



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFÉCTOMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

“Estudio de la autofagia inducida por restricción o exceso de nutrientes (glucosa o hierro): Participación de la hidrogenofagia inducida por hierro como vía de transporte no convencional de la adhesina AP120/PFO A del hidrogenosoma a la superficie de *Trichomonas vaginalis*”

Tesis que presenta:

M. en C. Mar Sarai Hernández García

Para obtener el grado de:

Doctora en Ciencias en Infectómica y Patogénesis Molecular

Directora de Tesis:

Dra. Rossana Arroyo Verástegui

Ciudad de México.

Enero de 2019.

Asesores de tesis:

Dra. Bibiana Chávez Munguía
**Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, CINVESTAV-
IPN.**

Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres
**Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, CINVESTAV-
IPN.**

Dr. Jaime Ortega López
Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN.

Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez
Posgrado en Ciencias Genómica, UACM.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio 11 del Departamento de
Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y de
Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV-IPN) bajo la dirección de la Dra.
Rossana Arroyo Verástegui.

Este trabajo fue parcialmente financiado por el Consejo Nacional de Ciencia
y Tecnología (CONACyT) con los donativos del CONACyT: 162123 y 153093
y Finnova 237937 a R.A.V.

Becaria del CONACyT No. 375264.

*“Que los logros no se te suban a la cabeza y que los fracasos no se
te claven en el corazón”.*

A todos aquellos que estuvieron y fueron parte de esta etapa, gracias por su paciencia y apoyo incondicional; para ellos con afecto.

A mi gran amor, por todos los momentos en que lo necesité.

AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Rossana Arroyo Verástegui** por haberme recibido en su laboratorio y haberme permitido formar parte de su grupo de trabajo, por todo su apoyo en todos los aspectos.

Al **Dr. Arturo González Robles** y a la **Dra. Bibiana Chávez Munguía** por su apoyo en el asesoramiento de las imágenes de microscopía de transmisión.

Al **Dr. Jaime Ortega López** por su apoyo en la obtención de las proteínas recombinantes utilizadas en este proyecto.

Al **Dr. Jesús Francisco Tadeo Miranda Ozuna** por su apoyo en este proyecto en la parte experimental como en la estructuración del artículo.

A la **IBT Yosehandy Palma Leal** por su apoyo y asistencia en la purificación de las proteínas recombinantes utilizadas en este proyecto.

A la **Q.F.B. Leticia Ávila González** por su asistencia técnica en los cultivos de parásitos, en la producción y obtención de anticuerpos.

Al **Q.B.P. Carlos Vásquez Calzada** por su asistencia técnica en el microscopio confocal.

A la **Biol. Lizbeth Iliana Salazar Villatoro** por su asistencia técnica en la obtención de los cortes para microscopía de transmisión y en la captura de imágenes.

Al **M.V.Z. Manuel Flores Cano** por su asistencia técnica en el cuidado y manejo del conejo utilizado para producir anticuerpos policlonales.

A **Martha G. Aguilar Romero** por su asistencia secretarial.

Índice

ABSTRACT	1
RESUMEN.....	3
1. Introducción.....	5
1.1. Tricomoniasis.....	5
1.2. <i>Trichomonas vaginalis</i> y su susceptibilidad a ciertos factores ambientales	7
1.3. <i>Trichomonas vaginalis</i> (morfología).....	10
1.3.1 Retículo endoplásmico (ER).....	12
1.3.2 Aparato de Golgi	12
1.3.3. Hidrogenosoma	13
1.4. Autofagia	16
1.4.1. AuTophagy related proteins (proteínas Atg)	18
1.4.2. Inducción de la Autofagia	19
1.4.3. Formación de la membrana de aislamiento (fagóforo)	21
1.4.4. Alargamiento y Formación del autofagosoma	22
1.4.5. Familia de proteínas Atg8.....	24
1.4.6. Funciones no-autofágicas del proceso autofágico	28
2. Justificación	31
3. Hipótesis.....	32
4. Objetivo General	33
4.1. Objetivos Particulares.....	33
5. Estrategias Experimentales	34
6. Materiales y Métodos.....	40
6.1. Cultivo de parásitos	40
6.2. Procesamiento de muestras para estudio ultraestructural por microscopía electrónica de transmisión (MET).....	40
6.2.1. Fijación	40
6.2.2. Deshidratación	41
6.2.3. Preinclusión.....	41

6.2.4. Inclusión	41
6.2.5. Corte.....	42
6.2.6. Contraste.....	42
6.3. Ensayo RT-PCR	43
6.4. Extracción de DNA plasmídico por el kit “GENE JET™ PLASMID MINIPREP KIT PROMEGA-FERMENTAS”	44
6.5. Amplificación por PCR del inserto <i>tvatg8a/b</i> con los sitios de corte para las enzimas de restricción <i>Bam</i> HI y <i>Hind</i> III	44
6.6. Purificación del producto de PCR.....	45
6.7. Ligación en el vector pGEM®T easy	46
6.8. Transformación de células competentes JM109	46
6.9. Caracterización de las clonas positivas mediante secuenciación de DNA.....	46
6.10. Caracterización de las clonas positivas mediante doble digestión (DD) con las enzimas de restricción <i>Bam</i> HI y <i>Hind</i> III.....	47
6.11. Clonación y expresión de las proteínas TvAtg8a y TvAtg8b en un sistema procarionte	47
6.12. Miniprep lisis alcalina para la obtención de DNAp.....	49
6.13. Transformación de células competentes BL21 (DE3) de <i>E. coli</i>	49
6.14. Inducción de las proteína recombinantes TvAtg8a y TvAtg8b con IPTG	50
6.15. Solubilización de los cuerpos de inclusión (CB)	51
6.16. Purificación de las proteínas recombinantes por afinidad a níquel... 51	
6.17. Uso de columna de intercambio iónico pD10	52
6.18. Producción de anticuerpos policlonales anti- TvAtg8a y anti-TvAtg8b en conejo.....	52
6.19. Selección del tipo de amortiguador de lisis para la detección de la proteína LC3 (ortólogo de Atg8) en células HeLa.....	53
6.20. Electroforesis de lisados proteicos en geles de tricina y electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa	54
6.21. Ensayos de Western Blot (WB)	54
6.22. Lisados proteicos de <i>T. vaginalis</i> utilizando el amortiguador de lisis que contiene IGEPAL®CA-630 así como inhibidores de proteasas y fosfatasa.....	55

6.23 Lisado de parásitos crecidos en alto hierro en ausencia y presencia del inhibidor Wortmanina durante 60 min	56
6.24. Lisado de parásitos crecidos en alto hierro previamente tratados con fijador (ensayo para la detección de complejos entre proteínas).....	56
6.25. Ensayo de inmunofluorescencia indirecta	57
6.25a. Ensayo de detección del flujo autofágico	58
6.25b. Detección de autolisosomas con el anticuerpo anti-TvAtg8b y el marcador de lisosomas	58
6.25c. Detección de autolisosomas con el anticuerpo anti-TvAtg8b y el marcador de lisosomas en ausencia y presencia del inhibidor E-64d	59
6.26. Electroforesis en geles de sustrato, zimograma	59
6.27. Inmunomarcaje con el anticuerpo anti-TvAtg8b y MET	59
6.28. Cinética de alto hierro (AH) en presencia del inhibidor Wortmanina.	60
7. Resultados	61
7.1. Comparar a nivel de ultraestructura diferentes condiciones inductoras de autofagia.....	61
7.2. Analizar la expresión a nivel de proteína y localización de Atg8 en <i>T. vaginalis</i> en condiciones inductoras de autofagia.....	71
7.2.1. Clonación de los genes <i>tvatg8a/b</i> en el vector pGEM®T-Easy y transformación en células <i>E. coli</i> DH5α y/o JM109	74
7.2.2. Sub-clonación de los genes <i>tvatg8a/b</i> en el vector pColdI y expresión de las TvAtg8a/b recombinantes.....	77
7.2.3 Expresión de Atg8a/b de <i>T. vaginalis</i> recombinante (rTvAtg8a/b)	80
7.2.4. Purificación de las proteínas recombinantes rTvAtg8a/b.....	80
7.2.5 Obtención de anticuerpos policlonales anti-rTvAtg8a/b en ratones o conejo.	85
7.3. Identificación del marcador de autofagia (Atg8b) a nivel de proteína en <i>T. vaginalis</i> en condiciones inductoras de este proceso.....	88
7.4 Localización de Atg8b en condiciones inductoras de autofagia en <i>T. vaginalis</i>	101
7.5. Localización de PFO-A/AP120 en la superficie del parásito en las distintas condiciones inductoras de autofagia.	110
7.6 Efecto de la Wortmanina (inhibidor de autofagia) en la relocalización de PFO-A/AP120 hacia la superficie del parásito en AH.....	113

8. Discusión..... 138
9. Conclusiones 147
10. Perspectivas..... 148
11. Referencias..... 149
12. Apéndice..... 161

Índice de figuras

Fig. 1	Ciclo de vida de <i>Trichomonas vaginalis</i>	5
Fig. 2	Morfología de <i>Trichomonas vaginalis</i>	11
Fig. 3	Retículo endoplásmico (ER) y aparato de Golgi de <i>Trichomonas vaginalis</i>	14
Fig. 4	Hidrogenosoma	15
Fig. 5	Autofagia de hidrogenosomas en <i>Tritrichomonas foetus</i>	17
Fig. 6	Esquema ilustrativo del proceso autofágico	18
Fig. 7	Distribución de los genes homólogos de Atg en las diferentes especies de protozoarios patógenos y expresión de algunos de los componentes de la maquinaria de autofagia en <i>T. vaginalis</i>	19
Fig. 8	Inducción de la autofagia	20
Fig. 9	Rapamicina como inductor de autofaiga	21
Fig. 10	Formación de la membrana de aislamiento	22
Fig. 11	Sistema de tipo ubiquitinación involucrado en la formación del autofagosoma	24
Fig. 12	Vías de secreción no convencional	29
Fig. 13	Ultraestructura de la autofagia de <i>T. vaginalis</i> inducida por RG	64
Fig. 14	Ultraestructura de la autofagia de <i>T. vaginalis</i> inducida por AG	67
Fig. 15	Ultraestructura de la autofagia de <i>T. vaginalis</i> inducida durante el cultivo en Rapamicina 500 nM durante 12 h	73
Fig. 16	Ultraestructura de la autofagia de <i>T. vaginalis</i> inducida por RH	76
Fig. 17	Ultraestructura de la autofagia de <i>T. vaginalis</i> inducida en AH	79
Fig. 18	Expresión de <i>tvatg8a</i> y <i>b</i> en las distintas condiciones inductoras de autofagia.	82
Fig. 19	Diagrama de clonación de los genes <i>tvatg8a</i> y <i>b</i>	87
Fig. 20	Análisis de las clonas transformadas con pGEM®-T Easy/ <i>tvatg8a</i> y <i>b</i>	90
Fig. 21	Secuencia del inserto del plásmido pGEM®-T Easy/ <i>tvatg8a</i> y <i>b</i>	93
Fig. 22	Análisis de las clonas obtenidas con la construcción pColdI/ <i>tvatg8a</i> y <i>b</i>	96

