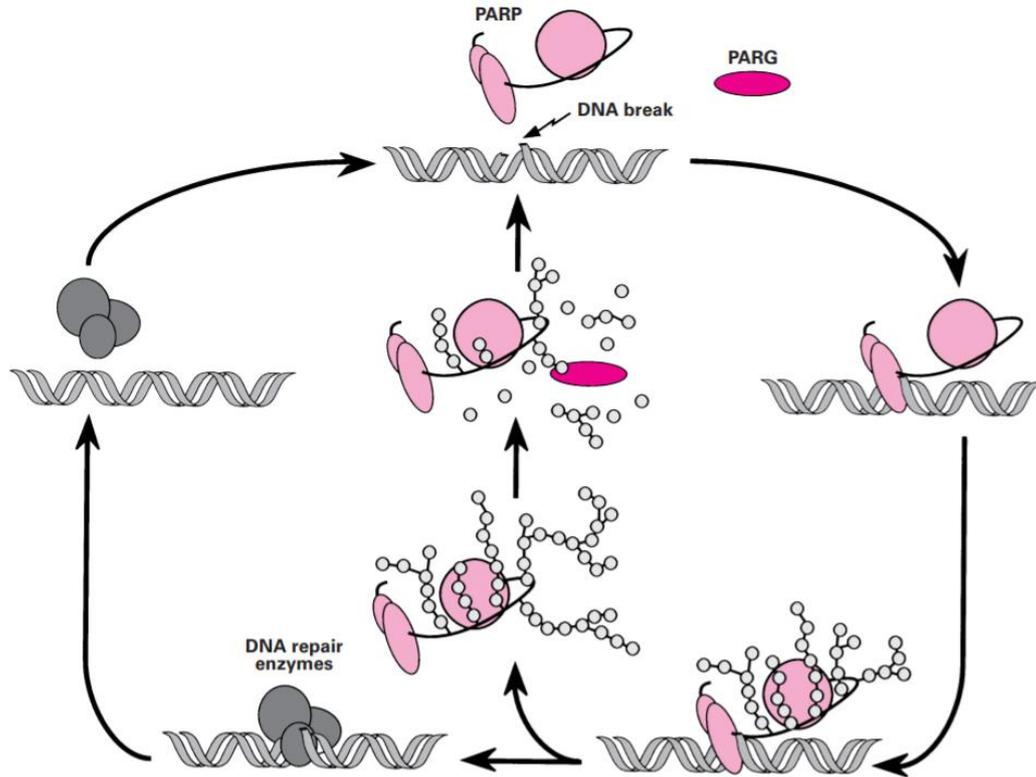


Figura 3: Modelo de síntesis y degradación de polímeros de ADP-ribosa frente al daño genómico (D'Amours et al., 1999)

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

La proteína Poli(ADP-Ribosa)Glicohidrolasa (PARG) cumple un rol fundamental en la correcta infección de la célula hospedadora por *Trypanosoma cruzi*, activando la vía de señalización de PI3k/Akt y regulando de manera indirecta las distintas vías de invasión no fagocíticas que utiliza el parásito.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo General

El objetivo general de este trabajo es caracterizar el rol y la importancia de PARG durante esta infección parasitaria y elucidar su posible relación con la vía de señalización PI3k (fosfatidilinositol-3 kinasa)/Akt (Protein kinasa B) de la célula hospedadora, especialmente en las primeras etapas del proceso infeccioso.

2.2.2 Objetivos Específicos

Determinar si la actividad de PARG participa en la modulación de la invasión del parásito por las vías dependiente de lisosomas, independiente de lisosomas y/o autofágica.

3 ANTECEDENTES

3.1 Metabolismo de ADP-ribosa en la célula hospedadora y rol de PARG en la infección por *T. cruzi*

En estudios previos se pudo inferir que la presencia y actividad de las enzimas responsables del metabolismo de ADP-ribosa de la célula hospedadora son importantes para la progresión normal del ciclo de infección en diferentes líneas celulares. Los resultados observados indicaron que la presencia de inhibidores de PARP podría afectar al menos a alguno de los procesos requeridos para un ciclo infeccioso exitoso (Vilchez Larrea *et al.*, 2012).

La ausencia de la enzima PARG lograda mediante un ARN de interferencia (ARNi) en células A549 demostró una reducción drástica en el porcentaje de células infectadas y el número de amastigotes por célula cuando se los comparo con el control de un cultivo de células A549 silvestre infectadas. De todas formas, una cantidad significativa de tripomastigotes pudo ser detectada en el sobrenadante de esos cultivos.

En las células hospedadoras Vero en las que PARG había sido inhibido químicamente, no solo se encontró una reducción significativa en el porcentaje de células infectadas y en el número de amastigotes por célula, sino también una ausencia casi total de tripomastigotes en el sobrenadante del cultivo, llevando a una inhibición casi completa del proceso de infección.

Estos resultados demostraron que la ausencia o la inhibición de PARG podría conferir protección frente a la invasión por *T. cruzi*. (Vilchez Larrea *et al.*, 2013).

3.2 Posible relación entre PARG y la vía PI3k/Akt

En recientes estudios se ha relacionado la presencia de PARG con la regulación de la vía PI3k/Akt en modelos oncológicos. La vía de señalización mencionada es responsable de numerosos procesos biológicos como así también participa en la regulación de varios factores de transcripción como el factor nuclear Kappa-B (NFκ-B). Al silenciar la expresión de PARG, los niveles de expresión de NFκ-B disminuyen a través de la regulación positiva de la fosforilación de Akt. La inhibición del crecimiento de la línea celular Lovo de cáncer de colon humano cuando PARG era silenciada y la relación de dicha proteína con la vía PI3k/Akt y NFκ-B fue demostrada. El silenciamiento de PARG, entonces, conduciría a un aumento de la fosforilación de Akt, disminuyendo la activación de la vía de expresión regulada por NFκ-B.

La inhibición de PI3k anula este fenómeno, indicando que PARG funcionaría como un regulador río arriba de esta vía (Fauzee *et al.*, 2012).

4 METODOLOGÍA

Metodología: Materiales y métodos

4.1 Materiales

4.1.1 Cultivos celulares: Células Vero

Se utilizaron células eucariotas epiteliales Vero ATCC® CCL-81™, provenientes de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Es un linaje de células continuo, aneuploide y de crecimiento adherente. Se cultivaron a 37 °C en atmósfera de 5% de CO₂. Fueron mantenidas en botellas de 5 ml con medio MEM (medio comercial adquirido en Gibco) que a su vez contiene 10% de SFB, 2 mM L-glutamina y antibióticos (1% penicilina-estreptomicina). Se utilizó tripsina 0.05% - EDTA 0.5 mM para realizar los repiques de las células. Para ensayos de inmunofluorescencia y de actividad β-galactosidasa, se cultivaron en placas multiwell de acuerdo con el objetivo del mismo (placas de 24 y 96 pocillos).

4.1.2 Cepa bacteriana

Se utilizó la cepa *Escherichia coli* DH5αF': F'/endA1 hdr17 (rk- mk+) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 (Nalr) relA1 Δ(lacZYA-argF)U169 (m80lacZΔM15), para la amplificación y posterior purificación de los insertos y vectores utilizados

4.1.3 Infecciones y cepa utilizada de *T. cruzi*

Para realizar todos los ensayos de infección se utilizó una línea transgénica tripomastigotes de la cepa Tulahuen, que expresa el gen de β-Galactosidasa de *E. coli* (Buckner *et al.*, 1996). Todos los cultivos de células infectadas fueron llevados a cabo con medio MEM conteniendo 3% de SFB, 2 mM L-glutamina y antibióticos (1% penicilina-estreptomicina).

4.1.4 Solución de lisis

Para la obtención de extractos proteicos de células Vero se utilizó el siguiente buffer de lisis:

Tris HCl pH 7.5	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
EGTA	1 mM
NP-40	1%

KH ₂ PO ₄	2,5 mM
PMSF	1 mM
Pepstatina A	100 uM
NaVO ₃	1 mM

4.1.5 Solución de hambreado (Earle´s saline solution):

Se preparó una solución salina casera basándose en la solución comercial Earle´s para realizar el hambreado de las células:

KCl	0,04 gr
NaCl	0,68 gr
NaH ₂ PO ₄ (H ₂ O)	0,0122 gr
D-glucosa	0,1 gr
MgSO ₄ 7 H ₂ O	0,009767 gr
CaCl ₂ 2 H ₂ O	0,0265 gr
NaHCO ₃	0,22 gr

4.2 Métodos: Técnicas generales

4.2.1 PCR

Los componentes para la realización de la PCR estándar fueron (*Master Mix*):

- Buffer Thermo Pol 1X
- TAQ polimerasa (New England BioLabs) (1 unidad por reacción)
- dNTPs (250 µM final)
- ADN molde (entre 100 ng y 500 ng)
- *Primers* (entre 0,6 y 1 µM final)
- H₂O

4.2.1.1 Colony PCR

Para chequear si las bacterias transformadas poseían el inserto de interés, se realizó la técnica de *Colony PCR*. Similar a la PCR estándar, para esta técnica se preparó la *Master Mix*

con los mismos componentes detallados en el punto 4.1.2, con la diferencia de que el ADN molde fue reemplazado por una porción de la colonia bacteriana que se deseaba verificar. Para verificar la ligación al vector comercial pGEM-T easy se utilizaron los *primers* universales T7 Promoter y M13 Reverse, cuya secuencia complementaria se encuentra presente en el esqueleto del vector. Para la verificación de la ligación al vector pcDNATM3.1(+), en cambio, se utilizaron los *primers* específicos diseñados.

4.2.2 Digestiones

Los componentes de cada digestión fueron los siguientes, variando en cada caso los volúmenes a utilizar de acuerdo con el ensayo:

- Plásmido
- Buffer FlyCut 1X
- Enzima/s (10-20 unidades por reacción)
- H₂O

Las digestiones se realizaron a las temperaturas correspondientes según cada enzima, durante 1- 2 horas.

4.2.3 Ligaciones

Se realizaron dos tipos de ligaciones: por un lado, los fragmentos obtenidos por PCR se ligaron directamente al vector comercial pGEM-T easy siguiendo las recomendaciones del fabricante, mientras que el subclonado de los fragmentos de interés en el vector pcDNATM3.1(+) se realizó siguiendo otro protocolo de ligación distinto.

4.2.3.1 Ligación pGEM- T easy

Para las ligaciones de los fragmentos de PCR con el vector comercial pGEM-T easy se mezclaron los siguientes componentes y se incubó a 4°C toda la noche:

- Buffer 1X rapid ligation
- Vector comercial pGEM®-T Easy Vector (Figura 4)
- T4 ligasa (0,5 U/μl finales)
- Inserto de interés (entre 0,5 y 1 μl de la reacción de PCR)
- H₂O

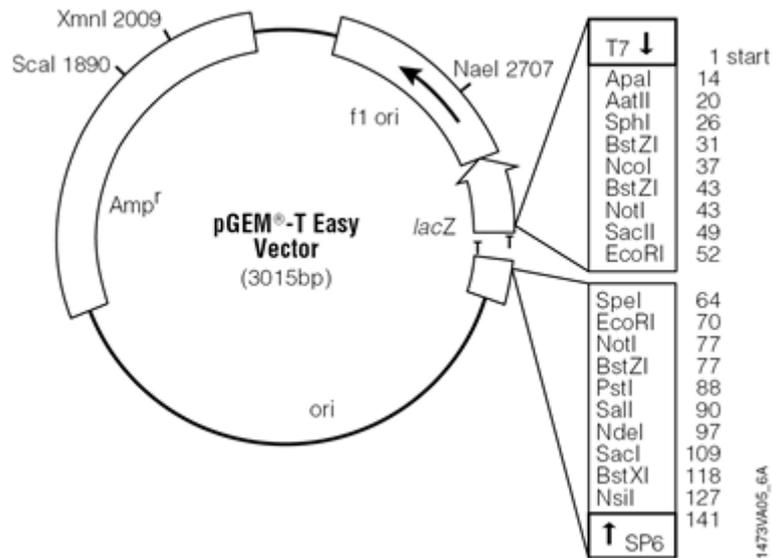


Figura 4: Representación del vector pGEM-T Easy (Promega)

4.2.3.2 Ligación pcDNA 3.1

Para las ligaciones del inserto de interés con el vector comercial pcDNATM3.1(+) (*Addgene*), se ensayaron dos relaciones inserto/vector: 1:1 y 3:1. Se utilizó la siguiente fórmula para poder calcular las cantidades necesarias:

$$\frac{ng \text{ vector}}{\text{tamaño vector (pb)}} \times R \text{ (factor de relacion)} = \frac{ng \text{ inserto}}{\text{tamaño inserto (pb)}}$$

Una vez calculados los nanogramos necesarios de inserto, considerando la concentración de ADN medida por NanoDrop, se realizó la ligación de la siguiente manera:

- Buffer 1X Rapid ligation
- T4 ligasa (0,5 u/μl finales)
- Vector comercial pcDNATM3.1(+) (50 ng totales)
- Inserto
- H₂O

Las ligaciones se realizaron a 4 °C durante una noche.

4.2.4 Purificación del ADN plasmídico

Las purificaciones de ADN fueron realizadas mediante la técnica de Miniprep, siguiendo el protocolo a continuación:

- 1) Inocular 3-5 ml de medio de cultivo bacteriano (LB) e incubar 16-20 h a 37°C con agitación.
- 2) Centrifugar a 5.000 rpm, durante 5 minutos. Descartar sobrenadante
- 3) Agregar 100 µl de Solución 1 (Tris-HCl 25 mM pH 8, glucosa 50 mM y EDTA 10 mM) y resuspender el pellet bacteriano utilizando el vortex.
- 4) Preparar la Solución 2 (NaOH 0,2 M y SDS 1%) fresca. Agregar al sobrenadante 200 µl de dicha solución.
- 5) Agregar 150 µl de Solución 3 (Acetato de Potasio 3M). Mezclar por inversión el tubo 6-8 veces.
- 6) Incubar 3 minutos
- 7) Centrifugar a 12.000 rpm, durante 10 minutos. Trasvasar el sobrenadante a un tubo de 1,5 ml limpio
- 8) Agregar 0,02 mg/ml de RNAsa
- 9) Dejar en la estufa de 37°C durante 1h 30 min
- 10) Remover las proteínas y RNAsa con 1 volumen de cloroformo 24:1 isoamílico. Mezclar por inversión.
- 11) Centrifugar a 5.000 rpm, durante 5 minutos.
- 12) Trasvasar la fase superior a un nuevo tubo y repetir el lavado.
- 13) Agregar 1 volumen de Isopropanol
- 14) Centrifugar a 4°C durante 30 minutos
- 15) Descartar el sobrenadante.
- 16) Agregar 250 µl de Etanol 70%
- 17) Centrifugar en frío (4°C) durante 10 minutos a 13.000 rpm
- 18) Descartar el etanol y dejar evaporar
- 19) Resuspender en agua libre de DNAsas y RNAsas (25-50 µl)

4.2.5 Electroforesis en gel de agarosa

Se utilizó gel de agarosa para la corrida de muestras de ADN. Se usó una concentración de agarosa de 1% en todos los casos. Se diluyó la agarosa en Buffer TAE 1X (Tris 40 mM- Ac. Acético 20mM- EDTA 1 mM) y se agregó Bromuro de etidio (0,0004 mg/ml final).

Las muestras fueron sembradas mezcladas con buffer de siembra 1X (Buffer stock 6x: 30% v/v glicerol, 0,25% p/v de azul de bromofenol y 0.25% p/v xileno cianol FF)

Para analizar y comparar las muestras se sembraron 3 μ l del marcador 1 kb DNA Ladder de New England Biolabs, preparado según las indicaciones del fabricante. El gel se corrió a 100 volts durante una hora y los resultados fueron observados mediante un transiluminador UV.

4.2.6 Purificación de ADN de los geles de agarosa

Se utilizó el kit comercial Monarch[®] DNA Gel Extraction Kit (New England BioLabs inc.) para la purificación de ADN de geles de agarosa. Se siguió el protocolo brindado por el comerciante:

- 1) Pesar eppendorf vacío
- 2) Cortar las bandas de gel correspondientes
- 3) Calcular el peso del gel (mg)
- 4) Agregar *dissolving buffer*, siguiendo la relación 400 μ l/ cada 100 mg de gel
- 5) Incubar a 50°C durante 10 minutos
- 6) Colocar la columna en el tubo colector y agregar la muestra
- 7) Centrifugar a 13.000 rpm durante 1 minuto
- 8) Descartar el percolado
- 9) Agregar 200 μ l de *DNA wash buffer*
- 10) Centrifugar a 13.000 rpm durante 1 minuto
- 11) Descartar el percolado
- 12) Repetir el lavado
- 13) Transferir columna a un eppendorf de 1,5 ml
- 14) Agregar 10 μ l de *DNA elution buffer* al centro de la matriz
- 15) Esperar 1 minuto
- 16) Centrifugar a 13.000 rpm durante 1 minuto

4.2.7 Transformación de *Escherichia coli* DH5 α F'

Se siguió el siguiente protocolo de transformación:

- 1) Colocar en un tubo de bacterias competentes conservadas a -80°C el volumen total de la ligación
- 2) Incubar 15 minutos en hielo
- 3) Realizar el shock térmico de 42°C durante 90 segundos.
- 4) Agregar 1ml de medio LB

- 5) Incubar en la estufa a 37°C durante 1 hora
- 6) Preparar placas con LB agar, Ampicilina (50 µg/ml), IPTG (0,0003M) y X-Gal (0,075 mg/ml) para seleccionar las bacterias que poseen el plásmido o inserto de interés (en el caso de utilizar el plásmido pGEMt easy)
- 7) Centrifugar las bacterias transformadas durante 5 minutos a 5.000 rpm. Descartar aproximadamente 900 µl de LB y resuspender el pellet en los 100 µl restantes.
- 8) Sembrarlos en la placa
- 9) Incubar a 37°C durante una noche

4.2.8 Transfecciones de células Vero

Las transfecciones fueron realizadas utilizando el reactivo comercial Lipofectamine 3.000, siguiendo las instrucciones brindadas por el fabricante:

- 1) Sembrar en una placa multiwell de 24 pocillos 10.000 células Vero. Incubar las células hasta obtener una confluencia del 70-90% (que equivale a 168.000 – 216.000 células por well)
- 2) Diluir el reactivo comercial “Lipofectamine™ 3.000” en 25 µl de medio “OptiMEM™”.
- 3) Preparar *master mix* de ADN diluyendo 1 µg del ADN de interés en 50 µl de medio OptiMEM™, luego agregar 2 µl del reactivo P3.000™ y mezclar bien.
- 4) Añadir 25 µl de la *master mix* del paso 3 a los 25 µl de cada tubo del paso 2 (razón 1:1)
- 5) Incubar durante 10-15 minutos a temperatura ambiente
- 6) Agregar los 50 µl resultantes en sus respectivos pocillos con células.

Al día siguiente de la transfección agregar los antibióticos de selección correspondientes.

4.2.8.1 Silenciamiento de PARG

La línea transgénica en la que PARG fue silenciada mediante la técnica de ARN de interferencia. Para ello se transfectó una monocapa de células Vero con el vector comercial shPARG (Santa Cruz Biotechnologies), a partir del cual se expresa una horquilla de ARN diseñada para provocar la degradación de los ARN mensajeros de PARG. La transfección fue realizada utilizando el reactivo Lipofectamine 3.000, de acuerdo con lo indicado anteriormente.

Aquellas células que hubieran incorporado el plásmido fueron seleccionadas en base a su resistencia a Puromicina.

4.2.8.2 Transfección de pcDNATM3.1(+)

Los insertos construidos y/o amplificados por PCR fueron ligados al vector comercial pcDNATM 3.1(+) siguiendo el protocolo general y utilizando el antibiótico G418 para seleccionar las células transfectadas. Como se observa en el mapa representativo del vector (Figura 5), la secuencia NeoR/KanR confiere resistencia a Neomicina (G418).