Fig. 23	Obtención de las proteínas recombinantes TvAtg8a y b (rTvAtg8a y b)	99
Fig. 24	Purificación de las proteínas recombinantes TvAtg8a y b (rTvAtg8a y b)	103
Fig. 25	Reconocimiento de las proteínas recombinantes (rTvAtg8a y b) por los anticuerpos producidos en diferentes especies	106
Fig. 26	Reconocimiento de la proteína LC3 (ortólogo de Atg8) con el Ab α -LC3 en dos tipos de lisados de células HeLa	109
Fig. 27	Expresión de la proteína TvAtg8b en las condiciones de RG y AG	112
Fig. 28	Expresión de la proteína TvAtg8b en ausencia y presencia del inductor de autofagia (Rapa)	116
Fig. 29	Expresión de la proteína TvAtg8b en RH y AH	118
Fig. 30	Reconocimiento de la forma soluble y lipidada de TvAtg8b	120
Fig. 31	Reconocimiento de la forma soluble y lipidada de TvAtg8b en ausencia y presencia del inhibidor Wortmanina	122
Fig. 32	Reconocimiento de la forma soluble y lipidada de TvAtg8b en lisados de parásitos crecidos en AH, previamente tratados con formaldehído (detección de complejos entre proteínas)	124
Fig. 33	Localización de TvAtg8b en vesículas tipo autofagosomas en las diferentes condiciones inductoras de autofagia	126
Fig. 34	Detección de autofagosomas y autolisosomas con el Ab α -TvAtg8b en la condición de RG	128
Fig. 35	Detección de autofagosomas y autolisosomas con el Ab α -TvAtg8b en la condición de RG en ausencia y presencia del inhibidor E64d	130
Fig. 36	Participación de la proteína TvAtg8b en la biogénesis del autofagosoma durante el flujo autofágico en la condición de RG	132
Fig. 37	Localización de PFO-A/AP120 en la superficie de los parásitos en las diferentes condiciones inductoras de autofagia	134
Fig. 38	Relocalización de PFO-A/AP120 en la superficie de los parásitos en ausencia y presencia del inhibidor de autofagia en la condición de AH	136

Glosario de abreviaturas

Ab	Anticuerpo
AG	Alta glucosa
AH	Alto hierro
AL	Autolisosoma
AP	Adhesina (proteína de adhesión)
Atg	AuTophagy related proteins
ATP	Trifosfato de adenosina
AV	Autofagosoma
AVi	Vacuolas autofágicas iniciales o tempranas
Avd	Vacuolas autofágicas degradativas o tardías
BM	Buffer de muestra
BSA	solución de albúmina
CBB	Azul Brillante de Coomassie
cDNA	DNA complementario
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DEPC	Dietil pirocarbonato
DMEM	del inglés Dulbecco Modified Eagle Medium
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNap	Ácido desoxirribonucleico plasmidico
dNTPs	deoxirribonucleotidos trifosfatados
dV	vacuolas digestivas
ER	Retículo endoplásmico
FITC	Isotiocianato de fluoresceina
G	aparato de Golgi
GS	depósitos de glucógeno
H	Hidrogenosoma
HeLa	Línea celular de cáncer cervical humano (Henrieta Lacks)
h	horas
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IL-1β	Interleucina 1- β (beta)
IPTG	isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
ITS	Infección de transmisión sexual
kDa	kilodaltones
LB	medio Luria-Bertani
LC3	light-chain 3
M	Molar
MET	Microscopía electrónica de transmisión
MLB	cuerpos multilamelares
MVB	cuerpos multivesiculares

μl	microlitros
μm	micrometros
μM	micromolar
ml	mililitros
mM	milimolar
min	minutos
ng	nanogramos
nM	nanomolar
PBS	Amortiguador de fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	fosfatidiletanolamina
pH	potencial de hidrógeno
PI3-K	fosfatidilinositol 3-fosfato
PI3-P	fosfatidilinositol 3-cinasa
Rapa	Rapamicina
RG	Restricción de glucosa
RH	Restricción de hierro
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	revoluciones por minuto
RT-PCR	ensayo de retrotranscripción y PCR
SBA	Suero bovino adulto
SDS-PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
TA	Temperatura ambiente
TBE	amortiguador Tris-borato-EDTA
TOR	proteína blanco de rapamicina
TYM	medio Triptona-Extracto de levadura-Maltosa
Ubl	proteínas tipo-ubiquitina
V	Vacuola o vesícula
VIH	Virus de inmunodeficiencia adquirida
Vps	vacuolar protein sorting
WB	Western blot
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido

ABSTRACT

Autophagy is an adaptive response for cell survival, in which cytoplasmic components and organelles are degraded in bulk under normal and stress conditions. *Trichomonas vaginalis* is a parasite highly adaptable to different environmental conditions such as glucose and iron or drug treatment (Rapamycin; Rapa). Autophagy can be traced by detecting a key autophagy protein (Atg8) anchored to the autophagosome membrane through phosphatidylethanolamine (PE). In this work, our goal was to perform a morphological and cellular study of autophagy in *T. vaginalis* under different stress conditions (glucose and iron at distinct concentrations) and Rapa treatment using TvAtg8b as a specific autophagy marker. Thus, we cloned both *tvatg8a* and *tvatg8b* genes, expressed and purified the recombinant TvAtg8 proteins (rTvAtg8a and rTvAtg8b) to produce polyclonal antibodies. These antibodies did not show cross-reactivity with the heterologous recombinant protein. Thus, the anti-rTvAtg8b antibody recognized the soluble and lipid-associated TvAtg8b native protein by Western blot assays in a parasite lysate. Autophagy-like vesicles were detected by indirect immunofluorescence assays (IFA). Ultrastructural analysis by transmission electron microscopy (TEM) showed cytosolic heterogeneous cargo in different types of vesicles: initial and degradative autophagic vesicles and late lysosomes, as well as in other type that may be related with autophagy such as multilamellar and multivesicular bodies. Moreover, TvAtg8b was detected in the biogenesis of autophagosomes and autolysosomes by immunogold and lysotracker labelling, respectively, confirming the participation of TvAtg8b in the autophagosome formation and autophagy flux. This data suggest that autophagy induced by stress conditions (glucose-restriction and high glucose, rapamycin treatment and iron-restriction and iron-rich conditions) results in the formation of autophagosomes with distinct cytosolic cargos. However, only under high iron conditions, parasites showed a “selective” autophagy of hydrogenosomes (hydrogenophagy). Thus, hydrogenophagy could be used as an unconventional secretory pathway for

multifunctional proteins such as the AP120/PFO-A adhesin with homology to PFO, a hydrogenosomal protein that also is localized to the parasite surface with an adhesin function. These data are supported by an immunofluorescence analysis using wortmannin as an autophagic inhibitor. Our results show that the AP120/PFO-A adhesin does not reach the parasite surface after wortmannin treatment in spite of the presence of high iron concentrations.

RESUMEN

La autofagia es una respuesta adaptativa para mantener la homeostasis y sobrevivencia celular, donde se degradan componentes citoplásmicos u organelos tanto en condiciones normales como en condiciones de estrés. *Trichomonas vaginalis* es un protozoo parásito susceptible a cambios ambientales, los cuales pueden ser considerados condiciones de estrés como la restricción de hierro o glucosa, así como la presencia de fármacos (rapamicina), en las cuales podría incrementarse el proceso autofágico. Este proceso es monitoreado con la detección de la proteína Atg8, la cual se ancla mediante la unión de un fosfolípido (fosfatidiletanolamina, PE) a la membrana de los autofagosomas, organelo característico. Por lo cual, se clonaron los genes *tvatg8a* y *tvatg8b*, se expresaron y purificaron las proteínas recombinantes (rTvAtg8a y rTvAtg8b) para la producción de anticuerpos policlonales en conejo y en ratón, los cuales no mostraron reactividad cruzada entre las proteínas recombinantes. El anticuerpo anti-rTvAtg8b reconoció las dos isoformas de TvAtg8b (soluble y lipídica) en un lisado de parásitos en condiciones normales mediante ensayos de WB. Mediante microscopía electrónica (MET) y ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFI) se detectó la presencia de vesículas autofágicas de diferentes tamaños en las que se observó como cargo diferentes materiales citoplásmicos, por ejemplo: citoplasma y algunos organelos como hidrogenosomas y posiblemente retículo endoplásmico y aparato de Golgi. También se observó la presencia de diversos tipos de vesículas destacando las vacuolas autofágicas tempranas o iniciales, así como las degradativas y lisosomas tardíos y otras que pueden o no estar involucradas en la autofagia como cuerpos multilamelares y cuerpos multivesiculares. Estos resultados sugieren que hay un proceso de formación de vesículas heterogéneas. A la proteína TvAtg8b se le detectó en la biogénesis del autofagosoma (inmunomarcaje con oro) y en autolisosomas (marcaje con “lysotracker”), corroborando la participación de esta proteína en los eventos claves del proceso autofágico. También identificamos las posibles

fuentes de membranas para la formación de autofagosomas. Además, por nuestros resultados se sugiere la participación de la autofagia no solo en la sobrevivencia del parásito (condición de alta, baja glucosa y en bajo hierro), sino también como una vía de secreción no convencional sólo para parásitos crecidos en alto hierro (autofagia selectiva de hidrogenosoma, hidrogenofagia) para proteínas hidrogenosomales multifuncionales como la adhesina de 120 kDa, una enzima hidrogenosomal, PFO (AP120/PFO-A) que se relocaliza hacia la superficie del parásito. Esto se demostró mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo anti-AP20/PFO-A en ausencia y presencia de wortmanina, un inhibidor de autofagia. En presencia de wortmanina los parásitos en alto hierro no mostraron la relocalización de la adhesina AP120/PFO-A en la membrana de *T. vaginalis*.

1. Introducción

1.1. Tricomoniasis

La tricomoniasis es una infección de transmisión sexual (ITS) ocasionada por el protozoo flagelado parásito humano *Trichomonas vaginalis*. El humano es el único huésped natural de este microorganismo. El parásito se multiplica por fisión binaria longitudinal y se transmite de persona a persona a través del contacto sexual, infectando principalmente el epitelio escamoso del tracto genital (Fig. 1). En este protozoo no se ha reportado estructuras de resistencia como la formación de un quiste verdadero; sin embargo, si se ha detectado la formación del pseudoquistes inmóviles debido a que se internalizan flagelos bajo condiciones de estrés (frío o escases de nutrientes o tratamientos con drogas). Estas formas son viables, funcionales y pueden revertir a la forma móvil flagelada al eliminarse la condición de estrés (Benchimol, 2004; Dias-Lopes y col., 2018).

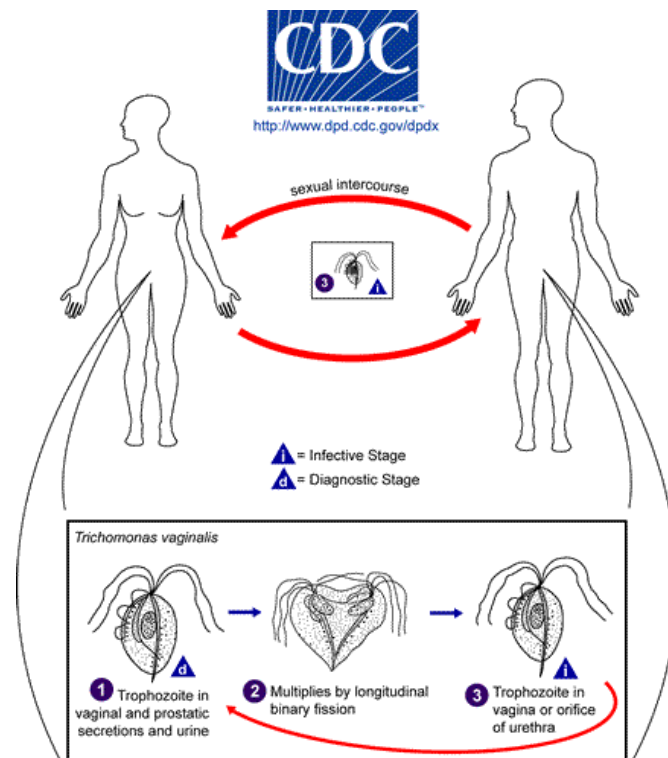


Figura 1. Ciclo de vida de *Trichomonas vaginalis*. En el esquema se señalan las fases de diagnóstico, infectiva y de división celular. http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Trichomoniasis_il.htm

La incidencia de la tricomoniasis es de aproximadamente 276 millones de casos anuales (WHO, 2012), de los cuales solo el 3% corresponden a hombres (Schewebke y Burgess, 2004). La mayor prevalencia es entre las edades de 20 a 45 años, ya que entre los factores predisponentes de esta infección se encuentran: edad, actividad sexual, número de parejas sexuales, otras ITSs, fase del ciclo menstrual, etc. (Petrin y col., 1998).

La tricomoniasis afecta principalmente a mujeres sexualmente activas que presentan secreciones de aspecto verde-amarillento o mucopurulento, disuria, mal olor, ardor, eritema o edema. Sin embargo, en tan solo el 2% de los casos se observa *colpitis macularis* (cérvix de fresa) que consiste en lesiones puntiformes hemorrágicas en la mucosa cervical. En una fase crónica de la infección se puede presentar una vulvitis difusa debido a la leucorrea abundante. A pesar de esta sintomatología, el 80% de los casos en mujeres son asintomáticos (Schewebke y Burgess, 2004). Esta enfermedad es menos frecuente en la población masculina y está asociada con el 5% de las infecciones uretrales, ya que el hombre actúa principalmente como reservorio y transmisor del parásito (Petrin y col., 1998).

Las complicaciones asociadas con la tricomoniasis en la mujer son: el riesgo a cáncer cervical, embarazos de alto riesgo con nacimiento de infantes prematuros y de bajo peso y con posible retraso mental (Mann y col., 2009). En el caso de los hombres, puede desencadenar uretritis no gonocócica, prostatitis, epididimitis y se ha observado que disminuye la motilidad y viabilidad de los espermatozoides. En ambos sexos incrementa la susceptibilidad a la infección y transmisión del VIH, como también a la infertilidad (Soper, 2004).

1.2. *Trichomonas vaginalis* y su susceptibilidad a ciertos factores ambientales

Trichomonas vaginalis es un protozoario parásito expuesto a diferentes factores ambientales: 1) temperatura, 2) pH, 3) microbiota vaginal, diferentes concentraciones de 4) hierro, 5) glucosa, 6) zinc y 7) poliaminas; y otros aún por conocer. A los cuales responde como un proceso adaptativo para su sobrevivencia por largo tiempo en el hospedero (Alvarez-Sánchez y col., 2008; Figueroa-Angulo y col., 2012; Lehker y Alderete, 1990; Krieger y Rein, 1982; Miranda-Ozuna y col., 2016; Petrin y col., 1998), ocasionando una infección crónica no mortal, pero de serias consecuencias en la salud humana.

Importancia del pH: Las variaciones en el pH pueden afectar la densidad celular; es decir el crecimiento, así como la secreción de proteínas al medio. Incluso los cambios de pH pueden variar el perfil proteico. *T. vaginalis* crece *in vitro* de manera óptima entre un rango de pH de 6.0-6.3, demostrándose que a pH 5.5-6.0 se favorecía la citoadherencia de ciertos aislados de *Trichomonas*, mientras que al pH vaginal (4.5), el perfil proteico de los aislados muestra grandes diferencias (cualitativas y cuantitativas) entre los aislados cultivados a elevados pH (Lehker y Alderete, 1990).

Interacción con la microbiota vaginal: El establecimiento de *T. vaginalis* en la vagina es desconcertante por dos razones: La primera: el pH normal de la vagina es muy ácido (4.5) y este protozoario crece mejor en un pH >5; y la segunda: la relación entre los lactobacilos protectores y *T. vaginalis* no se ha estudiado con profundidad, aún queda mucho por entender (Petrin y col., 1998).

El incremento en el pH de la vagina durante la tricomoniasis es marcado por la reducción o completa pérdida de *Lactobacillus acidophilus* y un incremento en la proporción de bacterias anaerobias. *In vitro*; con el pH controlado; los lactobacilos no afectan el crecimiento de *T. vaginalis*; sin embargo, este parásito pareciera tener un efecto nocivo para *L. acidophilus* (McGrory y col., 1994).

Diversos mecanismos de interacción entre este protozoario y la microbiota vaginal se han propuesto: 1) se ha observado que *T. vaginalis* fagocita bacterias (García-Tamayo y col., 1978; Street y col., 1984), lo cual también podría estar ocurriendo con los lactobacilos. 2) *T. vaginalis* secreta proteasas, las cuales podrían destruir a los lactobacilos (McGrory y Garber, 1992).

Concentraciones de hierro: El hierro modula específicamente la citoadherencia de los tricomonádidos, regulando de manera positiva la síntesis de cinco adhesinas (AP120, AP65, AP51, AP33 y AP23) (Arroyo y col., 1992; Figueroa-Angulo y col., 2012; Meza-Cervantez y col., 2011; Moreno-Brito y col., 2005) que cuando se expresan en la superficie del parásito en grandes cantidades por contacto con la célula hospedera o en presencia de altas concentraciones de hierro, resulta en la elevación de los niveles de citoadherencia (Arroyo y col., 1993; Lehker y col., 1991). Además, a bajas concentraciones de hierro se regula de manera positiva la síntesis de algunas proteasas lo que incrementa la citotoxicidad y la inducción de apoptosis de la célula huésped (Figueroa-Angulo y col., 2012).

Estos ejemplos muestran la relevancia del hierro en la sobrevivencia y en el desarrollo de la infección por *T. vaginalis*. En el ambiente vaginal las concentraciones de hierro fluctúan durante el ciclo menstrual por cual este parásito deberá adaptarse a dichos cambios.

Concentraciones de glucosa: La principal y mayor fuente de energía para *T. vaginalis* proviene del metabolismo de carbohidratos tanto en condiciones anaeróbicas como aeróbicas. Durante la infección, este parásito está expuesto a diferentes concentraciones de glucosa. Por ejemplo; se evaluó la concentración de glucosa presente en las secreciones vaginales de un grupo de mujeres con tricomoniasis. La concentración promedio de glucosa fue de 14.31 [mM] con un rango de 0.3-43.1 [mM]. Por lo que se sugiere que los cambios de glucosa en el sitio de la infección modulen la interacción de *T. vaginalis* con los componentes de la matriz extracelular (Miranda y col., 2016).

Las altas concentraciones de glucosa observadas (56.6 mM) se consideran como las condiciones metabólicas óptimas ya que se favorece la división celular y el establecimiento de la infección. En el caso de bajas concentraciones de glucosa (≤ 1 mM) se activan diversos mecanismos adaptativos como: la reprogramación metabólica y la autofagia para la homeostasis celular, la cual promueve la sobrevivencia celular (Huang y col., 2014).

Concentraciones de zinc: Altas concentraciones de zinc se pueden encontrar en las secreciones prostáticas, valores desde 2.3 hasta 15.3 mM. Niveles bajos de este catión (0.8 a 2.1 mM) se han reportado en algunos casos donde los pacientes presentan prostatitis bacteriana crónica. También en bajas concentraciones de zinc se incrementa la susceptibilidad a prostatitis ocasionada por *T. vaginalis* en pacientes masculinos (Krieger y Rein, 1982). Por lo que el zinc se ha identificado como un factor antimicrobiano prostático en los hombres (Fair y col., 1976).

Concentraciones de poliaminas: Las poliaminas (putrescina, espermidina y espermina) son aminas alifáticas esenciales para la vida en todos los eucariontes, se encuentran a concentraciones significativas (0.1-2.29 mM). Estas supercationes regulan múltiples procesos vitales para la función celular como apoptosis, división celular, diferenciación y crecimiento celular. A través de interacciones electrostáticas con los ácidos nucleicos afectan la transcripción y traducción. Durante la tricomoniasis se detecta un incremento en los niveles de putrescina (>2 mM) en las secreciones vaginales, sugiriendo que *T. vaginalis* produce putrescina durante la infección (Yarlett y col., 2000) a través de la adquisición de espermidina proveniente de las células del epitelio vaginal y de los eritrocitos del huésped. En *T. vaginalis*, la inhibición en la síntesis de poliaminas incrementa la adherencia de este parásito a las células del epitelio vaginal, pero se reduce la citotoxicidad de *T. vaginalis* (García y col., 2005; Vazquez-Carrillo y col., 2011).

Adaptación ambiental: El ambiente mucosal de la vagina (temperatura, microflora y pH) es uno de los sitios más complejos de infección para un patógeno. Este ambiente hostil es variable debido a la influencia hormonal durante el ciclo menstrual. La vagina es un sitio limitado de nutrientes; no puede proveer lo mismo que el cultivo *in vitro* en un medio rico el cual tiene como base: suero, tripticasa y extracto de levadura, componentes del medio para un crecimiento habitual de los parásitos. Por lo que no es de sorprendernos que las propiedades tanto biológicas como bioquímicas de los parásitos crecidos *in vitro* difieran de aquellos parásitos que se encuentran en el sitio de la infección (Lehker y Alderete, 2000). El mínimo cambio en el medio de cultivo de este parásito aparentemente tiene consecuencias fisiológicas dadas a la tremenda adaptabilidad de *T. vaginalis* a los cambios ambientales (Kostara y col., 1998; ter Kuile y col., 1999). Incluso sugieren que los tricomonádidos poseen vías de señalización que permiten ligar los cambios ambientales con los cambios apropiados a nivel transcripcional y post-transcripcional.

La exploración en los mecanismos reguladores de adaptación a los cambios microambientales que conecten lo anterior permitirá el mayor entendimiento de la interacción parásito-huésped.

1.3. *Trichomonas vaginalis* (morfología)

Este protozoo se caracteriza por presentar cuatro flagelos anteriores y uno recurrente adosado a la membrana ondulante cuyo arreglo de los axonemas es el mismo que el de las células eucarióticas (9+2). Además, presenta estructuras compuestas de microtúbulos como la costa, que se encarga de soportar los movimientos del flagelo recurrente; el axostilo, cuya principal función es ser el eje de la célula del tricomonádido; y la pelta, que se encuentra en la región anterior del cuerpo celular y aparentemente soporta la pared del canal flagelar (Benchimol, 2004).