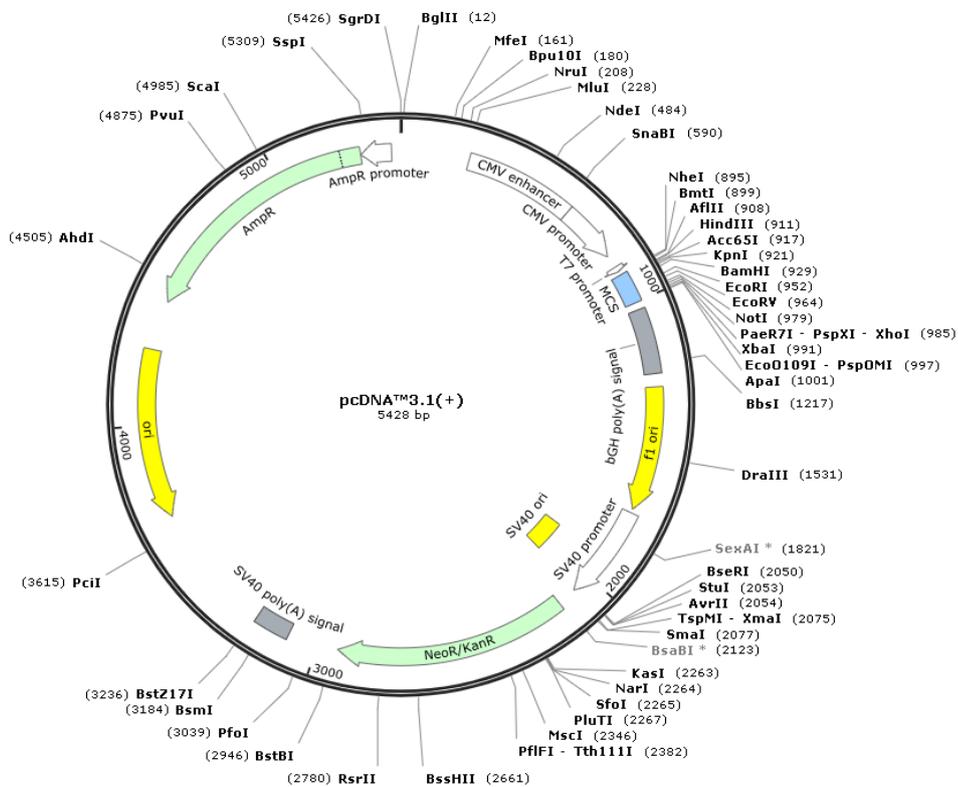
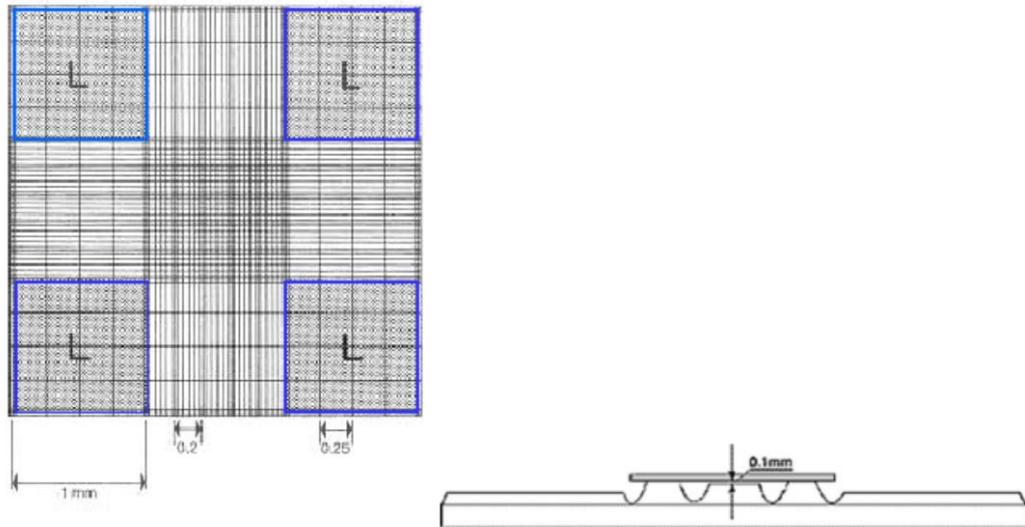


Figura 5: Mapa representativo del vector comercial pcDNATM 3.1(+) (SnapGene).

4.2.9 Cuantificación de células mediante la cámara de Neubauer

Para contabilizar la cantidad de células Vero se utilizó una cámara de Neubauer. Se sembraron 10 µl de la muestra que contenían las células y se realizó el recuento mediante el uso de un microscopio óptico.



$\text{Área} = 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} = 1 \text{ mm}^2$	$\text{Volumen} = 1 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} = 0,1 \text{ mm}^3 = 1 \times 10^{-4} \text{ ml}$
---	--

Total Células Contadas
 Concentración celular = ----- x 10.000
 Número de Cuadrados

4.2.10 Congelamiento de células

Se retiró el medio de cultivo de las botellas y se lavó la monocapa celular con PBS 1x, luego se agregó 1ml de solución de Tripsina (tripsina 0,05%-EDTA 0.5 mM en PBS 1x) para despegar las células. Una vez que las células se despegaron del soporte sólido, se añadieron 4 ml de medio MEM - SFB10%. Se trasvasó la suspensión celular a un tubo cónico de 15 ml y se centrifugó 5 min a 1.000 rpm. Se retiró el sobrenadante y se agregaron 2 ml de una solución que contenía 90% SFB y 10% DMSO. Se repartió 1 ml en cada crio tubo y se dejó a -80 °C durante un día. Luego se colocaron los criotubos en un tanque de nitrógeno.

4.2.11 Inhibición de la vía PI3k/Akt

Se utilizó el inhibidor comercial de la vía PI3k/Akt, Wortmanina 100 nM, incubando las células durante 30 minutos en presencia de la droga.

4.2.12 Inhibición de PARG

La actividad de la proteína Poly(ADP-ribose)Glicohidrolasa se inhibió mediante el uso de DEA (6,9-diamino-2-ethoxyacridine lactate monohydrate) 1 μM (Trevigen). En la mayoría

de los ensayos que requerían de la inhibición de PARG, ésta se logró dejando incubar a las células durante 30 minutos con la droga mencionada.

4.2.13 Extracción de proteínas

Para la obtención de extractos de proteínas de células Vero, se sembraron las células en un soporte sólido y tras el período de crecimiento deseado, se descartó el medio de cultivo de las muestras correspondientes y la monocapa celular fue lavada 1 vez con PBS 1x estéril. Posteriormente, se adicionó 1 ml de PBS 1x y las células fueron despegadas del soporte plástico utilizando un rastrillo de goma. Luego, la suspensión celular se colocó en un tubo de 1,5 ml y se centrifugó (5 minutos a 200 *xg*). El pellet obtenido se resuspendió en 50-100 μ l de Solución de lisis.

La lisis completa de las células fue realizada mediante la aplicación de 1 pulso de sonicación suave.

4.2.14 Cuantificación de proteínas por Bradford

La cuantificación de las proteínas en la muestra se realizó mediante la técnica de Bradford comparándola contra una curva patrón. Para la realización de una curva estándar, se hizo uso de soluciones de distintas concentraciones de seroalbúmina bovina (BSA) (0,1 – 0,2 – 0,3 – 0,4 – 0,5 – 0,6 – 0,7 – 0,8 – 0,9 μ g/ μ l). Se colocaron 10 μ l en distintos pocillos de una placa multiwell de 96 de cada una de estas soluciones de BSA, y también un pocillo sin BSA. Tanto a las muestras de la curva patrón como a las muestras incógnita se le agregaron 200 μ l del reactivo de Bradford. Se midió la absorbancia a 590 nm a través de un lector de multiplacas para el espectro UV-Visible y se realizó una curva de calibración considerando las concentraciones conocidas de BSA.

4.2.15 SDS-PAGE y Western Blot

4.2.15.1 Preparación del gel de SDS-poliacrilamida

Se armaron geles de SDS-poliacrilamida 10% para la separación de proteínas en los extractos totales. Cada gel constaba de dos sectores: gel concentrador y gel separador. Por cada gel armado, se realizaron las siguientes mezclas:

Gel separador:

H ₂ O	3,5 ml
------------------	--------

30% Acrilamida:	3,8 ml
Bis Acrilamida	
1,5 M Tris 8,8 pH	2,5 ml
10% SDS	100 µl
10% Persulfato de Amonio	100 µl
TEMED	4 µl

Gel concentrador:

H ₂ O	1,4 ml
30% Acrilamida:Bis Acrilamida	0,33 ml
1,5 M Tris 8,8 pH	0,25 ml
10% SDS	20 µl
10% Persulfato de Amonio	20 µl
TEMED	2 µl

4.2.15.2 *Siembra y corrida*

Se sembraron 30 µg de cada muestra proteica. Antes de sembrar se desnaturalizó la muestra utilizando un buffer de siembra 1X (Buffer stock 5x: glicerol 50% v/v; DTT 7,7% p/v; SDS 10% p/v; Tris-HCl 0,4 M pH 6,8; azul de bromofenol 0,002% p/v.) y luego se incubó a 99°C durante 10 minutos.

Como indicador de peso molecular, se utilizó el marcador “*Blue plus® IV protein marker*” (2,5 ul). Las corridas se realizaron a 35 mA por cada gel, hasta observar la separación óptima de las bandas del marcador.

4.2.15.3 *Transferencia*

Se realizó una electrotransferencia semi-húmeda para transferir las proteínas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa para la posterior realización del Western Blot. Para esto se utilizaron 6 papeles de filtro Whatman y 1 membrana por cada gel. Se utilizó buffer de transferencia (Tris-Glicina 1X; metanol 20% v/v).

Se mojaron los papeles de filtro y también la membrana en dicho buffer y se armó la estructura para la transferencia de la manera que muestra la Figura 6.

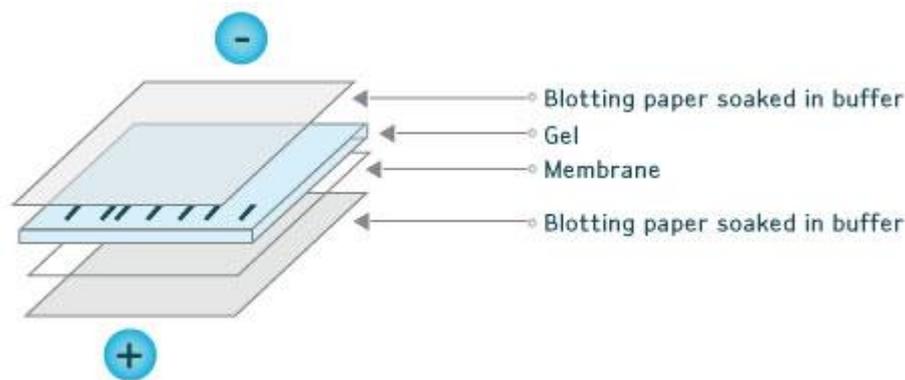


Figura 6: representación de la transferencia del Western Blot (Merck)

Se dejó transferir 1 hora a 130 mA por gel completo.

4.2.15.4 *Tinción con Rojo Ponceau*

Para evaluar si la transferencia de proteínas fue exitosa, se tiñó la membrana con rojo Ponceau (0,1% p/v Ponceau S; 5% v/v de ácido acético) y luego se lavó la membrana con agua para eliminar el Rojo Ponceau excedente y así visualizar las bandas.

4.2.15.5 *Bloqueo*

Se bloqueó la membrana durante 1 hora o toda la noche en solución de bloqueo (5% leche en polvo y TBS 1X – Tween 0,05% (TBST)) para evitar pegados inespecíficos del anticuerpo.

4.2.15.6 *Anticuerpo primario*

Se incubó con anticuerpo primario diluido en una solución de dilución (TBST 1X 0,05% y leche 1%) durante una noche en frío y con agitación.

4.2.15.7 Anticuerpo secundario

Tras la incubación con el anticuerpo primario, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con TBST y luego se dejó incubar con el anticuerpo secundario durante 1-2 horas.

4.2.15.8 Revelado

El Western blot fue revelado mediante el uso del reactivo comercial Western Lightning Plus-ECL (Perkin Elmer), siguiendo las instrucciones del fabricante. La señal quimioluminiscente fue observada y registrada mediante el equipo GeneGnome de Syngene.

4.2.15.9 Stripping

Para eliminar los anticuerpos adheridos a las membranas tras el Western blot y así poder reutilizarlas en caso de ser necesario, se lavó 2 veces con buffer de *Stripping* (1,5% Glicina; 0,1% SDS; 0,1% Tween 20; pH 2,2) por 10 minutos a temperatura ambiente, luego se realizaron otros 2 lavados con PBS 1X durante 10 minutos y por último otros 2 lavados con TBST por 10 minutos. Tras este procedimiento, se realizó nuevamente el bloqueo de acuerdo con lo indicado en la sección 4.2.15.5.

4.2.16 Inmunofluorescencia

Para la realización de las inmunofluorescencias se colocaron cubreobjetos de 12 mm de diámetro dentro de pocillos de placas de 24 wells. En ellos se sembraron aproximadamente 10.000 células Vero silvestres o transgénicas en medio MEM 10% SFB. Pasadas 24 horas de la siembra se realizaron las infecciones (si es que el ensayo las requería). A aquellas células que serían infectadas se les removió el medio de cultivo y se las incubó en presencia de tripomastigotes (MOI 100:1) en medio MEM-SFB 3% durante 1 h. Luego de ese tiempo, se descartó el medio de los pocillos, se lavó con PBS 1X y se fijó con 250 μ l de paraformaldeído (PFA) 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se removió el PFA, se lavó nuevamente con PBS 1x y se agregó una solución de bloqueo (PBS 1X, BSA 3%, Tritón 0,3%) durante 1 h para impedir interacciones inespecíficas de los anticuerpos con el material biológico. Transcurrido ese tiempo, se realizaron 3 lavados con PBS 1x de 5 minutos y se les agregó el anticuerpo primario (diluido en PBS 1X, BSA 1% y Tritón X 100 0,3%) de la siguiente manera: 15 μ l del anticuerpo primario se depositaron en un vidrio rectangular, donde se colocaron los vidrios con las células en ellos. Las muestras se incubaron en presencia del anticuerpo primario durante toda una noche en cámara húmeda a 4 °C. Al día siguiente, se

depositaron los vidrios redondos nuevamente en la placa multi-well de 24 pocillos, se lavaron los vidrios 3 veces con PBS 1x y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente durante 2 horas de la misma manera que se hizo con el primario. Para finalizar el ensayo, transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron nuevamente 3 lavados con PBS 1X. Luego se colocaron 5 μ l de DAPI+Vectashield en un vidrio rectangular y se colocaron los vidrios sobre este líquido de montaje. Los resultados fueron visualizados utilizando un microscopio de fluorescencia (Olympus BX40). Las imágenes resultantes fueron procesadas con los programas de edición ImageJ y Photoshop.

4.3 Métodos vía autofágica

4.3.1 Ensayo β -Galactosidasa

Para evaluar la vía autofágica de invasión y su posible relación con PARG, se sometió a las células a un período de hambreado breve (1 h) y se cuantificaron los niveles de infección mediante el ensayo β -Galactosidasa. Este ensayo se basa en la utilización de una cepa de parásitos que expresan β -Galactosidasa, por lo cual se puede determinar el nivel de infección mediante una reacción colorimétrica. El ensayo se detalla a continuación:

4.3.1.1 Preparación de las células

Se sembraron 10.000 células por well en una placa de 96 pocillos y se incubaron durante 24 h en medio MEM- SFB 10%.

4.3.1.2 Inhibición, hambreado e infección

Pasadas 24 h tras la siembra de las células, se agregaron los inhibidores (DEA y Wortmanina) en sus concentraciones correspondientes a aquellos pocillos que lo requerían. Se dejaron actuar por 30 minutos y luego se procedió al hambreado de las células en los pocillos correspondientes. Para ello, a aquellas células que sufrirían dicho proceso, se les retiró el medio de cultivo, se les realizó un lavado con PBS 1x (o con la misma solución de hambreado) y se les colocaron 100 μ l de la solución de Earle's (y nuevamente los inhibidores correspondientes), en presencia o ausencia de los inhibidores antes mencionados. Tras 2 h de incubación en este medio, se continuó con la infección a aquellas células en los pocillos correspondientes: se estandarizó una MOI 15:1 y se agregaron los mismos en la solución de Earle's o MEM-SFB 3%, según correspondiera. Las células fueron incubadas en presencia de los tripomastigotes durante 1 h. Transcurrida la hora, se les sacó el medio a todos los pocillos y se les agregó 100

µl de MEM-SFB 3% para que mantengan todas las mismas condiciones. Se incubaron las células durante 72 horas a 37 °C.

4.3.1.3 Revelado

Transcurridas las 72 horas se realizó el revelado del ensayo, midiendo los niveles de infección. Para esto, se utilizaron dos soluciones que se detallan a continuación:

- Buffer de lisis:

TRIS pH 7-8	25 mM
EDTA	2 mM
DTT	2 mM
Tritón	1%
Glicerol	10%

- Buffer de reacción (2X):

Fosfato de Sodio pH 7	200 mM
MgCl ₂	2 mM
Beta mercaptoetanol	100 mM
ONPG	1,33 mg/ml

Se descartó el MEM SFB 3%, se agregaron 100 µl de buffer de lisis y se incubaron las células en este buffer por 10 minutos. Finalizado este tiempo, se agregaron 100 µl del buffer de reacción 2x. Una vez desarrollado el color, se leyó la absorbancia a 420 nm del producto de la reacción, mediante un lector de microplacas multiwell.

Cada condición se evaluó por triplicado y se realizaron 4 ensayos independientes. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante el programa informático GraphPad.

4.3.2 Ensayo de viabilidad Alamar Blue

Para corroborar la viabilidad de las células tras el proceso de hambreado, se realizó un ensayo utilizando el reactivo Alamar Blue. El procedimiento es similar al descripto para ensayo de β-Galactosidasa, pero en ausencia de infección. El revelado se realiza utilizando Resazurina

100 µg/ml, que es reducido por el metabolismo celular activo, generando como producto un compuesto fluorescente. Para revelar el ensayo, se midió fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 530-560 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm.

4.4 Procesamiento de datos y estadística

Las imágenes fueron analizadas y editadas con Adobe Photoshop. Por otro lado, las imágenes de las inmunofluorescencias fueron unidas y acopladas mediante la opción “Merge Channels” del programa de edición ImageJ. En el mismo programa se realizaron varios análisis de imágenes tal como la cuantificación de partículas (a través de la herramienta “Analyze particles”) o la evaluación de la co-localización de las señales de distintos colores (Herramienta llamada “Plot profile”). De todas maneras, todas las imágenes son conservadas sin editar para futuras posibles publicaciones.

Por otra parte, el análisis estadístico fue analizado mediante el programa “GraphPad” a través de pruebas estadísticas de ANOVA de dos vías, en donde se evalúan uno o más parámetros en las distintas muestras biológicas, a su vez pudiéndose evaluar distintas réplicas técnicas o biológicas de cada muestra. También, en alguna ocasión, se recurrió a una prueba estadística Test-T, que se utiliza para determinar si hay una diferencia significativa entre las medias de dos grupos. Los asteriscos en los gráficos significan significancia estadística, en donde *: P valor <0,05 y **: P valor < 0,01.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Vía independiente de lisosomas

5.1.1 Construcción de la sonda FYVE_eGFP o FYVE_HA para la evaluación del reclutamiento de vacuolas ricas en PIP3

El dominio FYVE es responsable de la interacción de ciertas proteínas con membranas ricas en PtdIns(3,4,5)P3/PtdIns(3,4)P2. Para la evaluación de vacuolas ricas en PIP3 se realizó la construcción de una línea celular Vero que expresa el dominio FYVE unido a un epítipo fácilmente detectable. En este caso, se propuso fusionar el dominio FYVE (obtenido por PCR a partir del gen TcrPDEC2) duplicado en tándem a la proteína GFP o HA, que funcionan como etiquetas que permiten detectar la presencia y localización del péptido de interés. En la figura 7 se esquematiza el proceso de construcción y obtención de la línea transgénica Vero FYVE_eGFP / FYVE_HA.

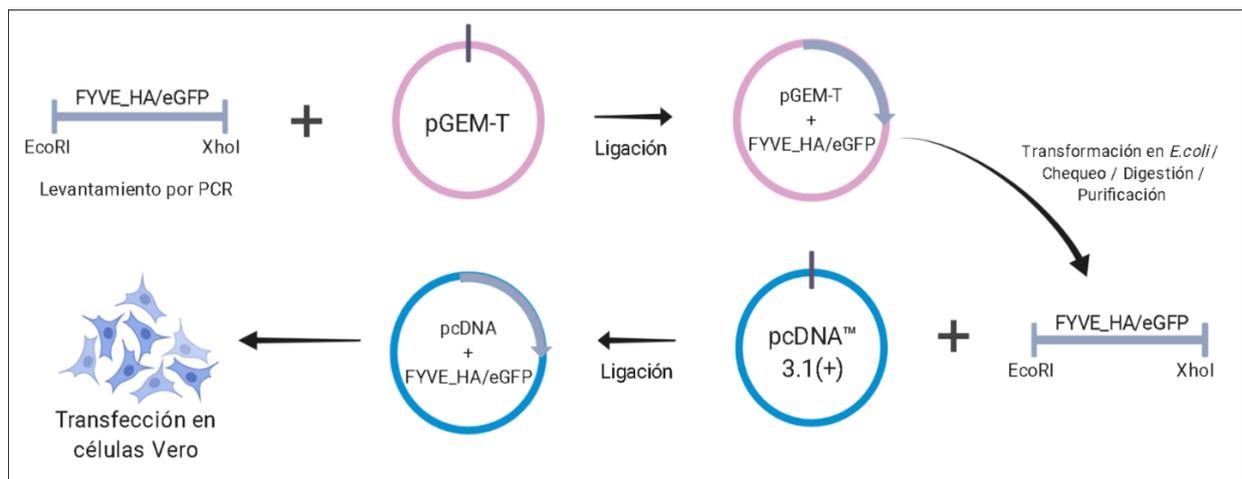


Figura 7: Esquema del proceso de clonado y subclonado del fragmento FYVE2_eGFP/HA en células Vero.

5.1.1.1 Diseño de primers

Las sondas mencionadas fueron construidas mediante amplificación por PCR usando como molde el vector pTEX-FYVE2x-eGFP (que contenía en su secuencia FYVE₂eGFP), el cuál fue gentilmente provisto por la Dra. Alejandra Schoijet. Se diseñaron manualmente los primers para cada constructo, como muestra la Tabla 1. Luego, se verificó la ausencia de regiones que provocaran la formación de horquillas intramoleculares o dúplex de ADN a través del programa *Oligocalc* (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>).

En el caso de FYVEx2_HA, la secuencia de HA fue agregada en la secuencia del primer reverso. Considerando que luego estas construcciones deberían ser subclonadas en el vector comercial pcDNATM3.1(+), los *primers* se diseñaron de manera tal de incluir los sitios de corte de enzimas de restricción que se encontraban en el sitio de clonado múltiple del vector indicado pero que no presentaban sitios de reconocimiento dentro de la secuencia de la sonda de interés. Las secuencias de FYVEx2, eGFP y HA que fueron consideradas para los diseños de *primers* y elección de las enzimas fueron las siguientes:

- FYVEx2:

5' **GAAAGTGATGCCATGTT**CGCTGCTGAAAGAGCCCCTGACTGGGTGGATGCTGAGGAATGCCATC
GGTGCAGAGTACAGTTTGGGGTGGTGACCCGCAAGCATCACTGCCGAGCATGTGGGCAGATCTTCT
GTGGCAAGTGCTCCTCCAAGTACTCCACCATCCCCAAGTTCGGCATTGAGAAGGAGGTGCGCGTGT
GTGAGCCCTGCTATGAGCAGCTGAACAAGAAGGCACAAGGACAAGGATCCGAAAGTGATGCCATG
TTCGCTGCTGAAAGAGCCCCTGACTGGGTGGATGCTGAGGAATGCCATCGGTGCAGAGTACAGTTT
GGGGTGGTGACCCGCAAGCATCACTGCCGAGCATGTGGGCAGATCTTCTGTGGCAAGTGCTCCTCC
AAGTACTCCACCATCCCCAAGTTCGGCATTGAGAAGGAGGTGCGCGTGTGTGAGCCCTGCTATGAG
CAG**CTGAACAAGAAGGCA** 3'

- eGFP:

5'ATGAGTAAAGGAGAAGAAGTCTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTGAATTAGATGGTGATG
TTAATGGGCACAAATTTTCTGTCACTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAAAGTACC
CTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAAGTACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTTCACT
TATGGTGTTCATGCTTTTCAAGATACCCAGATCATATGAAGCGGCACGACTTCTTCAAGAGCGC
CATGCCTGAGGGATACGTGCAGGAGAGGACCATCTTCTTCAAGGACGACGGGAACTACAAGACA
CGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGAGACACCCTCGTCAACAGGATCGAGCTTAAGGGAATCGATTT
CAAGGAGGACGGAAACATCCTCGGCCACAAGTTGGAATACAACACTACAACACTCCACAACGTATAC
ATCATGGCCGACAAGCAAAAGAACGGCATCAAAGCCAAGTCAAGACCCGCCACAACATCGAAG
ACGGCGGCGTGCAACTCGCTGATCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCCTT
TTACCAGACAACCATTACCTGTCCACACAATCTGCCCTTTGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGA
CCACATGGTCCTTCTTGAGTTTGTAAACAGCTGCTGGGATTACACATGG**CATGGATGAACTATACA**
AGTAG 3'

- HA:

5' **TAC CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC GCT** 3'

Las enzimas de restricción seleccionadas, basándose en los sitios de clonado múltiple del vector comercial pcDNATM3.1(+), fueron **EcoRI (GAATTC)** y **XhoI (CTCGAG)**. Ninguna de las dos enzimas reconoce secuencias dentro de los elementos FYVE, eGFP o HA.

Las secuencias de los *primers* diseñados se muestran en la Tabla 1.

Nombre del primer	Secuencia	Longitud	Temperatura hibridación
FYVEx2_EcoRI_eGFP_forward	5' GAA TTC ATG GAA AGT GAT GCC ATG TTC 3'	28 bases	65,3 °C
FYVEx2_eGFP_XhoI_reverse	5' CTC GAG CTA CTT GTA TAG TTC ATC CAT GC 3'	27 bases	69 °C
FYVEx2_EcoRI_HA_forward	5' GAA TTC ATG GAA AGT GAT GCC ATG TTC 3'	28 bases	65,3 °C
FYVEx2_HA_XhoI_reverse	5' CTC GAG CTA AGC GTA ATC TGG AAC ATC GTA TGG GTA TGC CTT CTT GTT CAG 3'	45 bases	82,1 °C

Tabla 1: *Primers* diseñados para la construcción de las sondas FYVEx2_eGFP y FYVEx2_HA

En base al diseño de *primers* realizado, los tamaños esperados de cada insertos fueron de 1.200 pb para la construcción FYVEX2_eGFP y 500 pb para la sonda FYVEX2_HA.

5.1.1.2 Amplificación de los fragmentos de interés por PCR

Una vez diseñados y sintetizados los *primers*, se llevó a cabo la PCR correspondiente para la amplificación de los insertos de interés. Se siguió el protocolo estándar de PCR, sumando controles negativos (sin templado) para cada inserto, como se muestra en la Figura 8.

Las condiciones de ciclado utilizadas se detallan a continuación:

Desnaturalización inicial	94 °C	3'	} 30 ciclos
Desnaturalización	94°C	30'	
Hibridación	65°C	30'	
Extensión	72°C	1'	

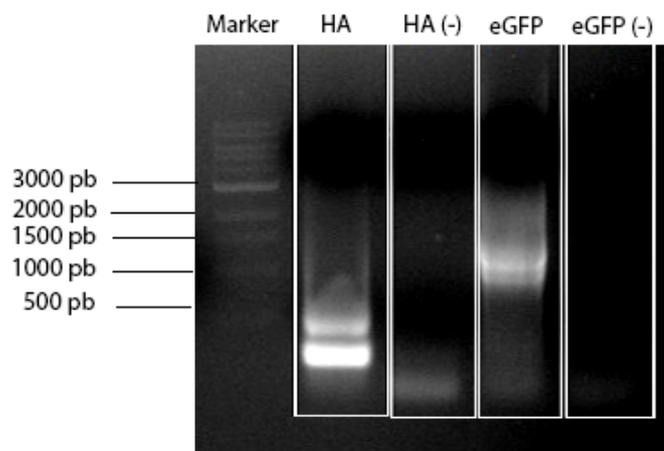


Figura 8: Amplificación por PCR de las sondas FYVEX2_HA y FYVEX2_eGFP. Los fragmentos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa 1% y visualizados en un transiluminador UV tras la tinción con BrEt. Marker: 1 kb NEB.

Se obtuvieron fragmentos del tamaño esperado para cada una de las sondas a construir, como se puede observar en la figura 8, al comparar con el marcador de peso molecular. En la imagen se puede observar que en ambos casos hay dos bandas. Esto se debe a que la sonda fue diseñada con el dominio FYVE duplicado en tándem y, por ende, el *primer* forward podía hibridarse tanto al comienzo de la primera como de la segunda repetición. Para evitar obtener la sonda con una sola repetición, luego del clonado en pGEM-Teasy, se realizó un chequeo de los insertos por *colony* PCR con *primers* que hibridaban sobre el vector y por digestión, como se detalla a continuación.

5.1.1.3 Ligación del inserto FYVE_EGFP y FYVE_HA al vector pGEM-T easy (Promega) y transformación de bacterias E. coli

Una vez obtenidos los insertos por PCR, se realizó la ligación de los mismos al vector comercial pGEM-T easy (Promega), que se utiliza para clonados de productos de PCR obtenidos por acción de la *Taq* Polimerasa. Las mezclas de ligación se utilizaron para transformar bacterias *E. coli* DH5 α , y así amplificar y posteriormente purificar los insertos y vectores utilizados. Las bacterias que incorporaron el plásmido de interés portador del fragmento amplificado por PCR fueron seleccionadas por su resistencia a Ampicilina y por ausencia de color azul en presencia del inductor IPTG y el sustrato cromogénico x-gal. La

presencia del inserto de interés fue luego corroborada por *Colony* PCR y digestión con enzimas de restricción.

5.1.1.4 *Colony* PCR para identificar y seleccionar las colonias de interés.

Para verificar si las colonias obtenidas tenían el inserto de interés en el plásmido de clonado, se realizó una *Colony* PCR utilizando los *primers* universales T7 Promoter y M13 Reverse.

Las condiciones de ciclado fueron:

Desnaturalización inicial	94°C	3´	} 30 ciclos
Desnaturalización	94°C	30´	
Hibridación	55°C	30´	
Extensión	72°C	1´	

Se evaluaron 7 colonias para cada caso (FYVE_HA y FYVE_eGFP)

De las siete colonias evaluadas para FYVE_eGFP, las colonias 2, 3 y 5 arrojaron un resultado positivo. (Figura 9).

Por su parte, las colonias B, C y D arrojaron los resultados positivos más claros para FYVEx2_HA (Figura 10).

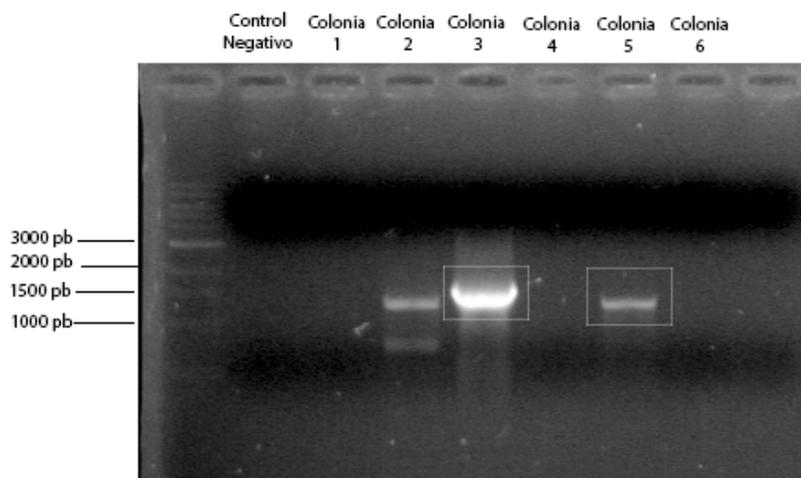


Figura 9: *Colony* PCR para la selección de colonias con FYVE2x_eGFP utilizando los *primers* universales T7 Promoter y M13 Reverse. Los fragmentos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa 1% y visualizados en un transiluminador UV tras la tinción con BrEt. Marker: 1 kb NEB.

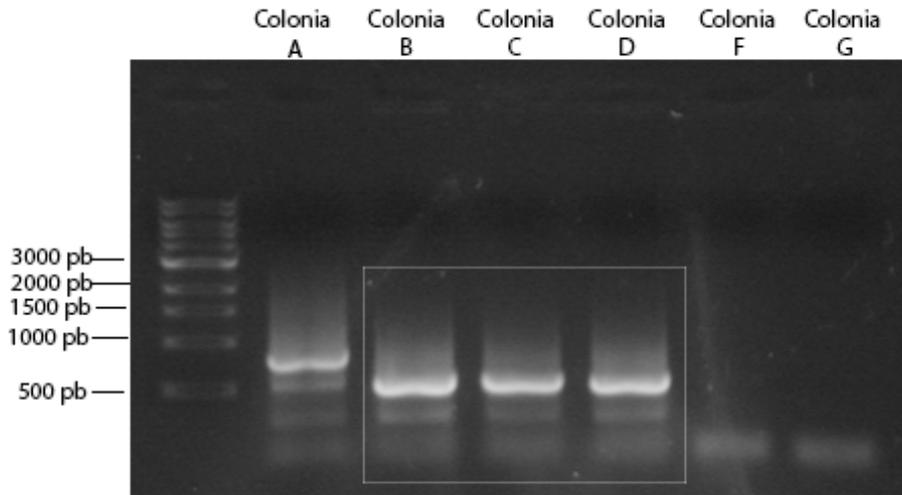


Figura 10: Colony PCR para la selección de colonias con FYVE2x_HA utilizando los *primers* universales T7 Promoter y M13 Reverse. Los fragmentos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa 1% y visualizados en un transiluminador UV tras la tinción con BrEt. Marker: 1 kb NEB.

5.1.1.5 Purificación del vector pGEM-T easy/FYVEx2_eGFP o FYVEx2_HA

De las tres colonias positivas para el inserto FYVEx2_eGFP, se seleccionaron las colonias 3 y 5 dado que en ellas no se observó la amplificación de bandas espúreas. Se realizó una Miniprep a partir de cultivos líquidos en medio LB de las colonias seleccionadas para la obtención del plásmido purificado /pGEM-T/FYVE x2_eGFP. La purificación del vector pGEM-T easy/FYVEx2_eGFP fue corroborada mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 11).

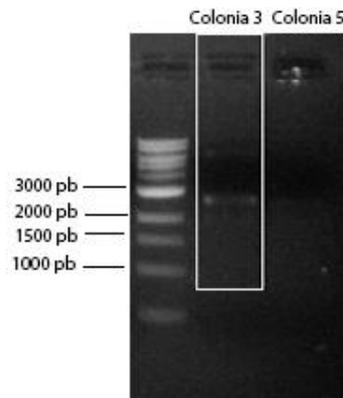


Figura 11: Miniprep de las colonias positivas para FYVEx2_eGFP. El plásmido purificado fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa 1% y visualizado en un transiluminador UV tras la tinción con BrEt. Marker: 1 kb NEB.

Para el caso del vector FYVEx2_HA/pGEM-T se obtuvieron resultados similares.

5.1.1.6 Corroboración de la presencia del inserto de interés mediante digestión enzimática

Para corroborar la presencia del inserto de interés en los plásmidos purificados, se realizó la digestión de los mismos con la enzima EcoRI, la cual reconoce sitios ubicados en el sitio de clonado múltiple del vector, ubicados a ambos lados del inserto, lo que permite liberar al inserto y constatar si presenta el tamaño esperado.

Para el caso de FYVE_eGFP, tras la digestión se obtuvieron fragmentos de 3.000 pb, correspondiente al vector pGEM-T easy, y una banda del tamaño del inserto FYVE_eGFP, de 1.200 pb (Figura 12). El resultado fue positivo, también, para dos colonias de FYVE_HA, donde se observó la misma banda correspondiente al vector pGEM-T east y al inserto de 500 pb (Figura 13).

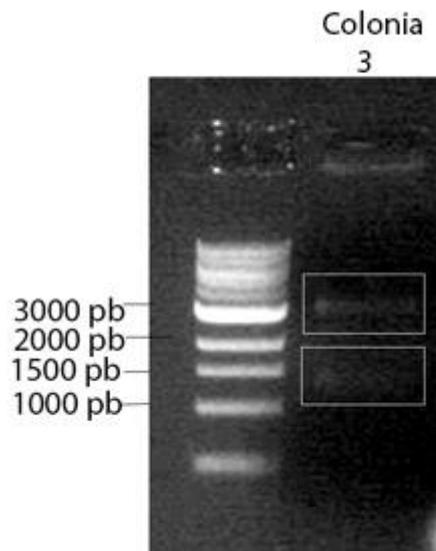


Figura 12: Digestión enzimática para verificar la presencia del inserto FYVE_eGFP en pGEM-T easy. Los fragmentos obtenidos por digestión fueron evaluados por electroforesis en gel de agarosa 1% y visualizado en un transiluminador UV tras la tinción con BrEt. Marker: 1 kb NEB.

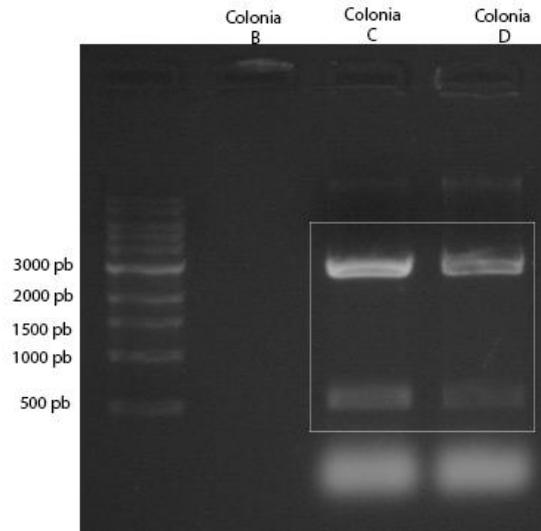


Figura 13: Digestión enzimática para verificar la ligación inserto/vector FYVE_HA con pGEM-T easy. Los fragmentos obtenidos por digestión fueron evaluados por electroforesis en gel de agarosa 1% y visualizado en un transiluminador UV tras la tinción con BrEt. Marker: 1 kb NEB.

5.1.1.7 Digestión y purificación del inserto para el subclonado en el vector pcDNATM3.1(+)

Una vez corroborada la presencia del inserto de interés, se realizó una nueva digestión del plásmido obtenido a partir de las colonias positivas seleccionadas, utilizando las enzimas EcoRI y XhoI, enzimas previamente seleccionadas (Ver sección 5.1.1.1). La digestión se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa de manera similar a lo indicado en la sección anterior y, luego se procedió a la extracción y purificación de la banda correspondiente al inserto de interés, utilizando el kit Monarch[®] DNA Gel Extraction Kit (Ver sección 4.2.6). También se realizó la digestión del vector pcDNATM3.1(+) con las enzimas EcoRI y XhoI para corroborar su tamaño (5428 pb) y generar extremos compatibles con el inserto.

Una vez obtenidos los resultados positivos tanto para FYVE_eGFP (Figura 14) como para FYVE_HA (Figura 15), se procedió a la transformación en bacterias.