T. vaginalis presenta forma ameboide cuando se encuentra adherido a células del epitelio vaginal y piriforme al estar en secreciones vaginales y en cultivo

(Arroyo y col., 1993); mide aproximadamente 10 μm de largo, de 5 a 15 μm de ancho y 7 μm de diámetro (Honigberg, 1989) (Fig. 2).

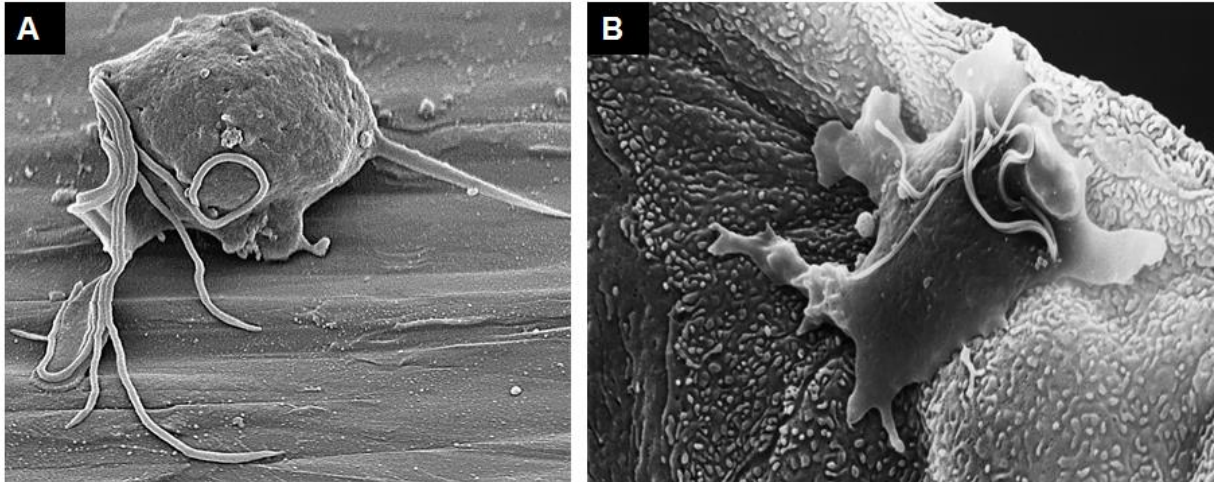


Figura 2. Morfología de *Trichomonas vaginalis*. A) El parásito piriforme, donde se observan los flagelos, la membrana ondulante así como el axostilo (Midlej y Benchimol, 2009). B) Forma ameboide al contacto con células del epitelio vaginal (Arroyo y col., 1993).

Este protozoario tiene un solo núcleo localizado en la región anterior cuya envoltura nuclear se mantiene intacta durante la mitosis (Benchimol, 2004), en su interior está presente el nucleolo, así como 6 cromosomas (Lehker y col., 1999; Gómez-Conde y col., 2000). A diferencia de otros protozoarios, *T. vaginalis* posee retículo endoplásmico liso y rugoso asociado a ribosomas. También presenta un aparato de Golgi bien definido. Los tricomonádidos no tienen mitocondrias ni peroxisomas; sin embargo, tienen otro organelo muy importante así como inusual, el hidrogenosoma (Müller, 1993). La membrana plasmática tiene la función de delimitar a la célula, así como participar en la interacción huésped-parásito a través de la función de proteínas de superficie como las adhesinas AP51, AP65, AP33, AP23 y AP120, nombradas así por su peso molecular (Arroyo y col., 1992; Moreno-Brito y col., 2005). Los genes de cuatro de las cinco adhesinas presentan homología de secuencia con enzimas metabólicas hidrogenosomales: la AP65 con la enzima málica (Alderete y col.,

1995); AP33 y la AP51 con la enzima succinil-CoA-sintetasa subunidad alfa y beta, respectivamente (Engbring y col., 1998; Arroyo y col., 1992; Alderete y col., 1995); y la AP120 con la piruvato:ferredoxín óxido-reductasa, responsable de la descarboxilación oxidativa del piruvato a acetil-CoA, localizada en la membrana de los hidrogenosomas y en la superficie del parásito (Moreno-Brito y col., 2005; Meza-Cervantez y col., 2011) al igual que las otras adhesinas en presencia de altas concentraciones de hierro y al contacto con la célula blanco.

1.3.1 Retículo endoplásmico (ER)

En los tricomonádidos, el retículo endoplásmico rugoso claramente se ve alrededor del núcleo (Fig. 3A), formando parte de la membrana externa de la envoltura nuclear y asociado con el axostilo (estructura del citoesqueleto) e hidrogenosomas. Una forma de distinguir este organelo es mediante la detección de los ribosomas asociados a las membranas del retículo endoplásmico, los cuales son pequeñas estructuras esféricas electrón-densas que también pueden estar de manera libre en el citoplasma (Benchimol, 2004). En los tricomonádidos sometidos a tratamiento de fármacos y bajo el proceso de autofagia se ha observado el agrandamiento anormal de este organelo (Benchimol, 1999).

En otro tipo de células (células de eucariontes superiores) la autofagia del ER es provocado por el “estrés” a este organelo, el cual es producido experimentalmente con el tratamiento de fármacos que alteran la homeostasis del Ca^{2+} o inhiben la glicosilación (Smith y Wilkinson, 2017).

1.3.2 Aparato de Golgi

En los tricomonádidos el aparato de Golgi tiene las siguientes características: 1) Es una estructura prominente única, 2) alcanza 6 μm de largo y 1 μm de ancho, 3) tiene de 8 a 12 cisternas, 4) sus membranas son fenestradas, 5) el espacio luminal entre las cisternas es estrecho en el orden de los 30 a 35 nm

y 6) se divide por un proceso conocido como golgicinesis, formando dos nuevos aparatos de Golgi (Benchimol y col., 2001) (Fig. 3A-C). Además, se propone que es el sitio principal de obtención de Ca^{2+} de *T. foetus* (Almeida y col., 2003).

1.3.3. Hidrogenosoma

Este organelo contiene enzimas que participan en el metabolismo del piruvato durante la glicólisis, además de ser el sitio de síntesis de ATP (Müller, 1995) y de producción de hidrógeno molecular. Estudios ultraestructurales revelan que este organelo es de forma esférica (alrededor de 0.3 μm) o ligeramente alargado cuando está en proceso de división (Fig. 4), se distinguen por su característica de ser electrón densos además de que suelen estar cercanos al axostilo o a la costa (Benchimol y col., 2003). El hidrogenosoma está constituido por una doble membrana que presenta cierta ondulación (Benchimol y De Souza, 1983); de una matriz granular, cuya apariencia difiere a la del citoplasma; de una vesícula periférica, en la cual mediante ensayos de SDS-PAGE se ha demostrado la localización de las proteínas de 66, 45 y 32 kDa (Díaz y De Souza, 1997). Estas vesículas del hidrogenosoma pueden variar en tamaño así como en densidad electrónica. Algunos estudios en el parásito relacionado *Tritrichomonas foetus* han demostrado que la vesícula periférica es un compartimento que almacena calcio y otros cationes como magnesio (Benchimol, 2007), zinc, fósforo y hierro (Benchimol y col., 1993; Benchimol y col., 1996, Benchimol, 2008) (Figura 4).

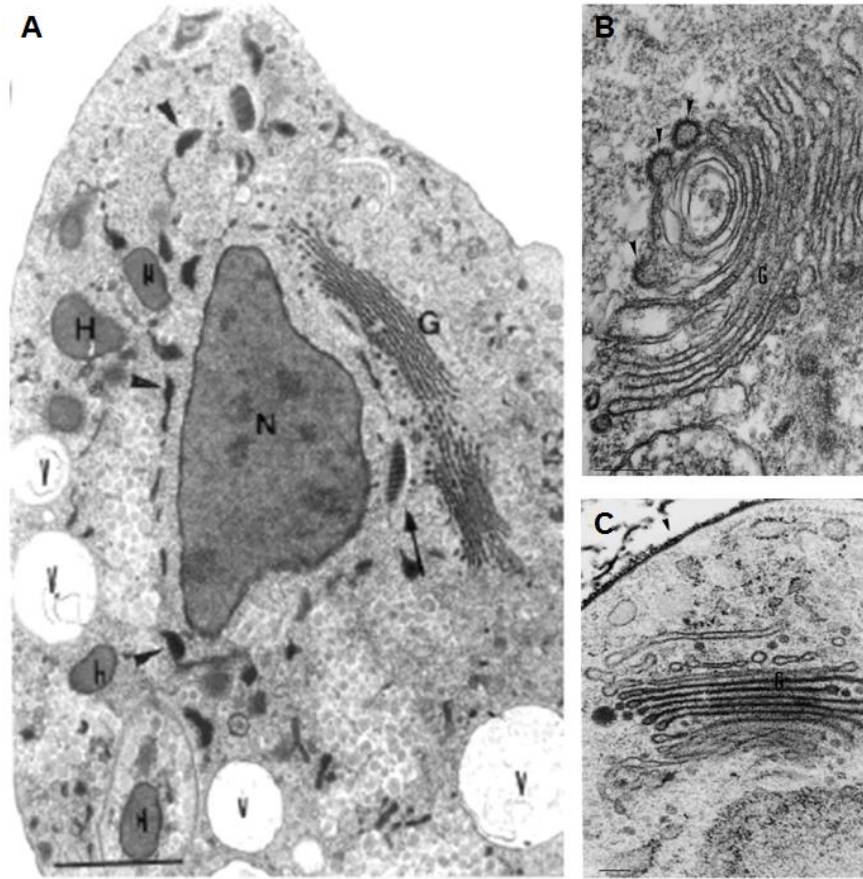


Figura 3. Retículo endoplásmico (ER) y aparato de Golgi de *Trichomonas vaginalis*. **A.** Se muestra el ER (cabeza de flecha) cercano al núcleo (N), se observa el aparato de Golgi (G) en el proceso de golgicinesis (Benchimol, 2004). **B y C.** Acercamiento de distintos cortes del aparato de Golgi (G) de *T. vaginalis* (Benchimol y col., 2001). Barra = 200 nm.

1.3.3.1. Similitudes y Diferencias con la mitocondria

Algunos autores consideran a los hidrogenosomas como mitocondrias modificadas debido a las evidencias que existen entre las similitudes de estos dos organelos en los Tricomonádidos (Lahti y col., 1992; Hrdý y Müller, 1995; De Andrade Rosa y col., 2006; Dolezal y col., 2007): 1) están constituidos por una doble membrana (Benchimol y De Souza, 1983); 2) se dividen por tres maneras distintas: segmentación, partición y en forma de corazón (Benchimol,

1996; Benchimol y col., 2003) sin importar la fase del ciclo celular (Benchimol y Engelke, 2003); 3) llevan a cabo la producción de ATP (Lindmark y Müller, 1973); 4) participan en el metabolismo del piruvato durante la glicólisis (Lindmark y Müller, 1973); 5) ambos organelos tienen en su interior proteínas como: beta-succinil-coenzima A sintetasa; una proteína soluble hidrogenosomal (Lahti y col., 1992), la proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70; Bui y col., 1996; Germot y col., 1996), la frataxina; una proteína constitutiva de mitocondria (Dolezal y col., 2007), la cardiolipina; un fosfolípido localizado en la membrana interna de la mitocondria (De Andrade Rosa y col., 2006). 6) Puede ocurrir la autofagia en ambos organelos (hidrogenosoma y mitocondria) bajo condiciones de estrés o por el tratamiento con fármacos (Benchimol, 1999; Tolkovsky, 2009).