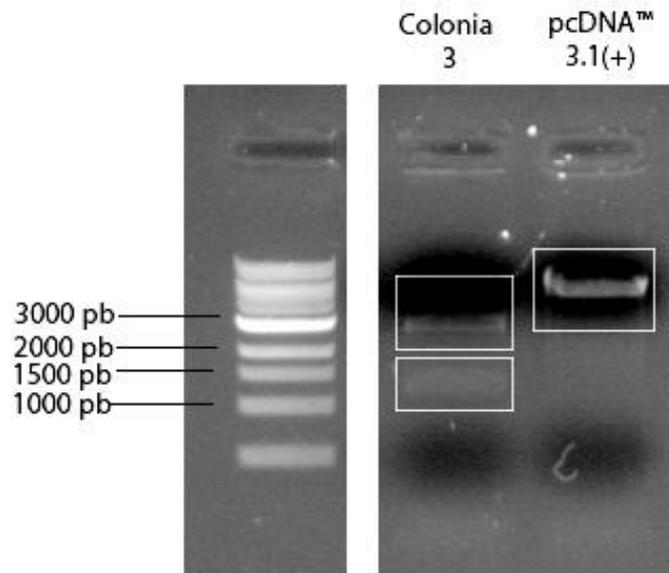


Figura 14: Digestión enzimática para el posterior subclonado en pcDNA™ 3.1(+) de FYVE_eGFP. Los fragmentos obtenidos por digestión fueron evaluados por electroforesis en gel de agarosa 1% y visualizado en un transiluminador UV tras la tinción con BrEt. Marker: 1 kb NEB.

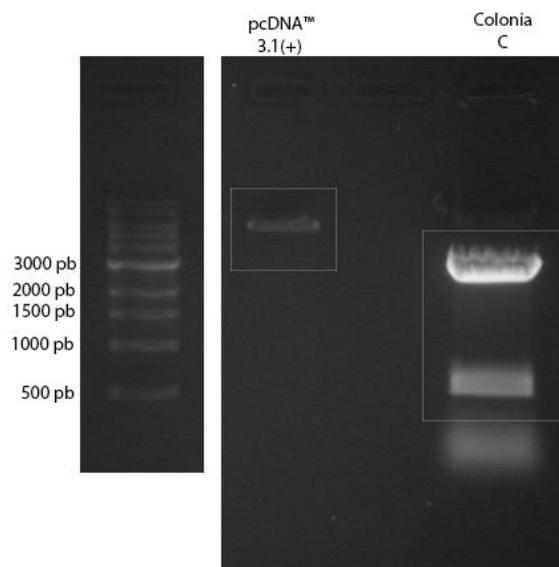


Figura 15: Digestión enzimática para el posterior subclonado en pcDNA™ 3.1(+) de FYVE_HA. Los fragmentos obtenidos por digestión fueron evaluados por electroforesis en gel de agarosa 1% y visualizado en un transiluminador UV tras la tinción con BrEt. Marker: 1 kb NEB.

5.1.1.8 Subclonado del inserto en pcDNA™ 3.1(+), transformación del plásmido en bacterias, Miniprep y chequeo por digestión.

Siguiendo la ecuación mencionada en Materiales y Métodos (Ver sección 4.2.8.2), se realizaron los cálculos correspondientes para realizar dos ligaciones de relación 1:1 y 3:1

inserto/vector, utilizando los reactivos mencionados en la sección 4.2.3.2. Los productos de la ligación inserto/vector fueron utilizados para transformar en bacterias *E. coli* DH5 α , las cuales fueron cultivadas en una placa de LB Agar con el antibiótico Ampicilina (50 μ g/ml).

Con respecto a FYVE_eGFP, para verificar la correcta ligación del inserto de interés en el vector de expresión eucariota se seleccionaron trece colonias y se purificó el potencial el vector recombinante por Miniprep (Figura 16). Luego se evaluó la presencia del inserto mediante una digestión utilizando las enzimas XhoI y EcoRI, donde se obtuvieron los tamaños correspondientes al inserto FYVEX2_eGFP (1.200 pb) y al resto del plásmido pcDNATM 3.1(+)(5428 pb) (Figura 17).

De este modo, se obtuvo el plásmido pcDNATM 3.1(+)/FYVEX2_eGFP para poder ser transfectado en las células Vero silvestres.

Con respecto a FYVE_HA, solo se realizó una *Colony* PCR para seleccionar colonias positivas (Figura 18).

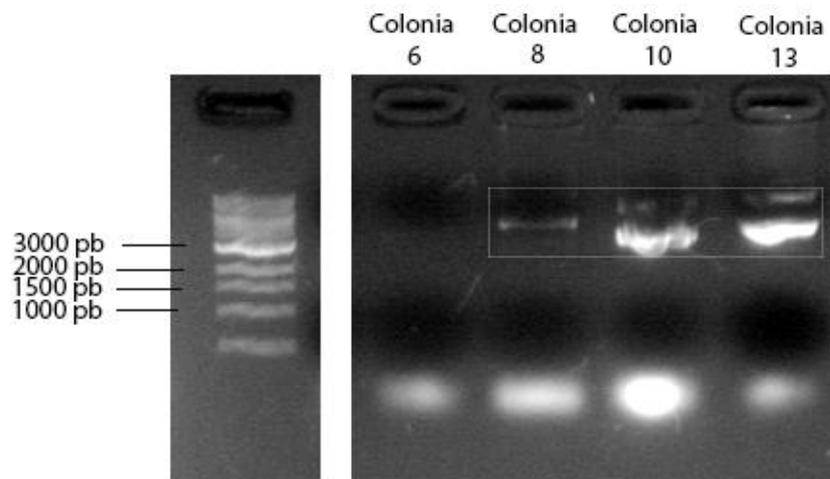


Figura 16: Miniprep FYVE_eGFP/pcDNA. Los plásmidos obtenidos fueron evaluados por electroforesis en gel de agarosa 1% y visualizado en un transiluminador UV tras la tinción con BrEt. Marker: 1 kb NEB.

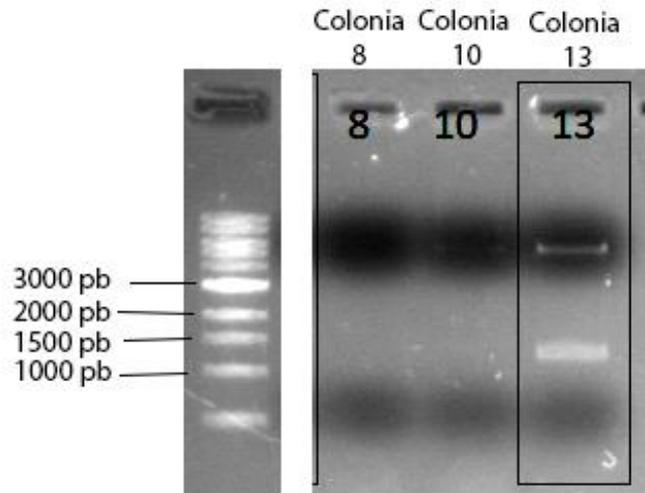


Figura 17: Chequeo por digestión del plásmido FYVE_eGFP /pcDNA

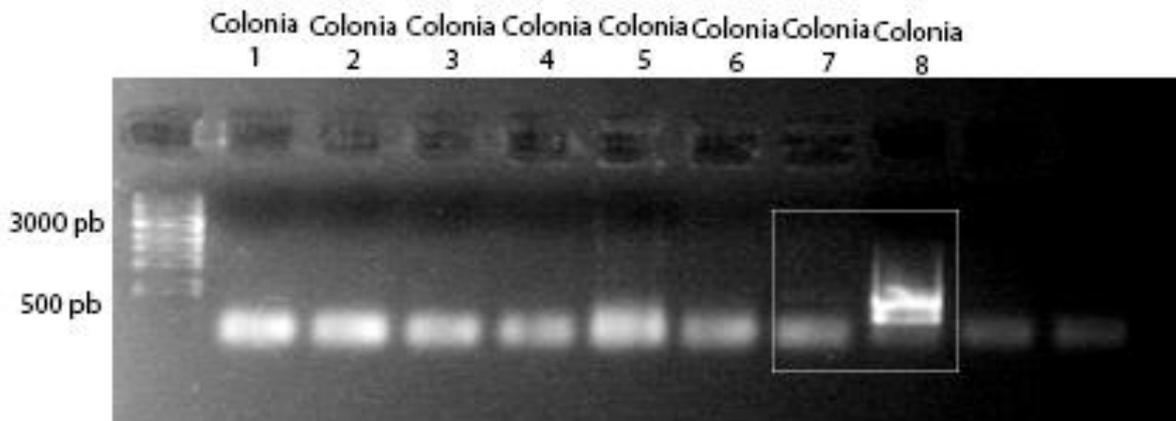


Figura 18: Chequeo de colonias positivas para FYVE_HA/pcDNA mediante Colony PCR. Los fragmentos de PCR fueron evaluados por electroforesis en gel de agarosa 1% y visualizado en un transiluminador UV tras la tinción con BrEt. Marker: 1 kb NEB.

5.1.1.9 Transfección de plásmidos en células VERO

La transfección de los vectores pcDNA™ 3.1(+)/FYVEX2_eGFP y pcDNA™ 3.1(+)/FYVEX2_HA en las células Vero se hizo utilizando el reactivo comercial Lipofectamina 3.000, siguiendo las instrucciones y recomendaciones brindadas por la empresa. La obtención de masa suficiente del vector para realizar esta transfección se realizó mediante la técnica de Midiprep a partir de 200 ml de cultivo bacteriano en medio LB líquido, utilizando un kit comercial.

Para la selección de las células transfectadas se utilizó el antibiótico G418 en una concentración final de 2 mg/ml, agregado al medio de cultivo 24 h post-transfección. La concentración del antibiótico había sido previamente determinada mediante la realización de una curva de concentraciones en el rango de 0,25 – 6 mg/ml. La concentración elegida para la posterior selección de las células Vero transfectadas fue aquella que provocó la muerte de las células silvestres 48 h tras el agregado del antibiótico.

Pese a los esfuerzos realizados, las células Vero no pudieron transfectarse exitosamente con el vector conteniendo el inserto FYVE_HA en, por lo que se decidió utilizar solamente la sonda FYVE_eGFP.

5.1.2 Verificación de la expresión de FYVE_eGFP mediante Western Blot

La expresión de la sonda FYVE2x_eGFP fue evaluada en primera instancia mediante Western Blot (Figura 19). Para ello, se obtuvieron extractos totales de las células Vero silvestres y células Vero transfectadas y se utilizó un anticuerpo dirigido contra GFP (conejo), y un anticuerpo secundario anti-conejo. Para normalizar los resultados, se utilizó un anticuerpo anti-tubulina.

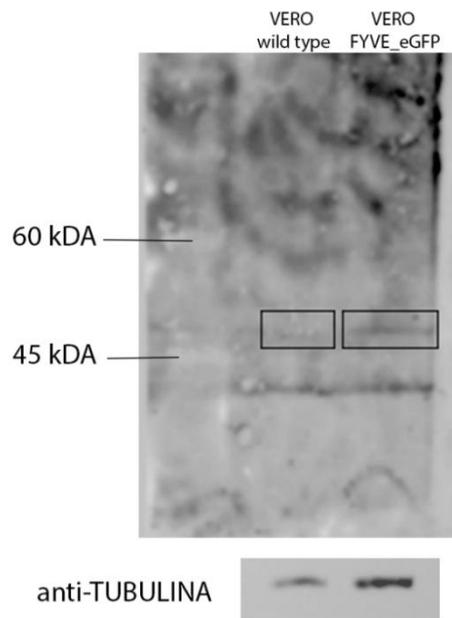


Figura 19: Expresión FYVE_eGFP en las células Vero: Se utilizó un anticuerpo anti-eGFP 1:4000, un anticuerpo secundario anti-conejo 1:5.000 y anti-tubulina 1:10.000 para evaluar la expresión de la proteína GFP en extractos proteicos provenientes de células Vero silvestres y células Vero transfectadas con el vector/inserto /pcDNA 3.1(+)/FYVE_eGFP.

La banda correspondiente a la sonda peptídica FYVE2x_eGFP tiene un peso esperado de 50 kDa. Se observó la presencia de una banda de aproximadamente este peso molecular en los extractos provenientes de las células Vero transfectadas que se encontró muy tenuemente en las células silvestres. El ensayo de Western Blot fue realizado dos veces en distintos momentos. Utilizando el programa ImageJ, se normalizó la intensidad de la señal obtenida de 50 kDa en relación con la señal obtenida utilizando el anticuerpo dirigido contra tubulina (gen de *housekeeping*) (Figura 20). Los resultados obtenidos y analizados demostraron un exitoso aumento de la expresión de FYVE_eGFP en las células transfectadas, siendo 4,7 veces mayor la señal en ellas que en las Vero silvestres, en dónde la señal observada podría corresponder a banda espúrea.

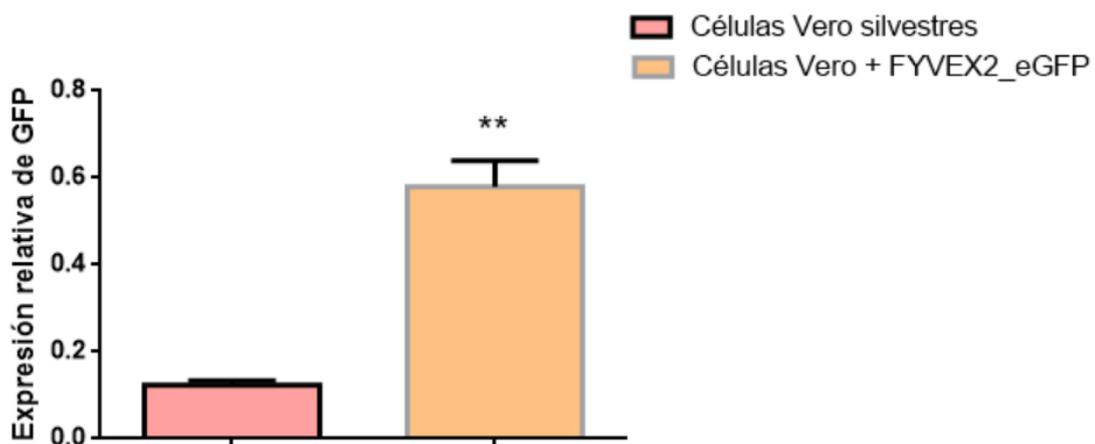


Figura 20: Expresión relativa de GFP en las distintas condiciones evaluadas (Vero silvestres y Vero transfectadas). La cuantificación fue realizada sobre el Western Blot mediante el programa ImageJ y analizada estadísticamente mediante el programa GraphPad, mediante un Test-T donde el P valor fue igual a 0,0087. **: p <0,01

5.1.3 Marcación con epítipo fluorescente para la verificación de la línea transfectada

La elección de eGFP como epítipo del dominio FYVEx2 se basó en la suposición que esta proteína permitiría la visualización de la sonda de manera directa (sin la utilización de anticuerpos) por microscopía de fluorescencia y así verificar que la línea celular transfectada expresara FYVE2x_eGFP, en comparación de una línea celular Vero silvestre. Como se observa en la figura 21, utilizando las células transfectadas no fijadas, es notoria una mayor intensidad de la señal de fluorescencia verde (correspondiente a GFP), indicando la expresión

exitosa de la sonda de interés. Sin embargo, la señal de la proteína eGFP se veía considerablemente disminuida tras la fijación de la monocapa celular con PFA 4%, por lo que en los ensayos de inmunofluorescencia que implicaron la infección de las células Vero con tripomastigotes fue necesaria la utilización de un anticuerpo anti-GFP.

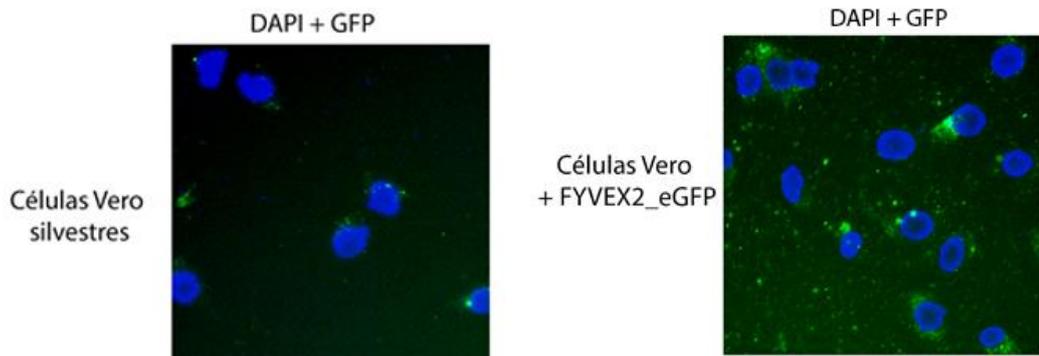


Figura 21: Evaluación de la intensidad de GFP en células Vero silvestres y células Vero transfectadas

5.1.4 Evaluación de la formación de vacuolas ricas en PIP3 en el modelo de infección utilizado

La vía de invasión independiente de lisosomas procede a través del reclutamiento a la periferia celular de vacuolas no lisosomales cuya membrana se encuentra enriquecida en PtdIns(3,4,5)P₃/PtdIns(3,4)P₂. Para evaluar esto en nuestro modelo, se realizó una inmunofluorescencia con anticuerpo anti-GFP utilizando como célula hospedadora la línea Vero que expresa el dominio FYVE2x fusionado a GFP, ya que, como se mencionó con anterioridad, el dominio FYVE es responsable de la interacción de ciertas proteínas con membranas ricas en PtdIns(3,4,5)P₃/PtdIns(3,4)P₂. Se realizó, entonces, la infección en presencia o ausencia de los inhibidores DEA y Wortmanina y se evaluó la localización de la sonda por la señal de GFP juntamente con la tinción utilizando el suero anti- *T. cruzi*.

Las células Vero (10.000/pocillo) fueron cultivadas en placa multiwell de 24 pocillos, siguiendo el protocolo explicado en la sección de materiales y métodos. Luego de 24 h, se procedió a infectar las monocapas de células utilizando tripomastigotes de *T. cruzi* (MOI 100:1) durante 1 hora en las condiciones detalladas (Figura 23), mientras que en otras no hubo presencia de parásitos (Figura 22). Las distintas condiciones evaluadas en este ensayo fueron:

- Células FYVE_eGFP en presencia o ausencia de infección
- Células FYVE_eGFP con DEA 1µM, en presencia o ausencia de infección

- Células FYVE_eGFP con Wortmanina 100 nM, en presencia o ausencia de infección
- Células FYVE_eGFP con DEA 1µM, con Wortmanina 100 nM, en presencia o ausencia de infección
- Células FYVE_eGFP sin anticuerpo primario
- Células Vero silvestres control.

En este caso, se utilizó un anticuerpo primario anti-GFP (conejo) y un anticuerpo secundario anti-conejo para detectar la presencia y localización de la sonda FYVE2x_eGFP. Además, se realizó una contratincción con Faloidina para visualizar el citoesqueleto y DAPI para la visualización de los núcleos de las células.

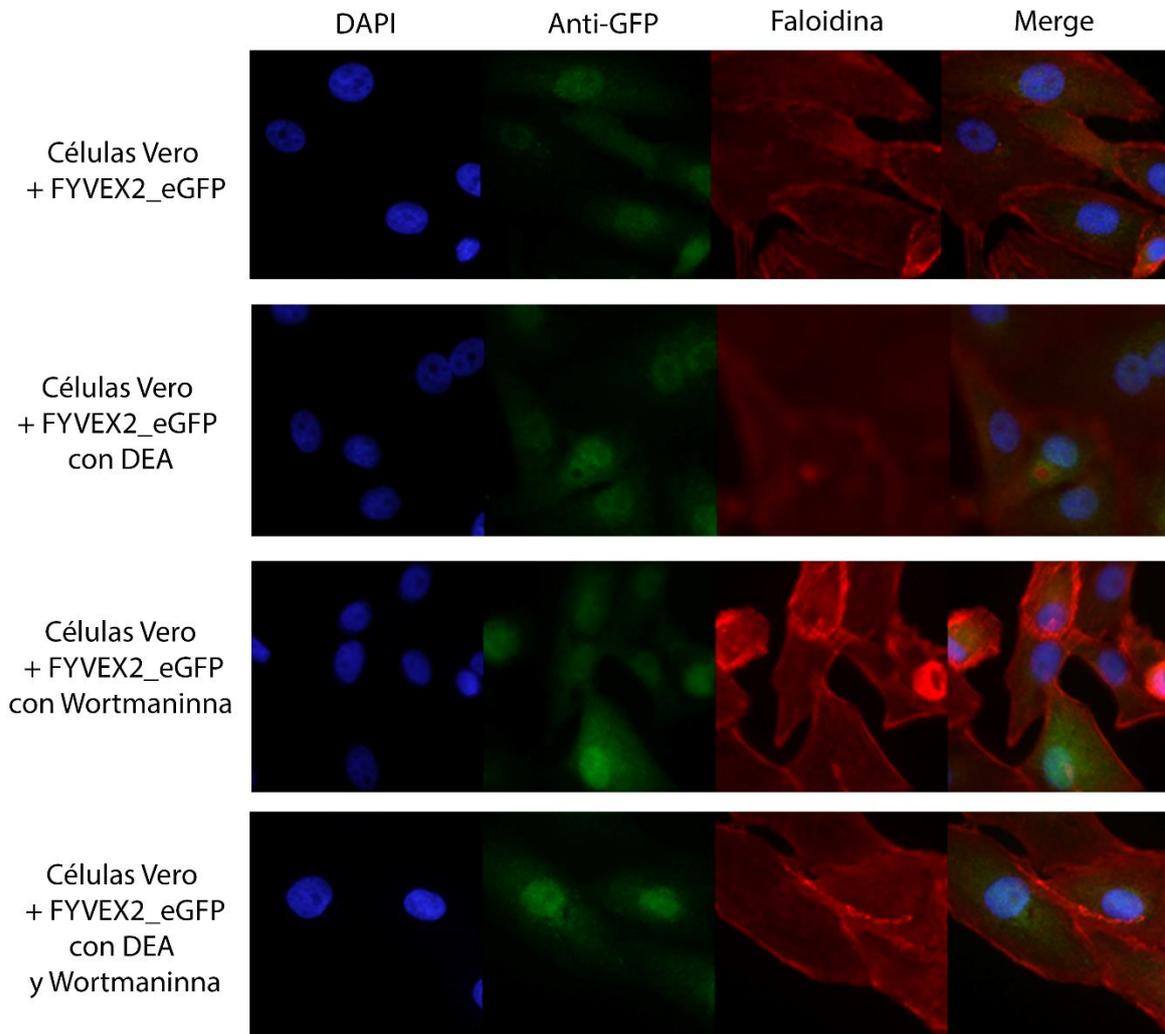


Figura 22: Evaluación y detección de la sonda FYVE_eGFP en células Vero mediante una inmunofluorescencia: Se utilizó el anticuerpo anti-GFP en ausencia de infección, en células Vero silvestres

incubadas en presencia o ausencia del inhibidor de PARG (DEA 1 μ M) o del inhibidor de PI3k (Wortmanina 100 nM). Anticuerpo anti GFP (1:1.000), anti-conejo (1:600), Faloidina (1:600) y DAPI

En ausencia de infección por *T. cruzi*, se puede observar una mayor intensidad de señal en la condición con DEA y/o Wortmanina respecto a la situación control.

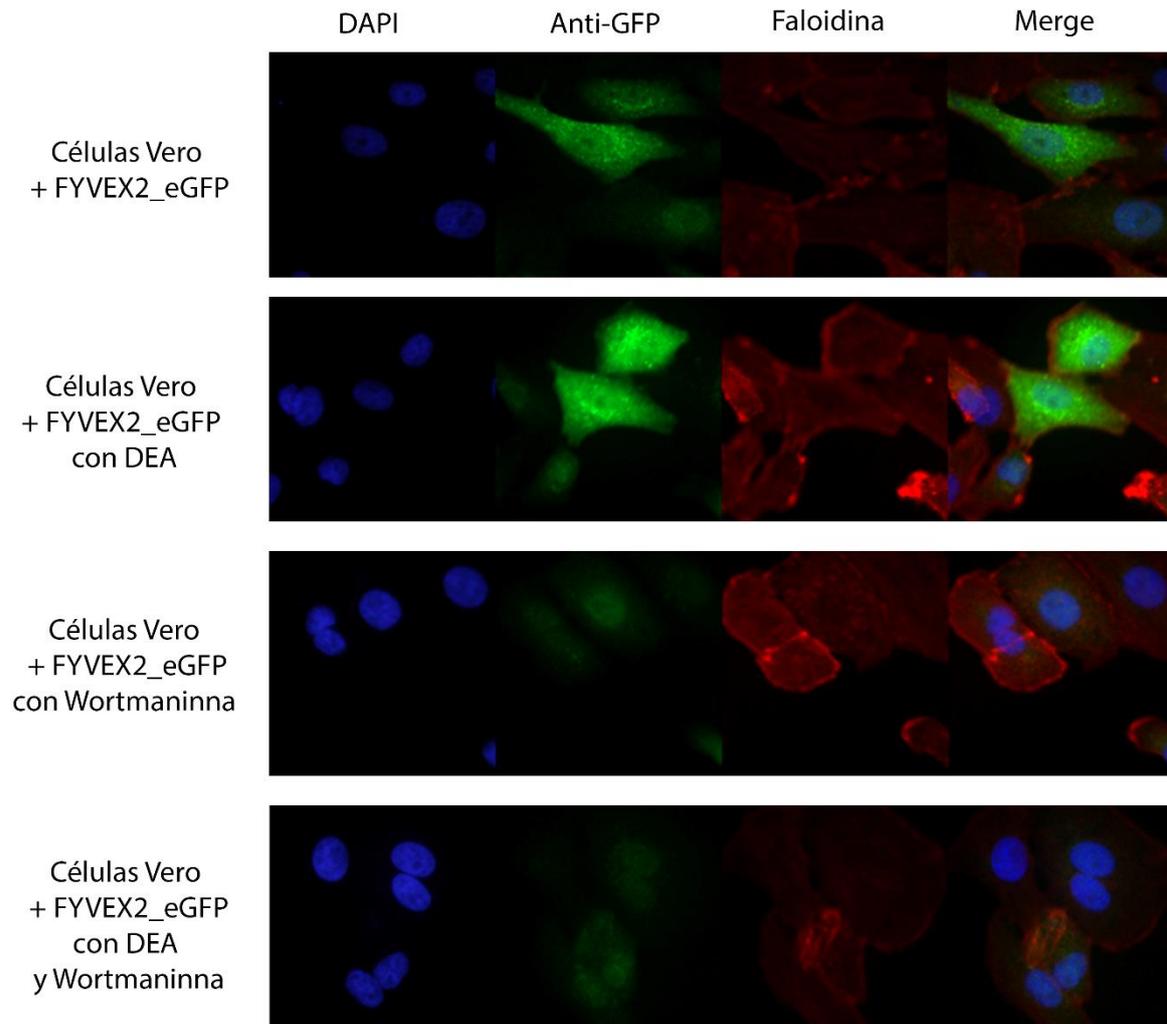


Figura 23: Evaluación y detección de la sonda FYVE_eGFP en células Vero mediante la técnica de inmunofluorescencia: Se utilizó un anticuerpo anti-GFP en presencia de la infección por *T. cruzi* (1h post-infección) en células Vero silvestres incubadas en presencia o ausencia del inhibidor de PARG (DEA 1 μ M) o del inhibidor de PI3k (Wortmanina 100 nM). Anticuerpo anti GFP (1:1.000), anti-conejo (1:600), Faloidina (1:600) y DAPI.

Ante la infección por *T. cruzi* (Figura 23), se pudo observar un marcado aumento de intensidad y localización de la sonda FYVE_eGFP tanto en ausencia como en presencia de

DEA. Sin embargo, al comparar la intensidad de señal en células Vero 1 h post-infección en presencia de DEA con las células Vero infectadas en ausencia de esta droga, no se observan diferencias. Esto sugeriría que PARG no tiene una participación fundamental en la vía independiente de lisosomas durante la infección.

También se puede observar que en presencia de Wortmanina, la infección por *T. cruzi* no conlleva a un aumento de la expresión o cambio en la localización de la sonda FYVE2x-eGFP en comparación con lo observado en ausencia de infección, suponiendo entonces que la vía PI3k/Akt cumpliría un rol importante en la formación y reclutamiento de membranas ricas en PIP3.

5.1.4.1 Evaluación de la localización de las membranas ricas en PIP3

Se utilizó el programa ImageJ para hacer un análisis de la localización subcelular de las vacuolas ricas en PIP3, reflejadas en la localización de la sonda FYV2E2x_eGFP (histograma verde) en relación a la estructura del citoesqueleto de actina detectada mediante el uso de faloidina (histograma negro) y el núcleo, teñido utilizando el colorante DAPI (histograma azul). Los histogramas relacionan las intensidades de fluorescencia en función de la distancia de una línea recta (Figura 24 A), indicando la cercanía de las partículas de PIP3 (verde) con el núcleo (azul) y límites celulares (negro) (Figura 24 B). Los histogramas de las figuras son representativos de aquellos obtenidos para células en cada condición evaluada (Figuras 25,26,27,28).

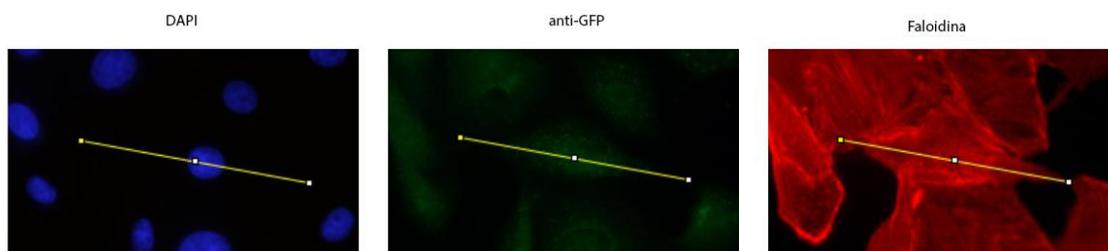


Figura 24 A: Ejemplificación del método utilizado para evaluar la localización de membranas ricas en PIP3 mediante el programa ImageJ (Células Vero Silvestres)

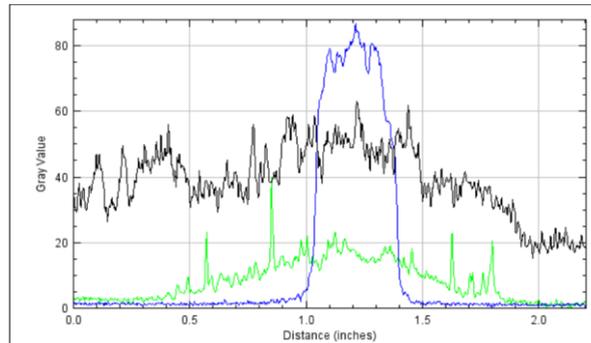


Figura 24 B: Células Vero Silvestres

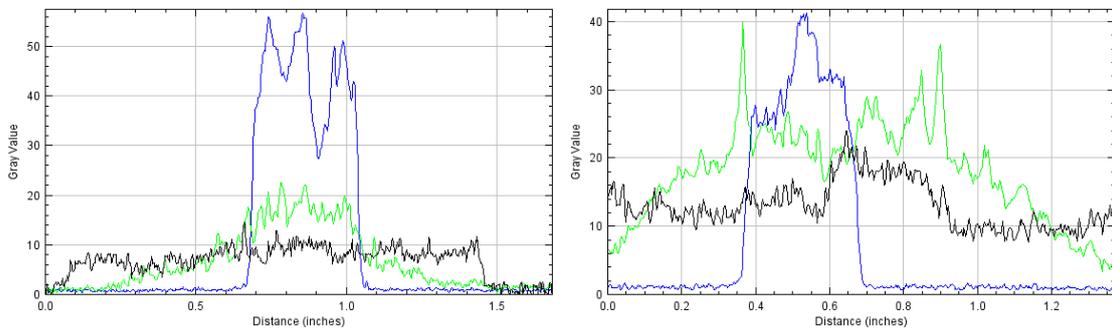


Figura 25: Histogramas correspondientes a las señales de FYVE2x_eGFP, faloidina y DAPI obtenidos a partir de imágenes de células Vero FYVE_eGFP en ausencia o presencia de infección por *T. cruzi* (1h post-infección)

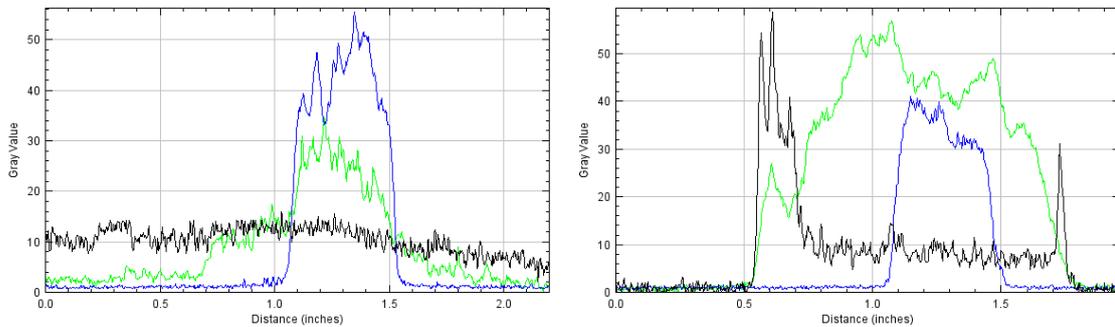


Figura 26: Histogramas correspondientes a las señales de FYVE2x_eGFP, faloidina y DAPI obtenidos a partir de imágenes de células Vero FYVE_eGFP tratadas con DEA 1 μM, en ausencia o presencia de infección por *T. cruzi* (1h post-infección).

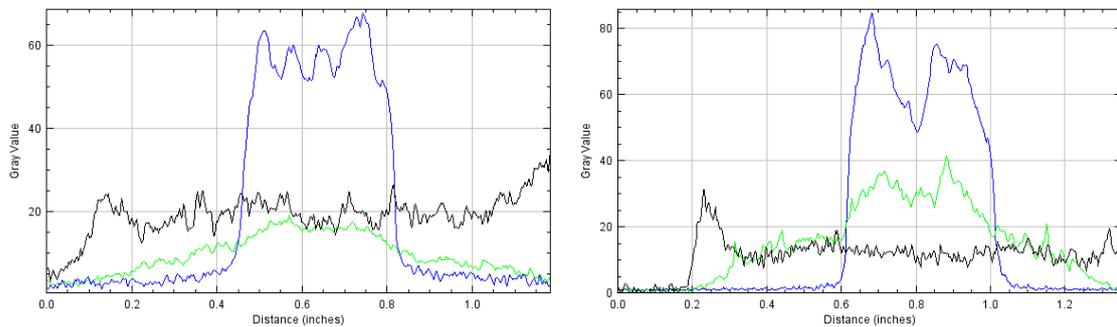


Figura 27: Histogramas correspondientes a las señales de FYVE2x_eGFP, faloidina y DAPI obtenidos a partir de imágenes de células Vero FYVE_eGFP tratadas con Wortmanina 100 nM en ausencia o presencia de infección por *T. cruzi* 1h

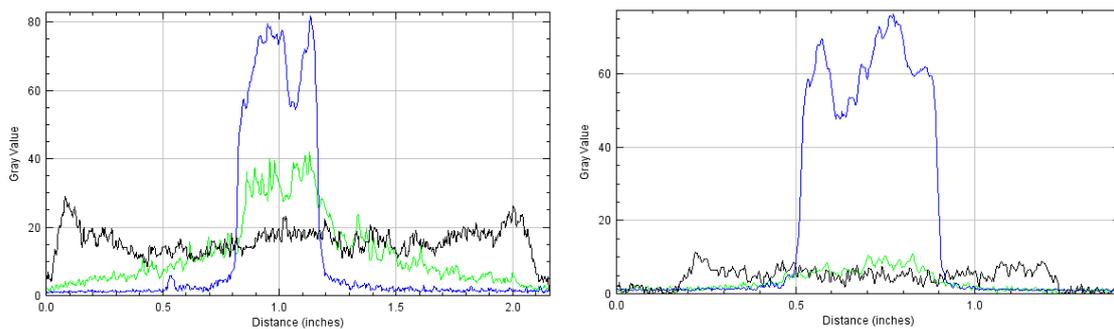


Figura 28: Histogramas correspondientes a las señales de FYVE2x_eGFP, faloidina y DAPI obtenidos a partir de imágenes de células Vero FYVE_eGFP tratadas con DEA y con Wortmanina 100 nM, en ausencia o presencia de infección por *T. cruzi* (1h post-infección).

Evaluando los histogramas obtenidos se puede observar que tanto en la condición control como en presencia de DEA (Figuras 25 y 26), ante infección por *T. cruzi* se observa un aumento de la intensidad de señal verde y una descentralización de su distribución, relocalizándose en las cercanías de los límites celulares. Por otro lado, en presencia de Wortmanina (Figura 27) se observa un histograma similar tanto en presencia de infección como en ausencia de ella, donde la señal correspondiente a la sonda FYVE2x_eGFP es menor que la observada en las otras condiciones ensayadas. Estas observaciones señalan que, como ya había sido reportado (Woolsey *et al.*, 2003), la vía PI3k/Akt es importante en la regulación de la vía de internalización de *T. cruzi* independiente de lisosomas, mientras que PARG no estaría jugando un rol de importancia ya que el resultado es similar al de la situación control.

5.2 Silenciamiento de la expresión de PARG en células Vero

La transfección del plásmido comercial shPARG, desde el cual se transcribe una horquilla de ARN diseñada para provocar la degradación de los ARN mensajeros de PARG en las células Vero, se hizo utilizando el reactivo comercial Lipofectamina 3.000, siguiendo las instrucciones y recomendaciones del protocolo brindado por la empresa.

Para la selección de las células transfectadas se utilizó el antibiótico Puromicina en una concentración final de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, agregado al medio de cultivo 24 h post-transfección. La concentración del antibiótico había sido previamente determinada mediante la realización de una curva de concentraciones de 1, 2 y 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. La concentración elegida para la posterior selección de las células Vero transfectadas fue aquella que provocó la muerte de las células silvestres 48 h tras el agregado del antibiótico.

Para verificar si el silenciamiento de PARG fue exitoso en la línea celular shPARG, se realizó un Western Blot utilizando un anticuerpo dirigido contra PARG sobre extractos de células Vero silvestres y células Vero shPARG. PARG tiene un tamaño de aproximadamente 55 kDa. Además del anticuerpo anti-PARG (ratón), se utilizó un anticuerpo anti-tubulina, (ratón) para poder normalizar la señal obtenida con el anticuerpo específico contra PARG (Figura 29). Durante la transfección en las células Vero, se utilizaron dos concentraciones del reactivo Lipofectamina 3.000 (0,75 y 1,5 μl por well), de modo de poder evaluar la eficiencia de dos concentraciones diferentes del reactivo de transfección.

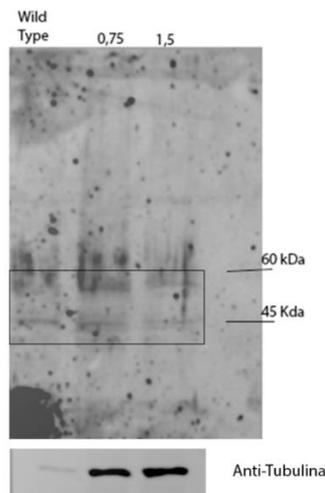


Figura 29: Detección de PARG en células Vero silvestres y células Vero silenciadas: Se realizó un Western Blot con anticuerpo anti-PARG 1:10.000 y anti-Tubulina 1:10.000, sobre extractos celulares totales obtenidos a partir de células Vero silvestres y células Vero shPARG

En la Figura 30 se observa la expresión relativa de PARG para las células silvestres en comparación con aquellas líneas obtenidas por transfección del plásmido shPARG con las dos cantidades de reactivo previamente mencionadas. En las células silenciadas con una concentración de 0,75 μ l de lipofectamina se observa una reducción de la expresión de PARG del 91,2%, mientras que las células silenciadas con una concentración de 1,5 μ l de lipofectamina tienen una señal reducida un 96,2%. Así, se pudo corroborar que el silenciamiento de PARG fue eficiente, siendo aún más notorio en la transfección utilizando 1,5 μ l de Lipofectamina.