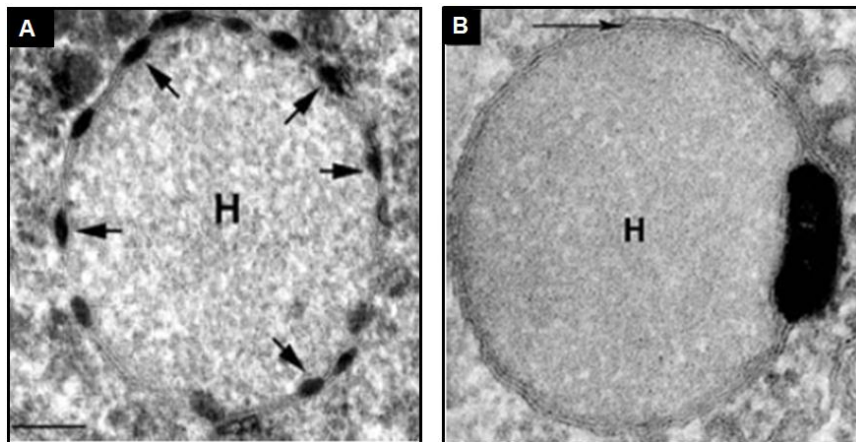


Figura 4. Hidrogenosoma. Cortes finos de tricomonádidos donde se observa el hidrogenosoma a través de microscopía electrónica de transmisión. En ambas imágenes se aprecia la doble membrana así como la matriz granular. **A.** Hidrogenosoma de *T. vaginalis*. Se puede apreciar la presencia de varias vesículas electrón-densas periféricas alrededor del organelo (flechas). **B.** *T. foetus* presenta una sola vesícula periférica de gran tamaño (Benchimol, 2007).

A diferencia de las mitocondrias, los hidrogenosomas llevan a cabo la producción de hidrógeno molecular, carecen de material genético (Clemens y Johnson, 2000), de cadena respiratoria, citocromos y de fosforilación oxidativa (Müller, 1993).

Estudios realizados por Benchimol (1999) en *T. foetus* demostraron que cuando el parásito se cultiva en presencia de fármacos como hidroxiurea y sulfato de zinc se induce la autofagia de hidrogenosomas (Benchimol, 1999).

1.4. Autofagia

La autofagia es un proceso biológico por el cual las células o microorganismos degradan sus propios organelos, macromoléculas o péptidos para la sobrevivencia de los mismos.

Este proceso es inducido en condiciones de estrés como la privación de nutrientes, el tratamiento con fármacos (hidroxiurea, sulfato de zinc, griseofulvina, citocalasina y colchicina) e incluso, en condiciones normales sucede de forma más selectiva para remover material dañado o anormal como proteínas citoplásmicas y organelos dañados (Benchimol, 1999) (Figura 5).

El proceso autofágico ocurre a través del sistema vacuolar/lisosomal, donde los lisosomas son organelos multifuncionales compuestos por una doble membrana cuyo interior es un ambiente ácido con un pH de 5.0 a 5.5. Estos organelos contienen enzimas como hidrolasas ácidas, las cuales degradan las sustancias u organelos intracelulares, así como material extracelular (Uchiyama y col., 2008). En los tricomonádidos los lisosomas se localizan en la parte posterior (Benchimol y col., 1996), son de gran tamaño y muestran reacción positiva para fosfatasa ácida en ensayos de citoquímica (Queiroz y col., 1991).

La autofagia, tanto de organelos como de macromoléculas, ocurre **primero** a través del reconocimiento del organelo o la porción citoplásmica a degradar por una membrana de aislamiento. **Segundo**, el organelo blanco es rodeado

por una membrana, formándose el autofagosoma que es un organelo esférico de doble membrana de $\sim 1 \mu\text{m}$ de diámetro. **Tercero**, a través de la fusión del autofagosoma con el lisosoma la actividad enzimática de las hidrolasas contenidas degrada el material secuestrado. La vida media del autofagosoma es de alrededor de 8 min y es corta comparada con otros organelos. Por **último**, se da la formación del autolisosoma (AL) que tendrá en su interior remanentes de organelos, y/o pequeños péptidos para la obtención de aminoácidos los cuales pueden ser utilizados de nuevo por la célula (Yoshimori, 2004) (Figura 6).

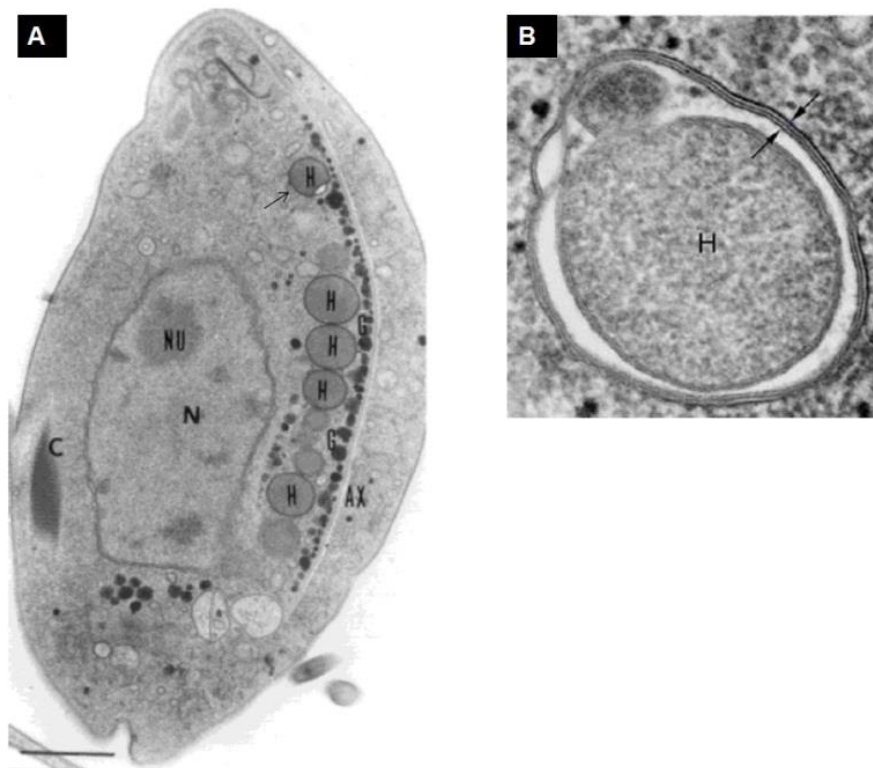


Figura 5. Autofagia de Hidrogenosomas en *Tritrichomonas foetus*. **A.** *T. foetus* presenta los hidrogenosomas cerca del axostilo, señalándose a un hidrogenosoma anormal (flecha). **B.** Se señala la integridad de la doble membrana del hidrogenosoma (H) dentro de otra estructura membranosa (con flechas), por microscopía electrónica de transmisión (Benchimol, 1999).

Morfológicamente, las vacuolas autofágicas pueden ser clasificadas en vacuolas autofágicas iniciales o tempranas (AVi), las cuales contienen

morfológicamente citosol u organelos intactos y en vacuolas autofágicas degradativas o tardías (AVd), las cuales contienen material citoplásmico parcialmente degradado (Eskelinen, 2008).

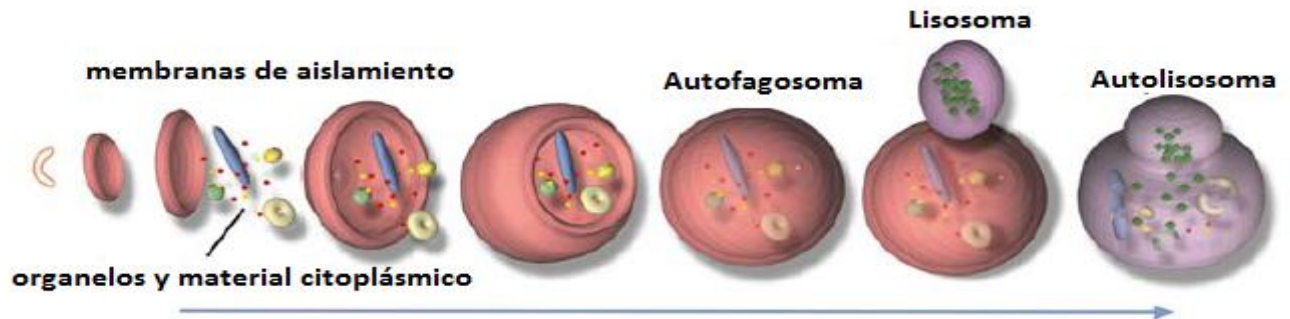


Figura 6. Esquema ilustrativo del proceso autofágico. Esquema donde se observan las etapas del proceso autofágico en células eucariotas (Adaptado de Yoshimori, 2004).

1.4.1. AuTophagy related proteins (proteínas Atg)

Las proteínas involucradas en autofagia son las denominadas Atgs, acrónimo creado a partir del inglés “AuTophagy-related proteins”, las cuales inducen y regulan todo el proceso autofágico (Yang y Klionsky, 2009).

En el genoma de *T. vaginalis* se han reportado secuencias con cierta homología a algunas proteínas Atg (Fig. 7A), lo que sugiere que en este protozoo tiene genes que codifican para proteínas Atg que participan en las diferentes etapas de la autofagia: la inducción del proceso autofágico, la envoltura, la formación de la vesícula, la expansión de la vesícula, así como su terminación, la recuperación y/o rescate, el acoplamiento y fusión con un lisosoma y por último la ruptura de la vesícula dentro del lisosoma (Brennan y col., 2011). Además, Huang y col., 2014 demostró en condiciones de restricción de glucosa (RG) la expresión a nivel de transcrito de al menos una proteína Atg involucrada en cada etapa del proceso autofágico (Fig. 7B).

1.4.2. Inducción de la Autofagia

En la etapa de inducción se cree que TOR (proteína blanco de rapamicina) es el iniciador de la vía autofágica ya que actúa como un sensor de los niveles de aminoácidos y ATP. La inhibición de la vía TOR lleva a la regulación positiva a nivel transcripcional del gen *atg8* (Kirisako y col., 1999; Huang y col., 2000). El mecanismo por el cual TOR regula la autofagia es el siguiente: bajo condiciones ricas de nutrientes TOR fosforila a Atg13, Atg13 en su forma hiperfosforilada tiene baja afinidad por la proteína Atg1, por consiguiente se reduce la actividad de cinasa de la Atg1. En contraste, cuando la actividad de TOR es inhibida ya no ocurre la fosforilación de Atg13 y de este modo se puede asociar con la cinasa Atg1 llevando a la inducción de la autofagia (Gozuacik y Kimchi, 2004) (Fig. 8).

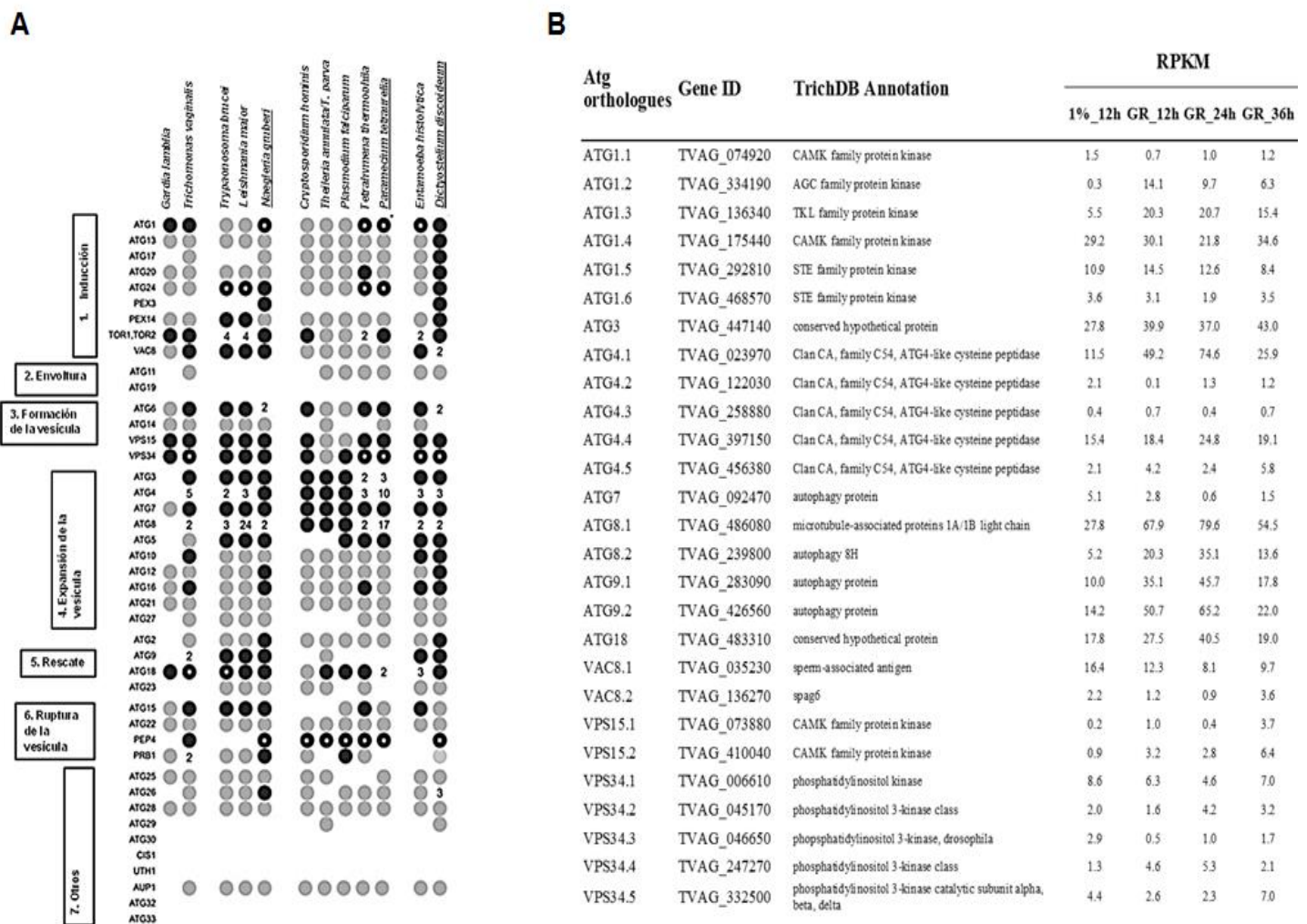


Figura 7. Distribución de los genes homólogos de Atg en las diferentes especies de protozoarios patógenos y expresión de algunos de los componentes de la maquinaria de autofagia en *T. vaginalis*. **A.** Los círculos negros representan secuencias ortólogas usando Atgs provenientes de *Saccharomyces cerevisiae*. Los círculos grises representan secuencias homólogas predictivas. Los números denotan la cantidad de isoformas presentes en las distintas familias de genes parálogos. Los asteriscos denotan la familia de genes donde el número de parálogos predichos no fueron claros (Modificado de Brennan y col., 2011). **B.** Se muestran los genes de Atg de *T. vaginalis*, con su respectivo TVAG, los cuales se expresan a nivel de transcrito en distintas condiciones de glucosa: alta glucosa (1%, 12h) y en restricción de glucosa (GR) a 12, 24 y 36 h. Obteniendo su máx. expresión a las 24 h en GR. (Tomado de Huang y col., 2014).

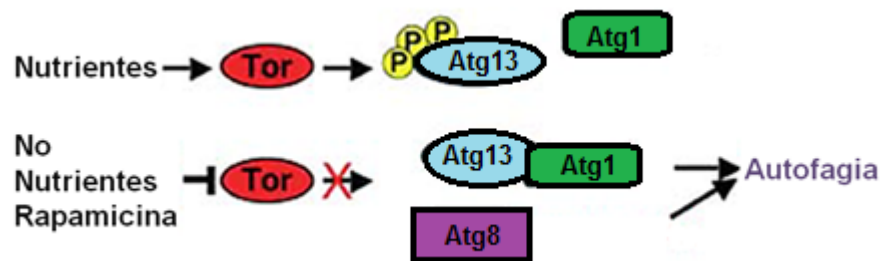


Figura 8. Inducción de la autofagia. Mecanismo en que se muestra la inducción de la autofagia a través de la inhibición de TOR (Modificado de Gozuacik y Kimchi, 2004).

1.4.2.1. Rapamicina, fármaco inductor de la autofagia

La rapamicina (sirolimus) es un antibiótico macrocíclico producido por la bacteria *Streptomyces hygroscopicus*, y fue descubierto como un potente agente antifúngico, el cual se une al receptor intracelular FKBP12. La unión entre el receptor FKBP12 y rapamicina (FKBP12/rapamicina) inhibe la autofosforilación de TOR por lo que no ocurre la fosforilación de Atg13 y de este modo tiene alta afinidad a la cinasa Atg1, permitiendo la formación del complejo Atg13/Atg1, el cual tiene alta actividad. Rapamicina es el fármaco más utilizado para inhibir TOR y por ende para la inducción de autofagia (Ballou y Lin, 2008) (Fig. 9).

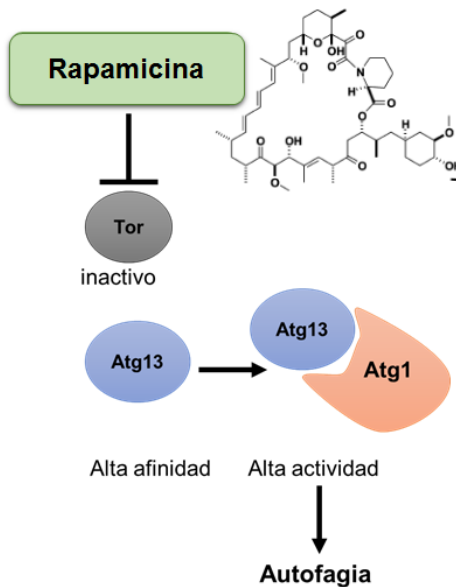


Figura 9. Rapamicina como inductor de autofagia. Mecanismo de acción de Rapamicina sobre TOR y la inducción de autofagia.

1.4.3. Formación de la membrana de aislamiento (fagóforo)

En este proceso está involucrado el complejo tipo III PI3-cinasa cuyo producto es el fosfatidilinositol-3-fosfato. Este complejo está formado por la proteína Atg6 (también conocida como Vps30; "Vacuolar protein sorting"), Atg14, Vps15 (serina cinasa miristilada) y la Vps34 (PI3-cinasa) cuya principal función es la formación de la vesícula autofágica. La proteína Atg14 funciona como un adaptador para que se lleve a cabo la interacción de la proteína Atg6-Vps34 (Kim y col., 2002). La cinasa Vps15 regula la actividad de Vps34 (Stack y col., 1995). Las proteínas que tengan el motivo PX (dominio FYVE) son capaces de interactuar con PI3-P; fosforilado por la PI3-cinasa el cuál posiblemente conduce a la autofagia a través del reclutamiento de proteínas que contienen este tipo de dominios y motivos necesarios para la formación de la membrana de aislamiento (Gillooly y col., 2001) (Fig.10).

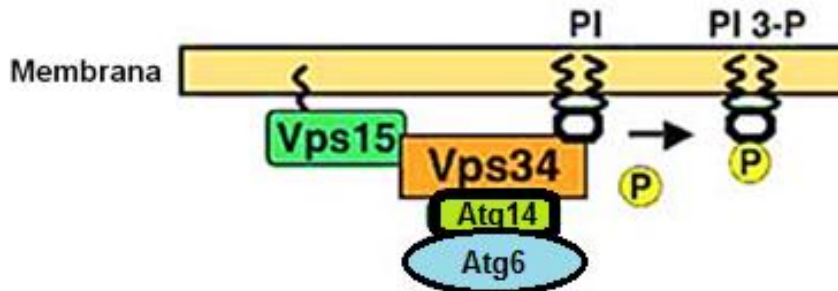


Figura 10. Formación de la membrana de aislamiento. Mecanismo que muestra el reclutamiento de las proteínas necesarias que interactúan con el complejo de fosfatidilinositol 3-cinasa para la generación de fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3-P) a partir de fosfatidilinositol (PI) necesario para la formación de la membrana de aislamiento que dará origen al autofagosoma (Modificado de Gozuacik y col., 2004).

1.4.3.1. Wortmanina, inhibidor de fosfatidilinositol 3-cinasa

La wortmanina es un compuesto permeable; es decir; penetra a la célula por simple difusión; es un metabolito fúngico producido por varias especies de hongos, incluido *Penicillium wortmanni*. Este compuesto actúa como un potente, selectivo e irreversible inhibidor de fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K). La inhibición de PI3K mediante el uso de wortmanina puede inhibir la formación de los autofagosomas (Ballou y col., 2008). La concentración recomendada para usar este compuesto es de 100 nM en las células para ensayos donde se quiera involucrar la participación de PI3K (Bain y col., 2007).

1.4.4. Alargamiento y Formación del autofagosoma

En esta etapa del proceso autofágico participan dos sistemas de tipo ubiquitinación. El primero de ellos es el sistema de la Atg12, en el cual esta proteína se conjuga con la Atg5 en una manera tipo ubiquitinación (Ohsumi, 2001). Las reacciones de conjugación inician por la activación de Atg12 por una enzima tipo E1 la Atg7, seguido de la transferencia de la Atg12 por la Atg7 a una enzima tipo E2 la Atg10, finalmente la Atg12 es conjugada con la proteína Atg5 a través de un enlace covalente entre la glicina del extremo carboxilo terminal de Atg12 y un residuo de lisina en la parte central de la proteína Atg5. La conjugación de estas dos proteínas ocurre inmediatamente

después de la síntesis de Atg12 por lo que casi todas las proteínas Atg12 dentro de una célula se encuentra en una forma conjugada (Kuma y col., 2002). La conjugación de las proteínas Atg12/Atg5 es funcional en la formación y estabilización del complejo multimérico con la proteína Atg16. Este complejo se localiza en la membrana externa del autofagosoma y se disocia después de la completa formación de este organelo (Mizushima y col., 2001) (Fig. 11).