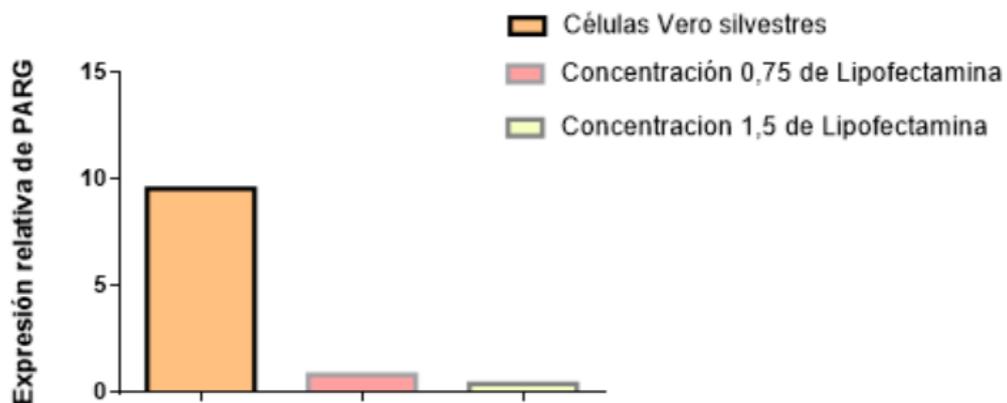


Figura 30: Expresión relativa de PARG luego de la transfección.

5.3 Vía dependiente de Lisosomas

5.3.1 Inmunofluorescencia células Vero silvestres vs células Vero silvestre + infección

La vía de internalización dependiente de lisosomas involucra el reclutamiento de estas organelas a la periferia celular para interactuar con la TcPV naciente. Para corroborar si lo descrito en trabajos ya publicados también ocurre en nuestro modelo de infección, se realizó una inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo dirigido contra LAMP-1, un marcador de lisosomas, con el fin de observar el reclutamiento y formación de lisosomas durante la infección. Para ello, se comparó la presencia y distribución de este marcador en células Vero silvestres en ausencia o luego de 1h de infección (Figura 31).

Células Vero silvestres (10.000/pocillo) fueron cultivadas en un multi-well de 24 pocillos siguiendo el protocolo explicado en la sección materiales y métodos. Tras 24 h de incubación,

se realizó una infección durante 1h. Luego de la fijación y los lavados, se incubaron las muestras en presencia de anticuerpo primario anti-LAMP1 (un marcador lisosomal) y un anticuerpo dirigido contra *T. cruzi*. Posteriormente, se incubaron las muestras con el anticuerpo secundario correspondiente (anti-conejo para el anticuerpo Anti-LAMP1 y anti-ratón para el anticuerpo Anti- *T. cruzi*) y se realizó una contratinción con DAPI.

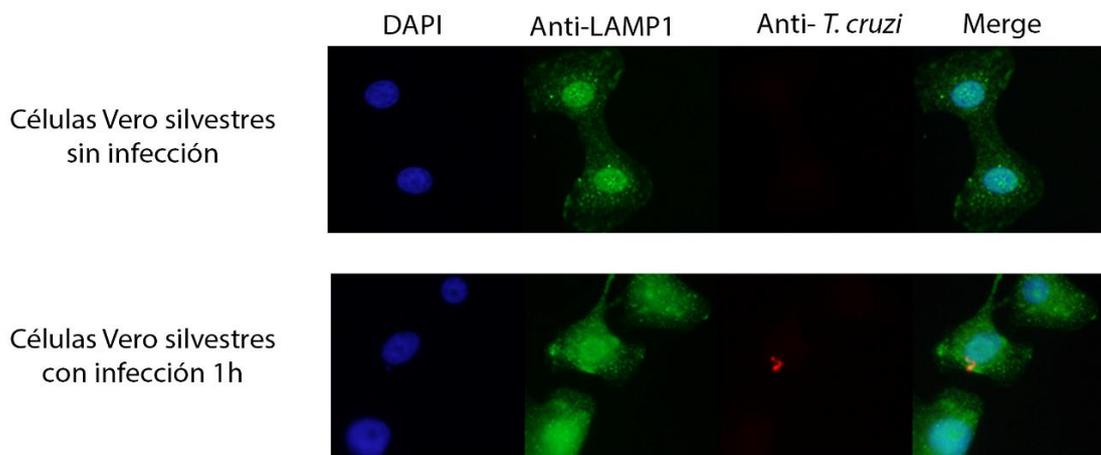


Figura 31: Evaluación del reclutamiento de lisosomas a la periferia celular: Se realizó una inmunofluorescencia en células Vero silvestres en presencia o ausencia de infección utilizando un anticuerpo Anti-LAMP1 1:250 (verde) y Anti- *T.cruzi* 1:1.000 (rojo).

Los resultados obtenidos mostraron que, de forma similar a lo que se observó en otros modelos (Andrade and Andrews, 2004), en presencia de la infección celular por *T. cruzi* los niveles de LAMP-1 aumentan.

5.3.2 Evaluación del reclutamiento de lisosomas a la periferia celular en distintas condiciones

Una vez corroborado el aumento de la señal de la proteína LAMP-1 durante las primeras etapas de la invasión celular, se procedió a evaluar el posible rol de PARG y la vía PI3k/Akt en el comportamiento de este marcado lisosomal. Para ellos, se evaluó la abundancia y la localización de LAMP-1 en las siguientes condiciones:

- Células Vero silvestres (Sin anticuerpo primario)
- Células Vero silvestres en presencia o ausencia de infección

- Células Vero silvestres + DEA 1µM en presencia o ausencia de infección
- Células Vero silvestres + Wortmanina 100 nM en presencia o ausencia de infección
- Células Vero silvestres + DEA 1µM + Wortmanina 100 nM en presencia o ausencia de infección
- Células shPARG en presencia o ausencia de infección

Los resultados que muestran las variaciones de la expresión y localización de LAMP-1 en las distintas condiciones ensayadas se muestran en las Figuras 32, 33 y 34. Tomando como control la figura 31.

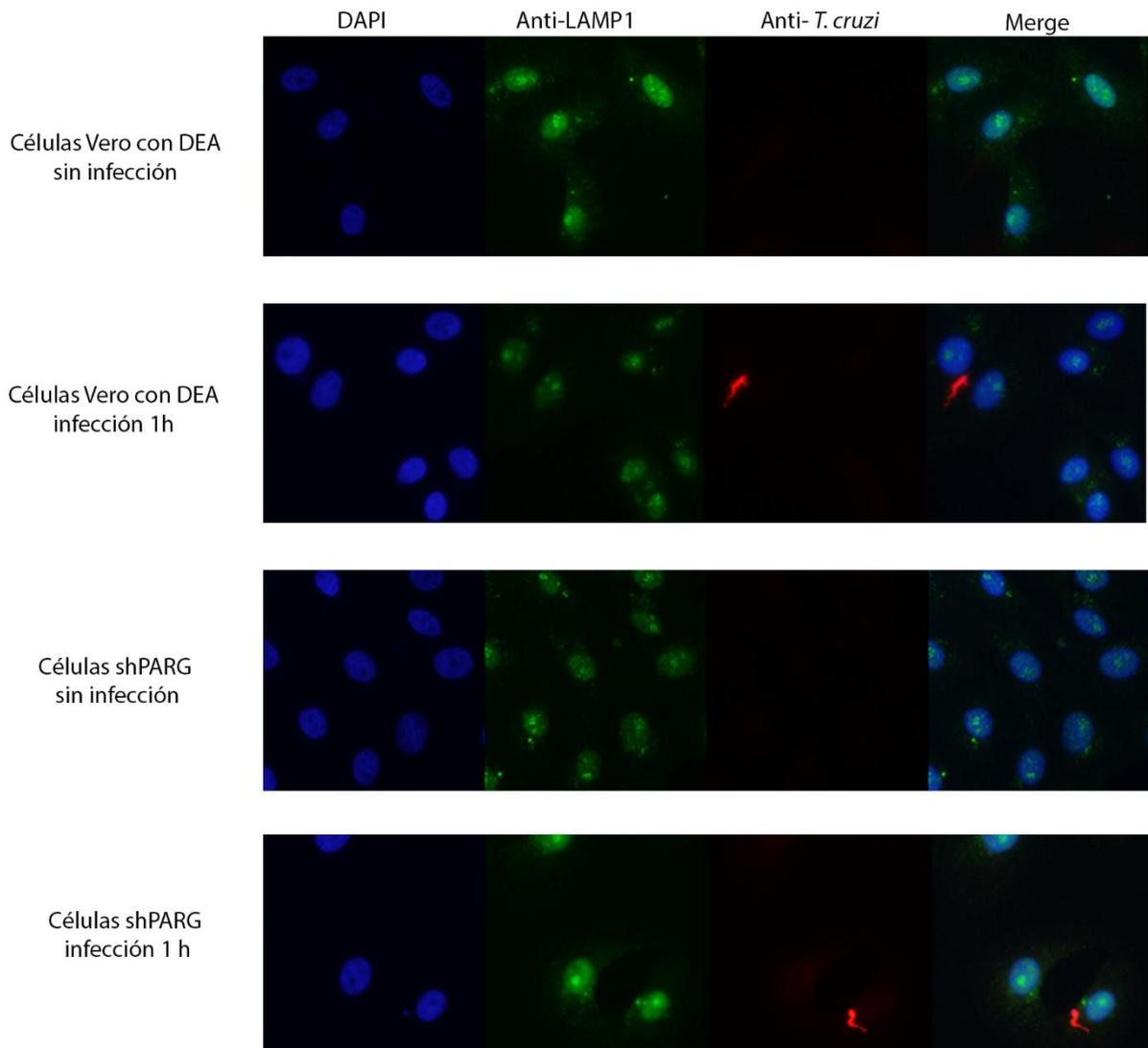


Figura 32: Evaluación del reclutamiento de lisosomas a la periferia celular en ausencia de la proteína PARG: Se realizó una inmunofluorescencia tanto en células Vero silvestres (incubadas en presencia de

DEA 1µM) como en células shPARG, es decir en condición de inhibición y/o silenciamiento de la proteína PARG, en presencia o ausencia de infección. Se utilizaron anticuerpos Anti-LAMP1 1:250 y Anti- *T. cruzi* 1:1.000

Los resultados muestran una notable disminución de la señal de LAMP-1 durante la infección bajo condiciones de inhibición o silenciamiento de la proteína PARG con respecto a la situación control de células Vero silvestres, como se puede evidenciar en la figura 32. Esto supondría una relación entre PARG y la vía dependiente de lisosomas, dado que en ausencia de actividad de la proteína (ya sea por inhibición o silenciamiento) la señal de marcación lisosomal disminuye notablemente.

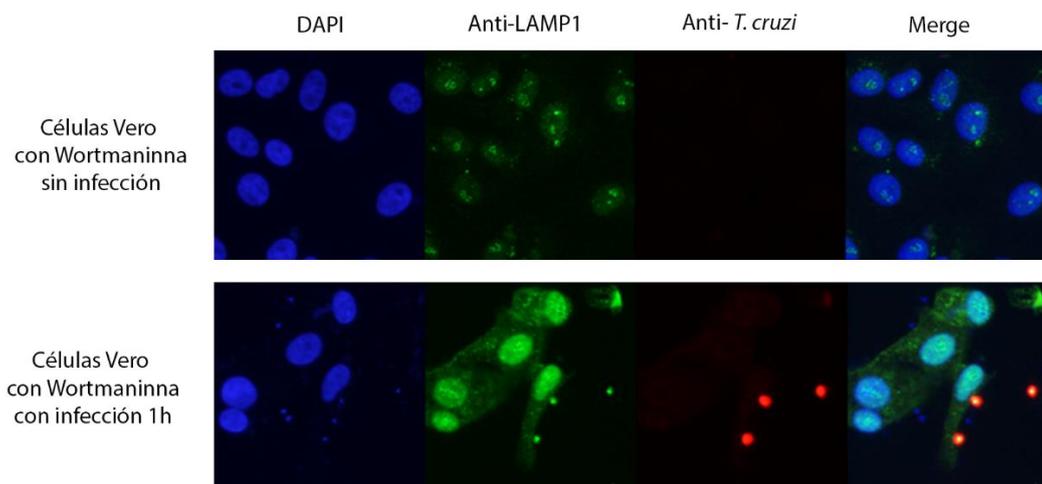


Figura 33: Evaluación del reclutamiento de lisosomas a la periferia celular en condiciones de inhibición de la vía PI3k/Akt: Se realizó una inmunofluorescencia en células Vero silvestres incubadas con Wortmanina 100 nM. Se utilizaron anticuerpos Anti-LAMP1 1:250 y Anti- *T. cruzi* 1:1.000

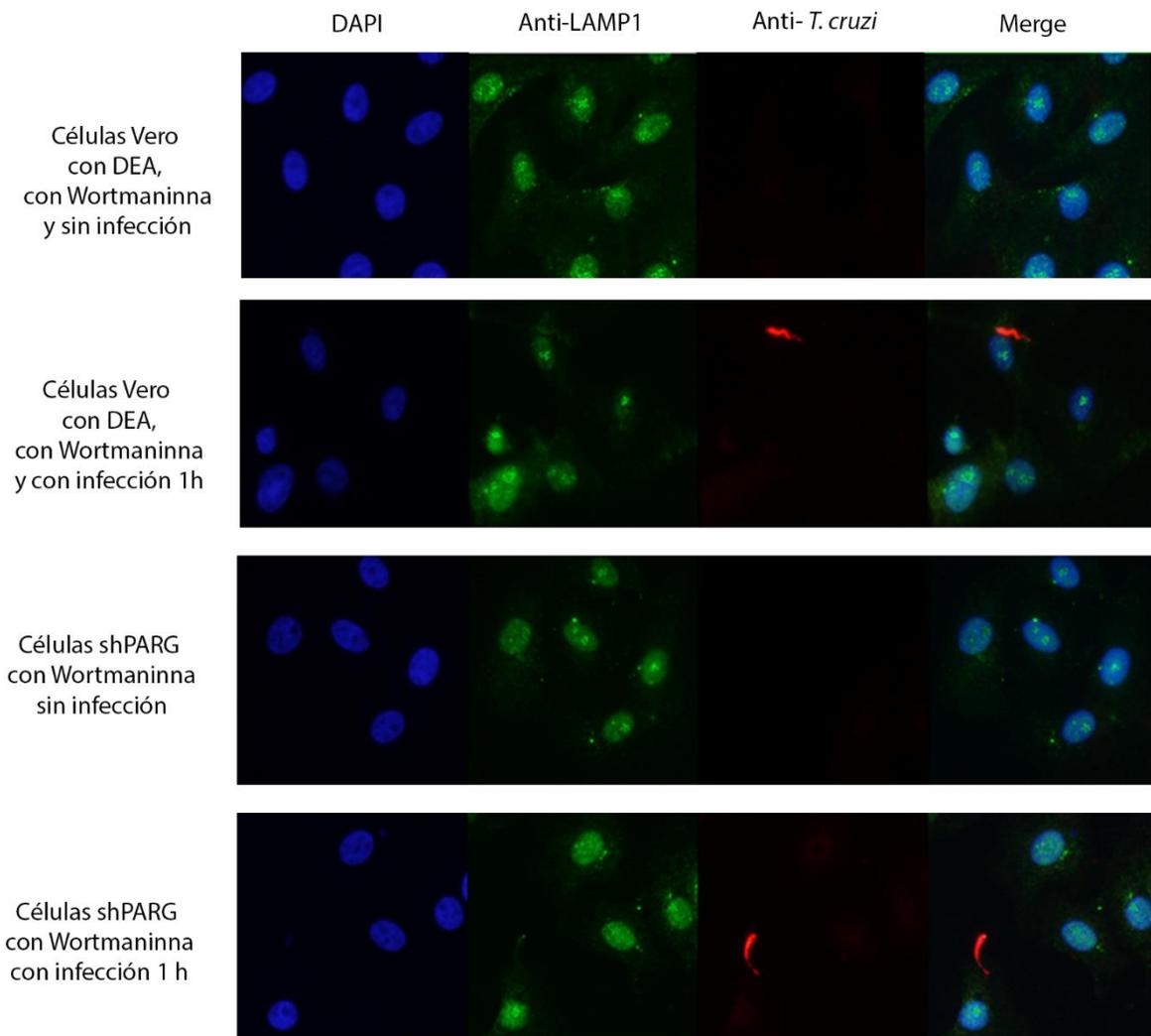


Figura 34: Evaluación del reclutamiento de lisosomas a la periferia celular en condiciones de inhibición de la vía PI3k/Akt y en ausencia de PARG: Se realizó una inmunofluorescencia sobre células Vero silvestres incubadas con DEA 1µM y células shPARG, ambas incubadas con Wortmanina 100 nM, en presencia o ausencia de infección por *T. cruzi*. Se utilizaron anticuerpos Anti-LAMP1 1:250 y Anti- *T. cruzi* 1:1.000

Por otro lado, como se observa en la figura 33, no se evidenciaría una relación entre la formación de lisosomas y la vía de señalización PI3k/Akt, ya que el aumento de intensidad de LAMP-1 luego de la infección es similar y se repite tanto en situaciones control (Figura 31) como en presencia de Wortmanina. Estos resultados sugieren que la vía de señalización PI3k/Akt no sería fundamental para que la formación de lisosomas se lleve a cabo. Por último, en presencia del inhibidor de la vía de señalización PI3k/Akt y el inhibidor de PARG, la señal correspondiente a LAMP-1 (Figura 34) se asemeja a la observada en células en las que solo PARG se encontraba inhibida o silenciada (Figura 32). Esto confirmaría el rol necesario de

PARG para una correcta invasión de *T. cruzi* a la célula hospedadora mediante la vía de invasión dependiente de lisosomas.

5.4 Vía autofágica

5.4.1 Evaluación de los niveles de infección mediante ensayo β -Galactosidasa

La vía autofágica es un mecanismo de internalización de *T. cruzi* recientemente descrito, el cual involucra la participación de vesículas con marcadores típicos de autofagosomas, especialmente en condiciones de hambre celular (Romano *et al.*, 2009). A fin de evaluar si PARG participa en la regulación de esta vía, se estudiaron los niveles de infección en células Vero en condiciones control o de estrés nutricional (hambre), en presencia o ausencia del inhibidor de PARG o de la vía PI3k/Akt y en las células shPARG. Los resultados obtenidos se observan en la Figura 35.

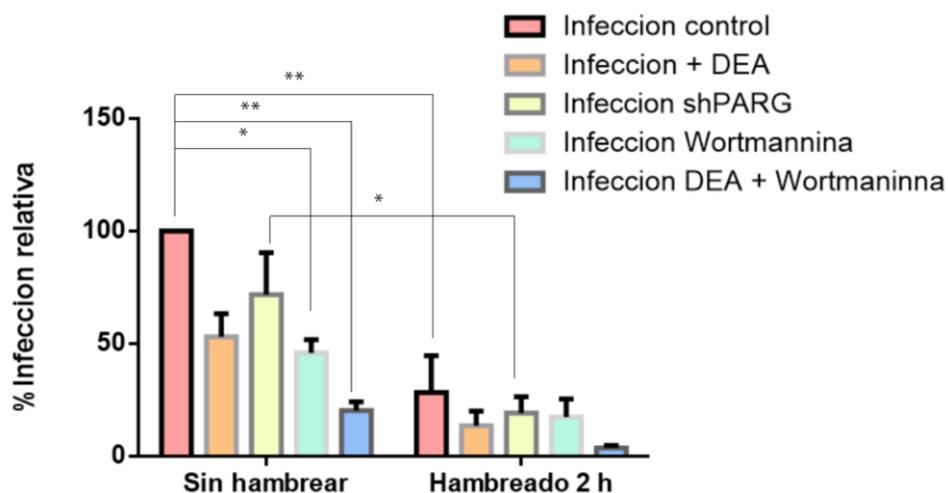


Figura 35: Niveles relativos de infección bajo distintas condiciones determinados utilizando la cepa Tulahuen β -gal: Los resultados fueron analizados utilizando el programa GraphPad mediante un ANOVA de dos vías. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$. Se realizaron tres ensayos independientes, en cada uno de ellos cada condición fue evaluada por triplicado.