El segundo sistema tipo ubiquitinación es el de la proteína Atg8, la cual tiene como blanco a una molécula lipídica; fosfatidiletanolamina (PE; por su nombre en inglés) (Ichimura y col., 2000). Para que esta reacción de conjugación ocurra, la Atg8 tiene que ser procesada en el extremo carboxilo terminal al tiempo de ser traducida. La proteasa encargada de esta reacción es la Atg4; la cual es una cisteína proteasa del clan CA de la familia 54 (Kirisako y col., 2000); esta proteasa corta a la Atg8 en el extremo carboxilo terminal exponiendo el residuo de glicina. La proteína tipo E1 Atg7, la cual es responsable de la activación de Atg12 también activa a Atg8. Por otro lado, la proteína tipo E2; la Atg3 es específica para el sistema de conjugación de la Atg8 (Ichimura y col., 2000). La participación de todas estas proteínas facilita la unión a través de un enlace amida entre la glicina del extremo carboxilo de la Atg8 y el grupo amino de la fosfatidiletanolamina (PE), de esta forma se encuentra anclada a la membrana del autofagosoma (Fig. 11). Esta reacción de lipidación es reversible y la proteína encargada de realizar este proceso es la proteasa Atg4 (Kirisako y col., 1999).

La Atg8 de levadura tiene gran número de isoformas y de ortólogos en eucariontes superiores así como en mamíferos, por lo cual fue propuesta como marcador de vacuolas autofágicas y de actividad autofágica (Kabeya y col., 2000; Kamada y col., 2000).

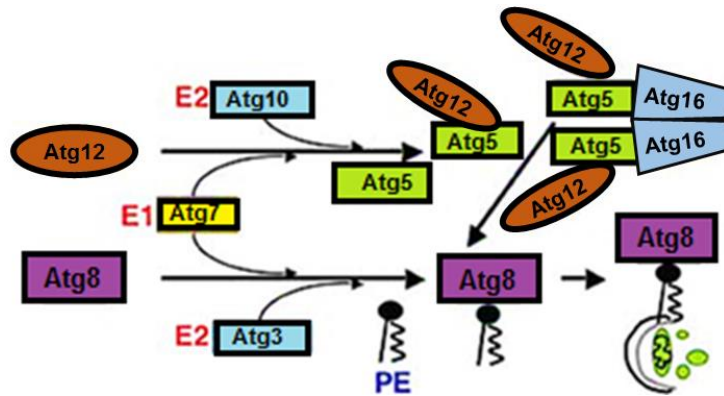


Figura 11. Sistema de tipo ubiquitinación involucrado en la formación del autofagosoma. Se muestran las proteínas involucradas en los dos sistemas de tipo ubiquitinación. Atg: es sinónimo de Atg, PE: Fosfatidiletanolamina (Tomado de Gozuacik y col., 2004).

1.4.5. Familia de proteínas Atg8

Las proteínas Atg8 son tipo-ubiquitina (Ubl) que juegan un papel importante en la biogénesis del autofagosoma. Este tipo de familia comprende un solo miembro en levaduras y distintos homólogos; a nivel de secuencia de aminoácidos; en mamíferos, agrupados en tres subfamilias: LC3 (light-chain 3), GABARAP (γ -aminobutyric acid receptor-associated protein) y GATE-16 (Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa) (Slobodkin y Elazar, 2013).

Las Atg8 son sintetizadas como precursores en el citosol y pueden presentar diferentes modificaciones post-traduccionales que les permiten participar de manera múltiple en el proceso autofágico, ya sea en el reclutamiento de cargos específicos destinados a la degradación dentro de los lisosomas y/o en promover la maduración del autofagosoma (Slobodkin y Elazar, 2013)

LC3 fue el primero homólogo de Atg8 en mamíferos en ser caracterizado. Fue originalmente identificado como la cadena ligera de las proteínas 1A y AB asociadas a microtúbulos en cerebro de rata. Su implicación en la autofagia fue demostrado por Kabeya y col., 2000, quien encontró que LC3 se procesa post-traduccionalmente en dos formas: LC3-I, localizado en el citosol y LC3-II, la forma conjugada con PE, la cual se asocia con la membrana del

autofagosoma. La cantidad de LC3-II detectada ha sido correlacionada con la cantidad de autofagosomas formados.

Los otros dos homólogos de Atg8 pertenecen a la subfamilia de GABARAP y GATE-16, los cuales inicialmente fueron caracterizados como factores pertenecientes al tráfico vesicular intracelular. GATE-16 fue encontrado interaccionando con el factor Golgi v-SNARE (vesicle-associated *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors), mediante esta interacción, GATE-16 modula el transporte intra-Golgi (Sagiv y col., 2000). GABARAP fue identificado como un factor citosólico que regula el transporte intracelular de las subunidades $\gamma 2$ de los receptores GABA_A. Se demostró que tanto GATE-16 y GABARAP se procesan de manera post-traducciona, existiendo dos formas modificadas (I y II) (Kabeya y col., 2004). La conversión en la forma II de ambas proteínas se asocia con autofagosomas.

Estudios estructurales de varios miembros de las familias de Atg8 indican que las proteínas Atg8 comparten fuertemente similitud a nivel de estructura con ubiquitina (Sugawara y col., 2004); sin embargo, a nivel de secuencia de aminoácidos muestran algunas diferencias. Por ejemplo; la primera α -hélice en LC3 es básica, mientras que en GATE-16 y GABARAP tiene una naturaleza ácida. La segunda α -hélice es ácida en LC3, neutral en GATE-16 y básica en GABARAP. Probablemente las diferencias entre las diversas proteínas Atg8 podrían conferir cierta especificidad hacia las proteínas blanco o las diversas funciones. Algunas diferencias en la distribución en los tejidos de las proteínas Atg8, podrían señalar funciones tejido-específicas de algunos miembros de esta familia (Shpilka y col., 2011).

1.4.5.1. Funciones de la familia de proteínas Atg8

Biogenesis del autofagosoma

Atg8 es una proteína crucial en el proceso de la biogenesis del autofagosoma (Kirisako y col., 1999). La expresión de esta proteína en levaduras es inducida bajo condiciones de inanición. La cantidad de Atg8 lipídada, localizada en

estructuras tipo autofagosoma, aumenta al inducir la autofagia y correlaciona con el grado de formación de autofagosomas. Los niveles de Atg8 determinan el nivel de autofagia y el control en el tamaño del autofagosoma (Xie y col., 2008).

La manipulación en la expresión de los diferentes miembros de Atg8 en las subfamilias presentes en mamíferos (LC3, GABARAP y GATE-16) mediante el uso de RNAs de silenciamiento, knock-down y/o sobreexpresión, revelan que cada miembro de las subfamilias contribuye a la biogenesis del autofagosoma, pero en diferentes etapas de este proceso. Aunque la familia de LC3 media la elongación de la membrana de aislamiento o fagóforo, las familias de GABARAP y GATE-16 podrían estar involucradas río abajo del proceso de maduración, posiblemente en el cierre del autofagosoma (Weidberg y col., 2010).

Selección del cargo autofágico

La autofagia, por mucho tiempo, ha sido considerada como un proceso de degradación no selectivo. Sin embargo, recientemente se ha demostrado un tipo de autofagia en el cual el cargo citoplásmico es seleccionado por Atg8 previamente antes de ser degradado dentro de los lisosomas. Ejemplos de autofagia de organelos: peroxisomas (pexofagia), mitocondria (mitofagia), retículo endoplásmico (reticulofagia), bacterias o virus (xenofagia) y/o ribosomas (ribofagia) (Johansen y Lamark, 2011). Además del papel que tienen las Atg8 en la biogenesis del autofagosoma, son factores centrales para la selección del cargo que será englobado por los autofagosomas, lo cual ocurre a través de la interacción de proteínas adaptadoras también conocidas como receptores autofágicos que son el vínculo entre los sustratos o blancos autofágicos y las Atg8-asociadas a autofagosomas. Estos receptores autofágicos también son degradados a través de la autofagia (Johansen y Lamark, 2011).

La interacción entre los receptores autofágicos con los homólogos de Atg8 es mediante un motivo lineal corto, nombrado LIR (LC3-interacting region), el cual está conformado por la secuencia consenso W/F/Y-X-X-L/I/V y cerca de este motivo hay al menos un residuo ácido (Slobodkin y Elazar 2013).

Reclutamiento de la maquinaria autofágica

La interacción entre las proteínas Atg8 con las demás proteínas de la maquinaria autofágica es dependiente del motivo LIR. Existe una interacción directa entre el motivo LIR de Atg8 con la proteína Atg1 (reguladora de la autofagia), la cual está involucrada en la etapa de inducción del proceso autofágico. Incluso se ha encontrado la interacción de Atg8 con varios miembros de las proteínas Rab, de las cuales algunas de ellas se han visto implicadas en la regulación del anclaje y fusión entre las membranas de las vesículas relacionadas con la autofagia (Slobodkin y Elazar, 2013).

Como herramienta para monitorear el proceso autofágico

Como las proteínas Atg8 se asocian específicamente con estructuras prematuras del proceso autofágico (membranas de aislamiento o fagóforos) y con las estructuras maduras como son los autofagosomas. Dado que existe una correlación entre Atg8 con el número de autofagosomas, estas proteínas son ampliamente usadas como marcadores específicos para monitorear los autofagosomas presentes, así como la actividad autofágica en un tipo de célula. Múltiples ensayos son utilizados para detectar y cuantificar las proteínas Atg8 tanto en levadura como en células de mamífero, dentro de los cuales están: Western Blot, microscopía de fluorescencia y citometría de flujo (Cheong y Klionsky, 2008; Klionsky y col., 2008).

La inducción de la autofagia va acompañada por un incremento en la conversión de la forma soluble de Atg8 (Atg8-I) a la forma conjugada con el lípido PE y unida a membrana (Atg8-II). La acumulación de Atg8-II será indicativo de la presencia de autofagia inducida en una célula. La forma

lipidada de Atg8 se puede separar de la forma soluble por su rápida migración durante una electroforesis ya que tiene menor peso molecular (Slobodkin y Elazar, 2013).

Es importante señalar que en algunos casos la cantidad de proteína Atg8 así como su procesamiento puede ser tipo tejido o célula-dependiente, además de que puede estar involucrada en otros procesos celulares además de la autofagia.

1.4.6. Funciones no-autofágicas del proceso autofágico

La autofagia puede tener funciones diferentes dependiendo del organismo en que suceda, así como la finalidad que tenga. Por ejemplo: en los parásitos puede participar en la sobrevivencia, en la diferenciación dentro del ciclo de vida, así como en la patogénesis de los mismos. En los parásitos tripanosomátidos es importante para la diferenciación durante sus ciclos celulares (Alvarez y col., 2008). En los parásitos del *Phylum* Apicomplexa la autofagia participa en la remoción de organelos importantes para la invasión celular (Jayabalasingham y col., 2010). También se ha propuesto a la autofagia como una vía de secreción no convencional (Manjithaya y Subramani, 2011).