La inhibición de PARG o su silenciamiento provocan una marcada disminución de la infección en comparación con las células silvestres en ausencia de estas drogas. Esto corrobora los datos previamente publicados (Vilchez Larrea *et al.*, 2013), y además indica que PARG jugaría un rol fundamental durante la etapa de la invasión, ya que se observa una disminución de la infección incluso cuando se aplican tiempos cortos de incubación de las células Vero en presencia de los tripomastigotes que los utilizados previamente por dichos autores.

Como se observa en la Figura 35, en situación de estrés nutricional los niveles de infección disminuyen un 71,7% en comparación con la condición control en medio de cultivo completo. Además, también se observó una disminución significativa entre la condición control y el estrés nutricional en presencia de DEA y ante el silenciamiento de PARG, aunque solo la diferencia correspondiente a este segundo caso resultó estadísticamente significativa (disminuyendo un 52% el nivel de infección luego de la situación de hambreado). Los resultados obtenidos en presencia de Wortmanina en condiciones fisiológicas corroboran la intervención de la vía PI3K/Akt en la invasión celular por el parásito.

5.4.2 Ensayo viabilidad (Alamar Blue)

Para evaluar si la viabilidad de las células Vero era afectada por el período de hambreado al que fueron sometidas, se realizó el ensayo de Alamar Blue (Figura 36). De este modo, se apuntaba a evaluar si las diferencias en los niveles de infección observadas mediante el ensayo de actividad β -Gal reflejaban efectivamente una disminución del éxito de la infección o si, en cambio, podían deberse a un aumento de la muerte de la célula hospedadora.

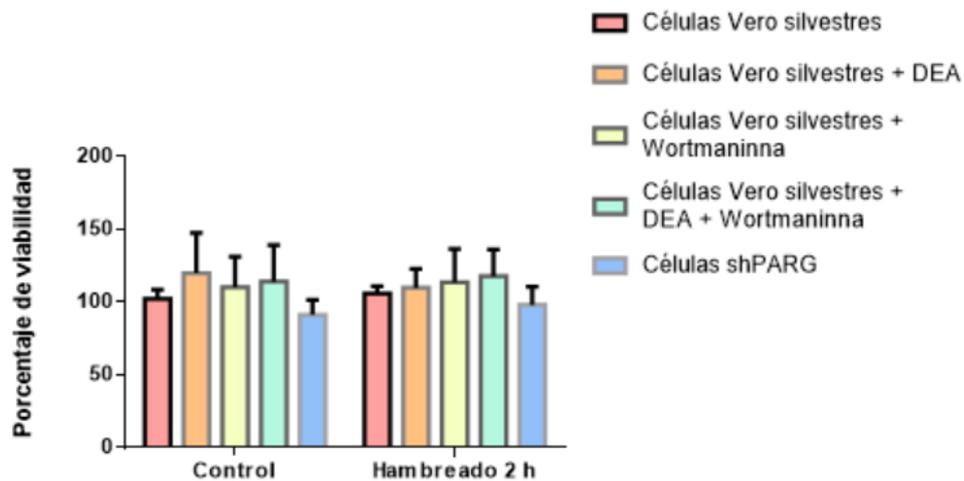


Figura 36: Porcentaje de viabilidad de las células medido por la técnica de Alamar Blue. Los resultados fueron analizados utilizando el programa GraphPad mediante un ANOVA de dos vías, no hallándose diferencias significativas. Se realizaron tres ensayos independientes, en cada uno de ellos cada condición fue evaluada por triplicado.

No se encontraron diferencias significativas entre las condiciones de hambreado y condiciones control, indicando que la viabilidad de las células no se ve afectada durante el proceso de inducción del hambreado y que, por lo tanto, la disminución de los niveles de

infección anteriormente medidos (Figura 35) efectivamente estaban relacionados con una disminución en el éxito de la infección por *T. cruzi* en nuestro modelo.

5.4.3 Detección de autofagosomas en células infectadas

Romano y colaboradores reportaron que las vacuolas parasitóforas se podían encontrar decoradas por marcadores autofágicos (Romano *et al.*, 2009). Se evaluó mediante una inmunofluorescencia, entonces, el posible rol de PARG en dicho proceso. Para ello, se utilizó un anticuerpo de conejo anti-LC3/Atg8 (marcador de autofagosomas) y antisuero contra *Trypanosoma cruzi*, proveniente de un ratón. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron ambos en dilución 1:600. Las muestras fueron tomadas luego de 2h, para inducir el proceso de autofagia, por incubación en solución de Earle's y de 1h de infección según la condición correspondiente:

- Control células Vero silvestres en condiciones control en presencia o ausencia de infección
- Células Vero silvestres ante estrés nutricional en presencia o ausencia de infección
- Células Vero silvestres con DEA 1 μ M, en condiciones control en presencia o ausencia de infección
- Células Vero silvestres con DEA 1 μ M, ante estrés nutricional en presencia o ausencia de infección
- Células Vero silvestres con Wortmanina 100 nM, en condiciones control en presencia o ausencia de infección
- Células Vero silvestres con Wortmanina 100 nM, ante estrés nutricional en presencia o ausencia de infección
- Células Vero silvestres con DEA 1 μ M, con Wortmanina 100 nM, en condiciones control en presencia o ausencia de infección
- Células Vero silvestres con DEA 1 μ M, con Wortmanina 100 nM, ante estrés nutricional en presencia o ausencia de infección
- Células shPARG en condiciones control en presencia o ausencia de infección
- Células shPARG ante estrés nutricional en presencia o ausencia de infección

Se detectaron los autofagosomas en cada condición mencionada mediante la señal del anticuerpo Anti-LC3 (Figuras 37,38,39 y 40).

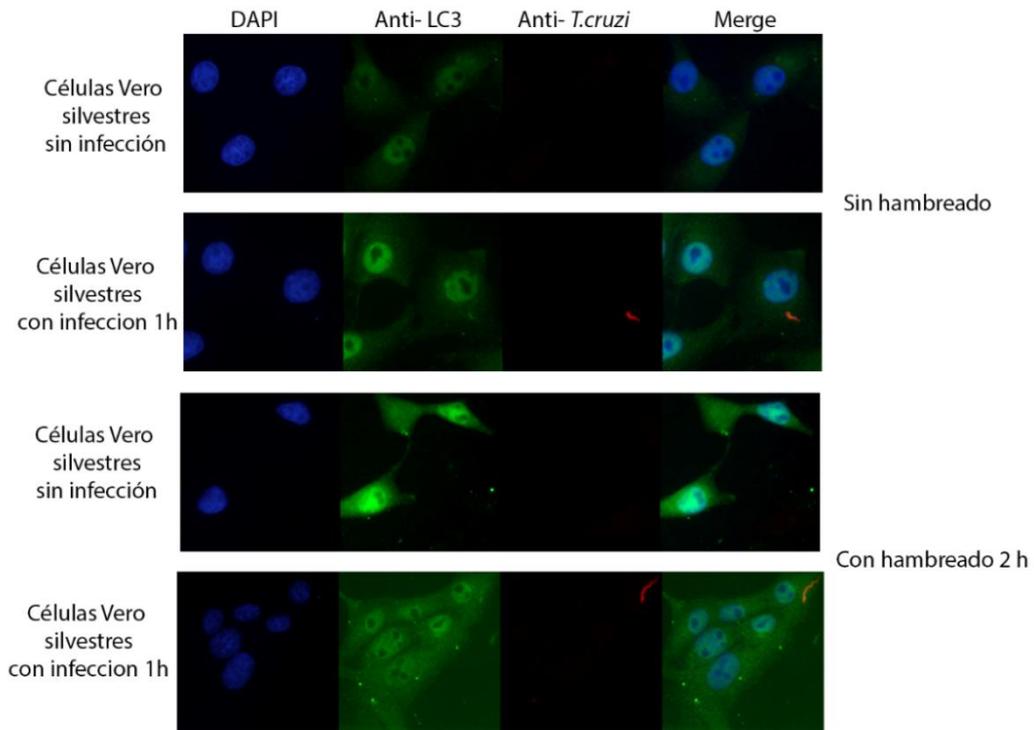


Figura 37: Detección de autofagosomas en células Vero: Se realizó una inmunofluorescencia en células Vero silvestres con y sin infección bajo condiciones control y hambreado de 2h. Se utilizaron los anticuerpos Anti-LC3 1:200 y Anti- *T. cruzi* 1:1.000

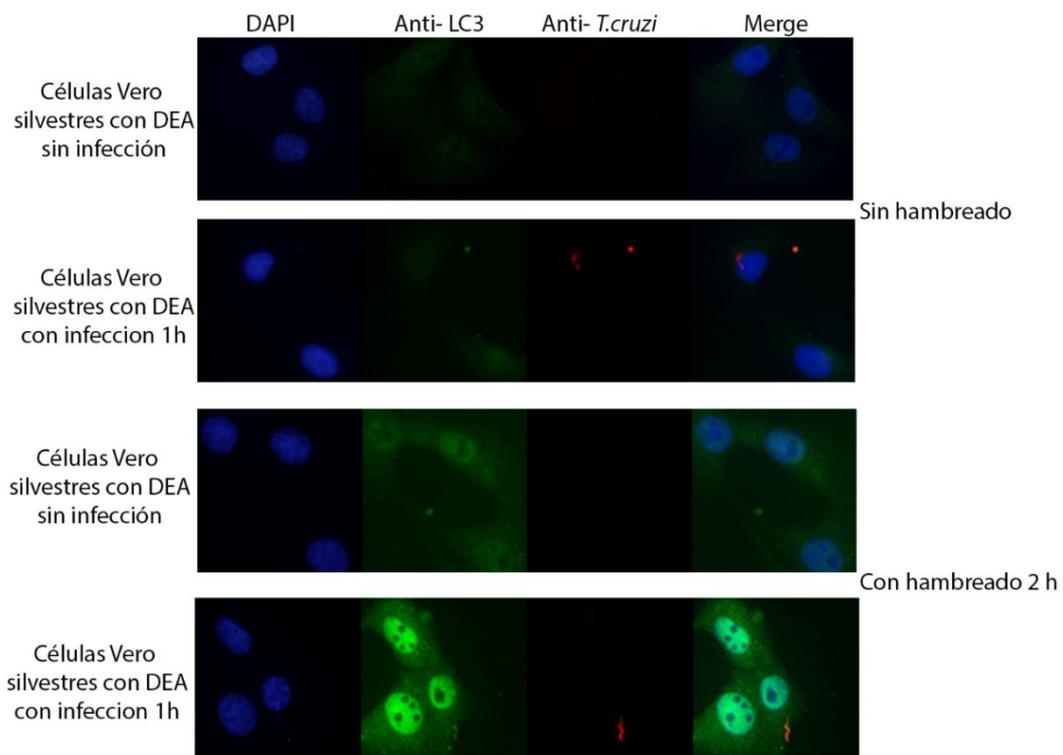
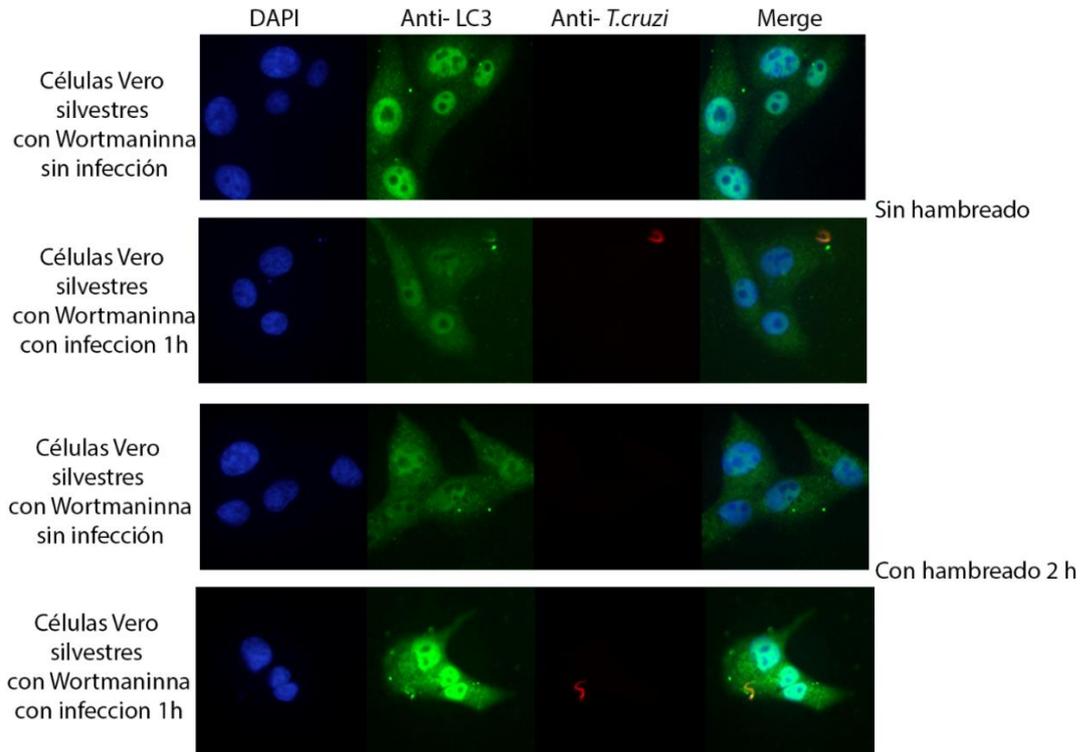


Figura 38: Detección de autofagosomas en células Vero con DEA 1µM: Se realizó una inmunofluorescencia en células Vero silvestres con DEA 1µM, con y sin infección bajo condiciones control y hambreado de 2h. Se utilizaron anticuerposS Anti-LC3 1:200 y Anti- *T. cruzi* 1:1.000



Figura

39: Detección de autofagosomas en células Vero incubadas con Wortmanina: Se realizó una inmunofluorescencia en células Vero silvestres con Wortmanina, con y sin infección bajo condiciones control y hambreado de 2h. Se utilizaron anticuerpos Anti-LC3 1:200 y Anti- *T. cruzi* 1:1.000

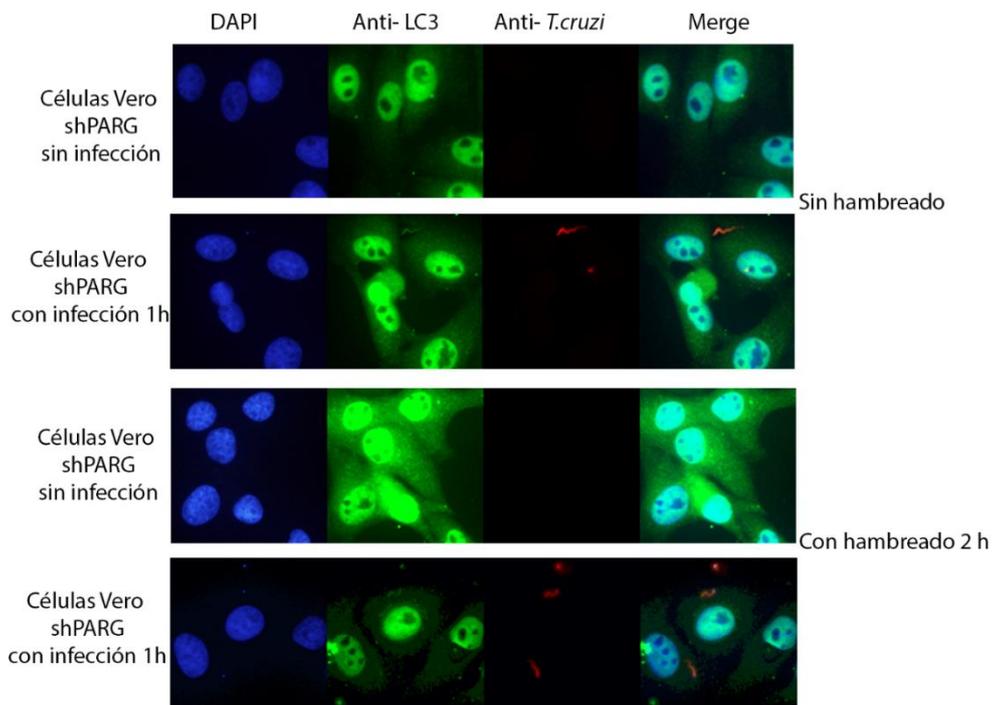


Figura 40: Detección de autofagosomas en células shPARG: Se realizó una inmunofluorescencia en células Vero shPARG con y sin infección bajo condiciones control y hambreado de 2h. Se utilizaron anticuerpos Anti-LC3 1:200 y Anti- *T. cruzi* 1:1.000

En la figura 37 se puede observar con claridad como aumenta la intensidad de la señal correspondiente a LC3 ante estrés nutricional y, este aumento es aún mayor cuando las células bajo esta condición también son sometidas a la infección por *T. cruzi*. Además, se observan cambios en su localización ante la infección en condiciones de estrés nutricional, mostrando una distribución más dispersa en la célula.

Ante la inhibición de PARG en presencia de la droga DEA (Figura 38) también se observa un comportamiento similar al control (Figura 37), donde se verifica un aumento de intensidad de LC3 ante el hambreado y la infección. Sin embargo, al silenciar a PARG (Figura 40), el comportamiento es distinto al observado en presencia de DEA.

El silenciamiento de PARG induce la formación de autofagosomas en todas las condiciones ensayadas respecto al control en condiciones fisiológicas, mostrando una señal exacerbada mayoritariamente en la condición de hambreado en ausencia de infección.

Por último, se evaluó la posible relación de la formación de autofagosomas con la vía de señalización PI3k/Akt (Figura 39). Es interesante destacar que la señal de LC3 en presencia del inhibidor Wortmanina es mayor a la observada en la situación control en las condiciones evaluadas (Figura 37). Esto nos llevaría a pensar una posible relación entre la formación de autofagosomas con la vía PI3k/Akt. Por otro lado, la intensidad de señal pareciera aumentar en la situación de infección y hambreado con respecto a las otras condiciones bajo Wortmanina, pero dicho aumento podría deberse a un efecto visual debido a los núcleos con señal exacerbada, ya que la intensidad en la periferia celular es similar en todas las condiciones, como luego se demostró al realizar la cuantificación de LC3/Célula (figura 41).

5.4.3.1 Cuantificación de las partículas de LC3

Para comparar la formación de autofagosomas, se realizó una cuantificación de las partículas de LC3 en las distintas condiciones (Figuras 37,38,39,40) a través del programa ImageJ, utilizando la herramienta “Analyze particles” ajustando los parámetros a 0-10.000 píxeles en cada una de las imágenes para considerarlos partículas de LC3, obteniendo el resultado observado en la Figura 41.

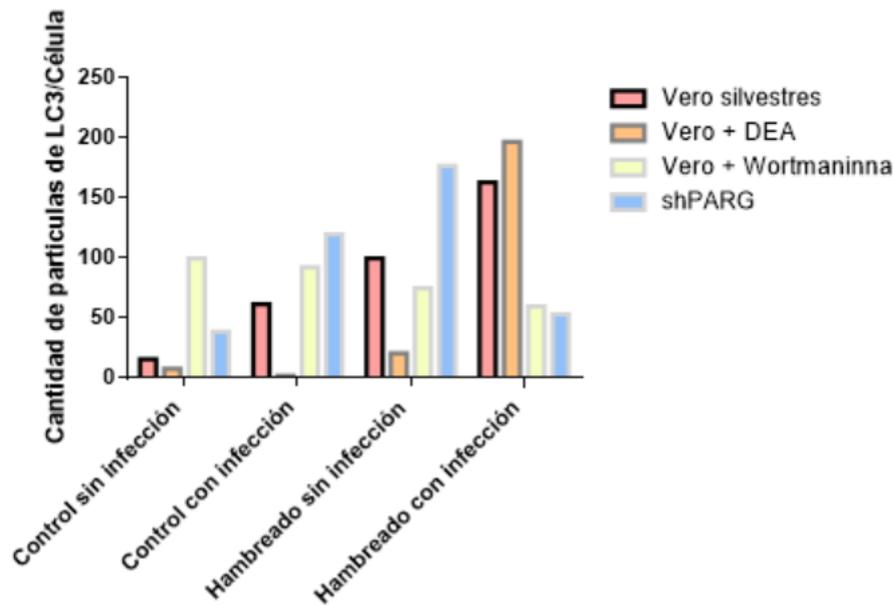


Figura 41: Cuantificación de LC3/célula

La cuantificación realizada muestra, en la figura 41, un aumento del número de vesículas ricas en LC3/célula en las células Vero silvestres en condiciones de estrés nutricional o ante la infección por *T. cruzi*. Además, se observa que la cantidad de estas vesículas es mayor cuando ambos tratamientos son realizados de manera concomitante. Ante la incubación de las células en presencia del inhibidor DEA, estos resultados iniciales indican que no hay un aumento de la formación de autofagosomas cuando se somete a la monocapa celular a condiciones de hambreado o de infección por separado en comparación con el control, pero cuando ambos estrés de aplican de manera concomitantes (hambreado e infección por *T. cruzi*), hay un aumento marcado de la cantidad de vesículas LC3 positivas. El mecanismo detrás de esta particular respuesta debe ser estudiado. En el caso de la línea celular shPARG, como se mencionó anteriormente, se observan resultados distintos a los obtenidos para la inhibición química de PARG, donde en primer lugar se observa un aumento de partículas en todas las situaciones con respecto al control en condición nutricional fisiológica. En condiciones de hambreado e infección las células muestran una disminución de vesículas autofágicas tanto respecto a las células sin infectar en igual condición nutricional, como respecto a las infectadas sin hambrear. Este último resultado podría relacionarse con el obtenido en la figura 35 donde se observa una diferencia significativa de los niveles de infección en dicha condición respecto

a su control sin hambrear. Sin embargo la diferencia respecto a su control en condición de hambreado es semejante a la observada en medio de cultivo completo, como ya se discutió, por lo que ambas observaciones no pueden correlacionarse. Con respecto a las células con Wortmanina, se ve un aumento de partículas/célula en todas las condiciones con respecto al control en condiciones fisiológicas, y también se ve una leve disminución en la situación de hambreado e infección. Los mecanismos biológicos detrás de esta respuesta aún no han sido develados por lo que es necesario evaluar esta respuesta con mayor profundidad en el futuro.

Es importante mencionar que el experimento recién descrito, que se observa en la figura 41, pudo realizarse en una sola oportunidad dentro del marco del trabajo de tesina, por lo cual los resultados deben ser tomados con cautela y el ensayo debe ser repetido en el futuro a fin de poder obtener confirmar o refutar las observaciones inicialmente realizadas.

6 CONCLUSIONES

De acuerdo a la hipótesis planteada durante este trabajo basada en información obtenida por nuestro grupo y otros laboratorios, PARG podría cumplir un rol fundamental en la correcta infección de la célula hospedadora por *Trypanosoma cruzi*, activando la vía de señalización de PI3k/Akt y regulando de manera indirecta las distintas vías de invasión no fagocíticas que utiliza el parásito. A fin de evaluar esto se propuso a caracterizar el rol de dicha proteína durante la infección y de evaluar su relación con las vías mencionadas. Para esto, se realizaron diversos experimentos para evaluar cambios en los mecanismos clásicos de las distintas vías de invasión bajo condiciones de inhibición o silenciamiento de PARG y/o inhibición de la vía PI3k/Akt.

6.1 Vía independiente de lisosomas

Para evaluar el rol de PARG en la vía de invasión independiente de lisosomas, y también para relacionarla con la vía PI3k/Akt, se llevaron a cabo distintas inmunofluorescencias siguiendo la formación y localización de vacuolas ricas en PIP3 bajo distintas condiciones.

Se pudo observar, en primer lugar, que tras 1h de infección, la presencia de vacuolas ricas en PIP3 aumenta en comparación con lo observado en ausencia de infección, reflejándose en una mayor intensidad de fluorescencia verde correspondiente a la sonda FYVEx2_eGFP (que interacciona con membranas ricas en PIP3). Este resultado corroboró los datos de la bibliografía y los antecedentes (Woolsey *et al.*, 2003).

Ante la inhibición de PARG por DEA 1 μ M, no se pudieron observar cambios con respecto a los resultados obtenidos en ausencia de esta droga. Esto indicaría que PARG no sería fundamental para la formación y reclutamiento normal de las vacuolas ricas en PIP3, permitiendo que las primeras etapas de la invasión por esta vía procedan de manera efectiva. Los resultados analizados en estas condiciones indicarían, entonces, que no habría una relación entre la actividad PARG y la vía independiente de lisosomas en la invasión celular por el parásito.

Por último, al inhibir la vía de señalización PI3k/Akt mediante el uso del inhibidor comercial Wortmanina, si pudieron notarse diferencias con respecto a la línea celular incubada en ausencia del inhibidor. La intensidad de PIP3 disminuyó marcadamente, indicando, entonces, que la activación de la vía mencionada podría ser un punto fundamental para la formación de las vacuolas ricas en PIP3 y, por ende, para una infección exitosa mediante esta

vía independiente de lisosomas, como lo demuestran los resultados de infección en presencia de dicho inhibidor. La inhibición conjunta de PARG y la vía PI3k/Akt no modifica el resultado observado cuando solo se inhibe la vía de señalización mediante el uso de Wortmanina.

La evaluación de la localización de las vacuolas ricas en PIP3 mostró un patrón similar en presencia o ausencia del inhibidor de PARG, tanto ante la infección por *T. cruzi* como en condiciones control. Ante la infección por *T. cruzi*, se observa que la señal correspondiente a la sonda FYVE2x_eGFP se desplaza hacia la periferia celular, demostrando cierto reclutamiento hacia las membranas. Por otro lado, en ausencia de infección, la señal correspondiente a esta sonda se localiza con intensidad alta en la periferia del núcleo y baja en los límites celulares externos. En cambio, en presencia de Wortmanina, la intensidad correspondiente a la señal de la sonda FYVE2x_eGFP disminuye y se ubica más cercana al centro celular tanto en presencia como ausencia de la infección. Esto indica que existiría un movimiento de PIP3 a la membrana celular durante la infección de *T. cruzi*, el cual es alterado ante la inhibición de la vía PI3k/Akt.

6.2 Vía dependiente de lisosomas

Tal como estaba descripto en trabajos ya publicados (Andrade and Andrews, 2004), luego de la infección en células Vero silvestres se observó un aumento en la intensidad correspondiente a LAMP-1, el marcador lisosomal, indicando una mayor formación de lisosomas frente a la infección.

Sin embargo, la ausencia de actividad de PARG (ya sea por inhibición con DEA o por el silenciamiento de la línea celular shPARG) mostró un resultado diferente a las situaciones control mencionadas anteriormente, con una intensidad de la señal correspondiente a LAMP-1 considerablemente menor luego de una infección de 1 h. Este resultado sugeriría que PARG es importante y necesaria para la formación y reclutamiento de lisosomas y, por ende, para una infección exitosa a través de la vía dependiente de lisosomas.

Cuando la vía de señalización PI3k/Akt fue inhibida, mediante el uso de Wortmanina 100 nM, los resultados fueron similares a los observados en ausencia de esta droga: un aumento de la intensidad de LAMP-1 bajo condición de infección. Esto indicaría que la vía PI3k/Akt no es

fundamental para la correcta función lisosomal, por lo cual la vía dependiente de lisosomal no estaría afectada o solo lo estaría de manera parcial.

Por último, al estudiar células donde PARG fue inhibida o silenciada y en las que, al mismo tiempo, la vía PI3k/Akt fue inhibida por Wortmanina, se observó un resultado similar al que arrojó la inmunofluorescencia de las células Vero incubadas con DEA o shPARG en ausencia de Wortmanina.

De los resultados analizados en esta vía de invasión celular se podría llegar a concluir que aunque PARG está relacionada con la formación de lisosomas, no estaría actuando por medio de la vía PI3k/Akt para disminuir la formación o reclutamiento de lisosomas, que intervienen en la entrada del parásito a la célula.

El mecanismo por el cual está relacionada la actividad PARG con la formación de lisosomas es un tema para continuar estudiando.

6.3 Vía autofágica

Los resultados de evaluación de nivel de infección *in vitro* mostraron ser diferentes entre la situación de hambreado y la situación en condiciones control. Una vez analizados estadísticamente, se concluyó que el porcentaje de infección relativo disminuyó significativamente en las células Vero silvestres hambreadas, señalando que la inducción de autofagia no permitiría una infección exitosa en nuestro modelo de infección celular. Este resultado fue contrario a lo esperado siguiendo un trabajo previo (Romano *et al.*, 2009), donde los niveles de infección aumentaban bajo condiciones de hambreado en otro modelo celular. Sin embargo, el resultado obtenido se asemeja a lo ocurrido en otros modelos biológicos previamente estudiados: En ratones, por ejemplo, la autofagia juega un rol protector contra la infección por *T. cruzi*, estando involucrada en el repertorio de respuestas inmunes por parte del hospedador (Casassa *et al.*, 2019). Por otro lado, en un estudio reciente se demostró que la autofagia inducida en macrófagos disminuía los niveles de infección en periodos tempranos y tardíos, y también en las células cardíacas bajo estrés nutricional inducido, los niveles de infección disminuían en periodos tardíos, al reducirse la diferenciación y proliferación de los parásitos (Duque *et al.*, 2019).

En la línea celular shPARG, también se observó una disminución significativa del porcentaje relativo de infección ante la inducción de estrés nutricional, pero sin diferencias con los resultados obtenidos para la línea silvestre en estas últimas condiciones. Este último resultado podría afirmar que PARG no tiene un rol protagónico en la vía autofágica. Y, si bien no es respaldado con significancia estadística, algo similar ocurre al observar la situación bajo el inhibidor DEA, donde puede apreciarse una disminución del porcentaje relativo de infección ante la inducción de estrés nutricional, pero similar a la disminución que ocurre en situaciones de control en células Vero silvestres, volviendo a indicar un rol no fundamental de PARG en esta vía de invasión.

Es interesante mencionar que entre las distintas condiciones en ausencia de estrés nutricional también se observaron disminuciones significativas de los niveles de infección. Al inhibir a la vía de señalización PI3k/Akt, los niveles de infección son menores con respecto al control. Esto podría confirmar la importancia de la vía PI3k/Akt para una correcta infección por parte de *T. cruzi*.

No se encontraron diferencias significativas en los niveles de viabilidad entre las condiciones de hambreado y sin hambrear. Este resultado sirvió para confirmar que la disminución de los niveles de infección observados en el ensayo de β -Gal no pueden atribuirse a una pérdida de viabilidad si no a una disminución efectiva de la infección, confirmando que en nuestro modelo una breve inducción de estrés nutricional es detrimental para el éxito de la infección.

Con respecto a la evaluación mediante inmunofluorescencia de la formación de autofagosomas, se observó que la presencia de pequeños focos de LC3 aumentaban ante estrés nutricional y que este aumento es aún mayor cuando las células bajo esta condición también son sometidas a la infección por *T. cruzi*, confirmando que frente a la infección se induce la formación de autofagosomas luego de una situación de hambreado. Lo mismo pudo concluirse cuando se realizó una cuantificación de LC3/célula. Sin embargo, los demás resultados no fueron los esperados, y se observó un comportamiento distinto entre las células donde PARG fue inhibido (con DEA) y donde PARG fue silenciado (shPARG). Como se aclaró con anterioridad, en la línea shPARG se expresa una horquilla de ARN diseñada para provocar la degradación de los ARN mensajeros de PARG y esto conlleva al silenciamiento de PARG. Por

su parte, DEA es un inhibidor químico que evita la actividad de la proteína. Esta diferencia en los resultados podría explicarse dado que la línea silenciada podría estar dando respuestas exacerbadas debido a otras razones: el silenciamiento de PARG, por ejemplo, podría ser perjudicial para la célula y ella desencadenar alguna vía compensatoria. También el inhibidor DEA podría estar teniendo algún efecto secundario. De todas maneras, más experimentos deberían realizarse para verificar estas suposiciones. Con respecto a la vía PI3k/Akt y su relación con la formación de autofagosomas, se podría concluir que no es necesaria la activación de la vía para la formación de los mismos, ya que los comportamientos bajo Wortmanina son similares a la situación control.

6.4 Conclusión final

Al analizar todos los resultados obtenidos, se puede concluir que la hipótesis expuesta no es correcta en su totalidad. Solo se observó una relación interesante entre PARG y la vía dependiente de lisosomas, sin hallarse esa relación en las otras vías de invasión. PARG, entonces, cumpliría un rol importante en la formación y el reclutamiento de lisosomas a la periferia celular para permitir el ingreso del parásito a la célula, pero sin necesidad de la activación de la vía PI3k/Akt para hacerlo. La manera en que PARG actúa es un punto para seguir investigando. De todas maneras, si bien no se encontró una correlación significativa entre PARG y la vía PI3k/Akt, si se podría concluir que la vía de señalización mencionada demostró ser importante para una correcta infección por parte del parásito. Teniendo todo lo expuesto en consideración, es interesante mencionar que como todas las vías convergen en la fusión de la vacuola parasitófora con los lisosomas, la inhibición de PARG podría por lo tanto disminuir la infección por *T. cruzi* afectando los últimos pasos del proceso de internalización, independientemente de cuál sea el proceso inicial de ingreso del parásito a la célula. Estos resultados no descartan que PARG pueda también estar actuando en otras vías metabólicas que sean necesarias para la correcta infección de la célula por el parásito, pero más ensayos deben ser realizados para poder afirmarlo.

6.5 Perspectivas a futuro

La manera concreta en que PARG actúa en la formación y/o reclutamiento de lisosomas es un punto a seguir investigando y desarrollar con más firmeza. Además, como se mencionó anteriormente, PARG podría estar actuando en otras vías metabólicas que resultan necesarias

para que el parásito logre una correcta infección, y este punto también merece un estudio más extenso. Por otro lado, se propone también investigar la funcionalidad de los lisosomas en presencia de inhibidores de PARG usando sondas que evalúen la actividad de las enzimas presentes en el lumen. Para todos estos puntos más ensayos deben ser realizados.

7 BIBLIOGRAFÍA

Andrade, L. O. and Andrews, N. W. (2004) 'Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells', *Journal of Experimental Medicine*, 200(9), pp. 1135–1143. doi: 10.1084/jem.20041408.

Buckner, F. S. *et al.* (1996) 'Efficient Technique for Screening Drugs for Activity against', *Microbiology*, 40(11), pp. 2592–2597.

Casassa, A. F. *et al.* (2019) 'Autophagy plays a protective role against *Trypanosoma cruzi* infection in mice', *Virulence*. Taylor & Francis, 10(1), pp. 151–165. doi: 10.1080/21505594.2019.1584027.

D'Amours, D. *et al.* (1999) 'Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions', *Biochemical Journal*, 342(2), pp. 249–268. doi: 10.1042/0264-6021:3420249.

Diefenbach, J. and Bürkle, A. (2005) 'Introduction to poly(ADP-ribose) metabolism', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(7–8), pp. 721–730. doi: 10.1007/s00018-004-4503-3.

Duque, T. L. A. *et al.* (2019) 'The induction of host cell autophagy triggers defense mechanisms against *Trypanosoma cruzi* infection in vitro', *European Journal of Cell Biology*, p. 151060. doi: 10.1016/j.ejcb.2019.151060.

Fauzee, N. J. S. *et al.* (2012) 'Silencing poly (ADP-Ribose) glycohydrolase (PARG) expression inhibits growth of human colon cancer cells in vitro via PI3k/Akt/NFκ-B pathway', *Pathology and Oncology Research*, 18(2), pp. 191–199. doi: 10.1007/s12253-011-9428-1.

Fonseca Rosestolato, C. T. *et al.* (2002) 'Participation of host cell actin filaments during interaction of trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* with host cells', *Cell Structure and Function*, 27(2), pp. 91–98. doi: 10.1247/csf.27.91.

Gibson, B. A. and Kraus, W. L. (2012) 'New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 13(7), pp. 411–424. doi: 10.1038/nrm3376.

Goldenberg, S. and Ávila, A. R. (2011) *Aspects of Trypanosoma cruzi Stage Differentiation*. 1st edn, *Advances in Parasitology*. 1st edn. Elsevier Ltd. doi: 10.1016/B978-0-12-385863-

4.00013-7.

Lidani, K. C. F. *et al.* (2019) ‘Chagas disease: From discovery to a worldwide health problem’, *Journal of Physical Oceanography*, 49(6), pp. 1–13. doi: 10.3389/fpubh.2019.00166.

Luo, J., Manning, B. D. and Cantley, L. C. (2003) ‘Targeting the PI3k-Akt pathway in human cancer: Rationale and promise’, *Cancer Cell*, 4(4), pp. 257–262. doi: 10.1016/S1535-6108(03)00248-4.

Prata, A. (2001) ‘Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease’, *The Lancet Infectious Diseases*, 1(2), pp. 92–100. doi: 10.1016/S1473-3099(01)00065-2.

Romano, P. S. *et al.* (2009) ‘The autophagic pathway is a key component in the lysosomal dependent entry of *Trypanosoma cruzi* into the host cell’, *Autophagy*, 5(1), pp. 6–18. doi: 10.4161/auto.5.1.7160.

Romano, P. S. *et al.* (2012) ‘Molecular and cellular mechanisms involved in the *Trypanosoma cruzi*/host cell interplay’, *IUBMB Life*, 64(5), pp. 387–396. doi: 10.1002/iub.1019.

De Souza, W., De Carvalho, T. M. U. and Barrias, E. S. (2010) ‘Review on *Trypanosoma cruzi*: Host cell interaction’, *International Journal of Cell Biology*, 2010. doi: 10.1155/2010/295394.

Vilchez Larrea, S. C. *et al.* (2012) ‘Inhibition of poly(ADP-ribose) Polymerase Interferes with *Trypanosoma cruzi* Infection and Proliferation of the Parasite’, *PLoS ONE*, 7(9). doi: 10.1371/journal.pone.0046063.

Vilchez Larrea, S. C. *et al.* (2013) ‘Host Cell Poly(ADP-Ribose) Glycohydrolase Is Crucial for *Trypanosoma cruzi* Infection Cycle’, *PLoS ONE*, 8(6), pp. 1–16. doi: 10.1371/journal.pone.0067356.

Wilkowsky, S. E. *et al.* (2001) ‘*Trypanosoma cruzi*: Phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B activation is associated with parasite invasion’, *Experimental Cell Research*, 264(2), pp. 211–218. doi: 10.1006/excr.2000.5123.

Woolsey, A. M. *et al.* (2003) ‘Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation’, *Journal of Cell Science*, 116(17), pp. 3611–3622. doi:

10.1242/jcs.00666.

Woolsey, A. M. and Burleigh, B. A. (2004) 'Host cell actin polymerization is required for cellular retention of *Trypanosoma cruzi* and early association with endosomal/lysosomal compartments', *Cellular Microbiology*, 6(9), pp. 829–838. doi: 10.1111/j.1462-5822.2004.00405.x.

La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). (2019, April 17). Retrieved from [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)).

Chagas. (2019, September 27). Retrieved from <https://www.msf.es/conocenos/que-hacemos/chagas>.