Autofagia como una vía de secreción no convencional

Uno de los primeros ejemplos de secreción no convencional fue el de la proteína citosólica IL-1 β ; una citosina proinflamatoria en células de mamífero. Esta citosina carece de péptido señal, reside en el citosol como un precursor inactivo y su secreción es muy importante para sus funciones biológicas. La secreción de esta IL-1 β se asocia con la maquinaria autofágica (Dupont y col., 2011; Jiang y col., 2013; Rabouille y col., 2012) ya que su secreción depende de Atg5 así como de Rab8a (GTPasa pequeña), la cual regula el tráfico hacia

la membrana plasmática y la secreción del cargo seleccionado en el proceso autofágico (Ponpuak y col., 2015) (Fig. 12).

Incluso se ha observado la secreción de organelos citoplasmáticos, como las mitocondrias durante la maduración del reticulocito, la cual depende de la autofagia selectiva de este organelo para su exocitosis (Schweers y col., 2007) (Fig. 12).

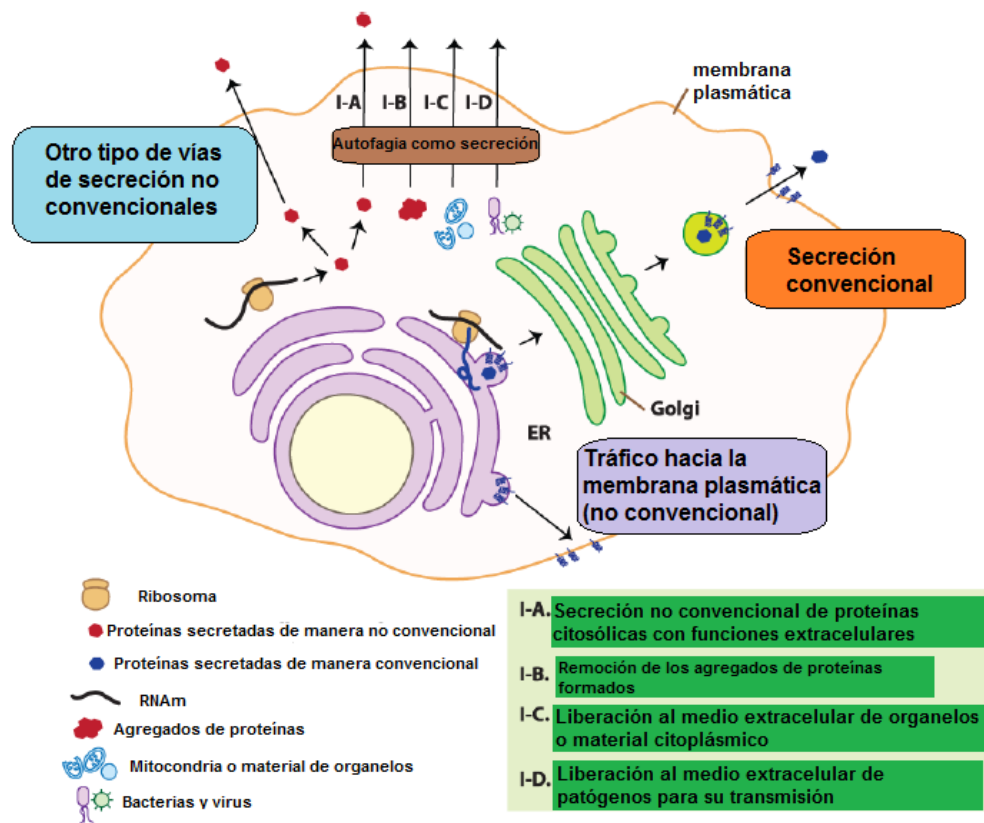


Figura 12. Vías de secreción no convencional. Se muestran las vías de secreción no convencional, donde se propone a la autofagia como una de ellas (Tomado de Ponpuak y col., 2015).

En el caso de *T. vaginalis* otra de las funciones de la autofagia además de la sobrevivencia es que posiblemente participa en la relocalización de proteínas metabólicas hidrogenosomales hacia la membrana del parásito (Brennan y

col., 2011), ya que estudios realizados por microscopía electrónica demuestran que la PFO (piruvato:ferredoxin oxidoreductasa) se localiza en la superficie del parásito como adhesina (AP120) (Moreno-Brito y col., 2005; Meza-Cervantez y col., 2011) cuando el parásito se cultiva en altas concentraciones de hierro. Por lo que se propone que sea a través de la autofagia del hidrogenosoma el mecanismo por el cual esta enzima llega a la superficie y funcione como adhesina en altas concentraciones de hierro.

2. Justificación

Trichomonas vaginalis es un parásito con proteínas multifuncionales cuya localización y función dependen de las condiciones ambientales. Tal es el caso de la PFO-A que al ser una enzima hidrogenosomal también se le encuentra en membrana plasmática como la adhesina AP120 en altas concentraciones de hierro en donde se observa un aumento de los niveles de adhesión; sugiriendo un mecanismo inducido por hierro.

Con estos antecedentes nos preguntamos: ¿Participa la autofagia del hidrogenosoma inducida por alto hierro como un evento inicial para la relocalización de la AP120/PFO-A a la membrana plasmática del parásito?

3. Hipótesis

En *Trichomonas vaginalis* la proteína TvAtg8b participa en la formación del autofagosoma como respuesta típica autofágica al estrés por restricción de glucosa o hierro. Sin embargo, en condiciones de alto hierro ocurre una autofagia organelo específica (hidrogenofagia) utilizada como vía de transporte para la proteína hidrogenosomal AP120/PFO-A hacia la membrana plasmática para funcionar como adhesina.

4. Objetivo General

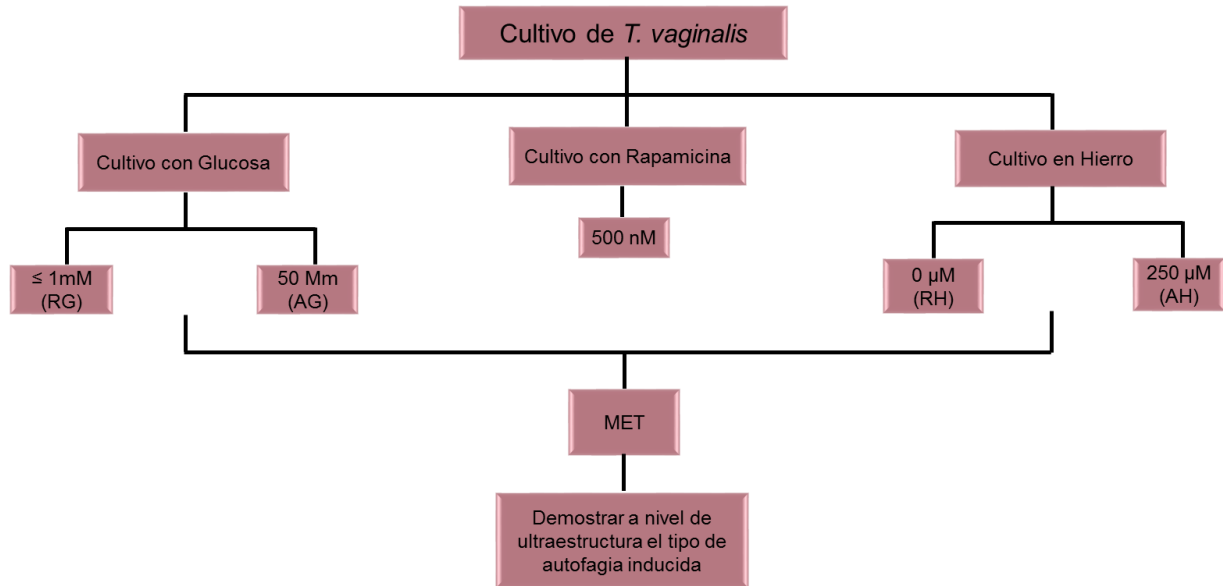
Estudiar la biogénesis del autofagosoma, la participación de la proteína Atg8b en el proceso autofágico y la autofagia de hidrogenosomas de *T. vaginalis* como una posible vía de relocalización de AP120/PFO-A hacia la membrana plasmática bajo diferentes condiciones inductoras del proceso autofágico.

4.1. Objetivos Particulares

1. Comparar a nivel de ultraestructura diferentes condiciones inductoras de autofagia.
2. Analizar la expresión a nivel de proteína y localización de Atg8 en *T. vaginalis* en diferentes condiciones inductoras de autofagia.
3. Describir la biogénesis del autofagosoma en las diferentes condiciones inductoras de autofagia.
4. Analizar la localización de AP120/PFO-A en condiciones inductoras de autofagia.
5. Estudiar la relocalización de AP120/PFO-A a la superficie del parásito en alto hierro y en presencia de inhibidores de autofagia.

5. Estrategias Experimentales

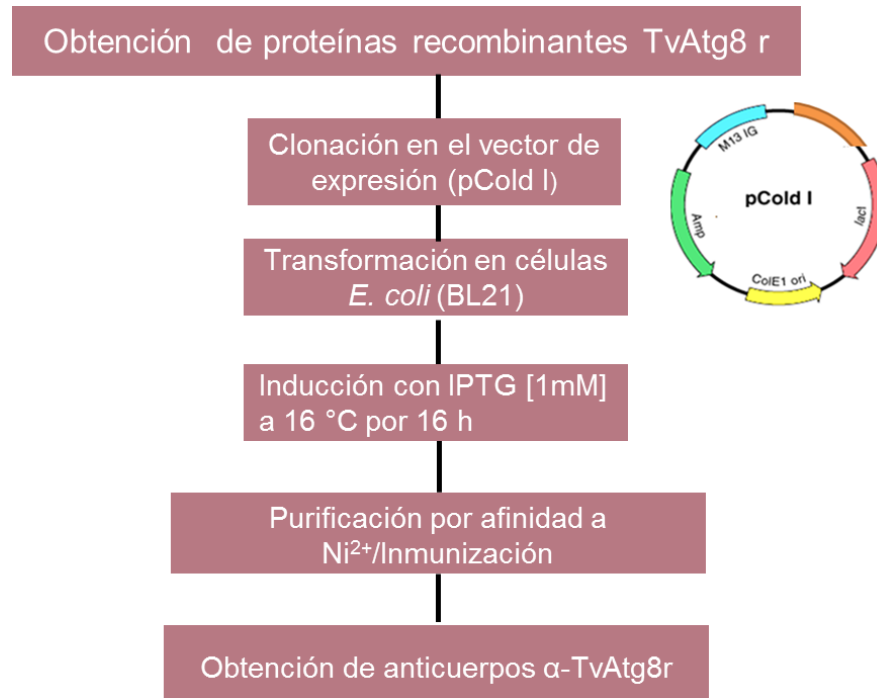
1. Comparar a nivel de ultraestructura diferentes condiciones inductoras de autofagia.



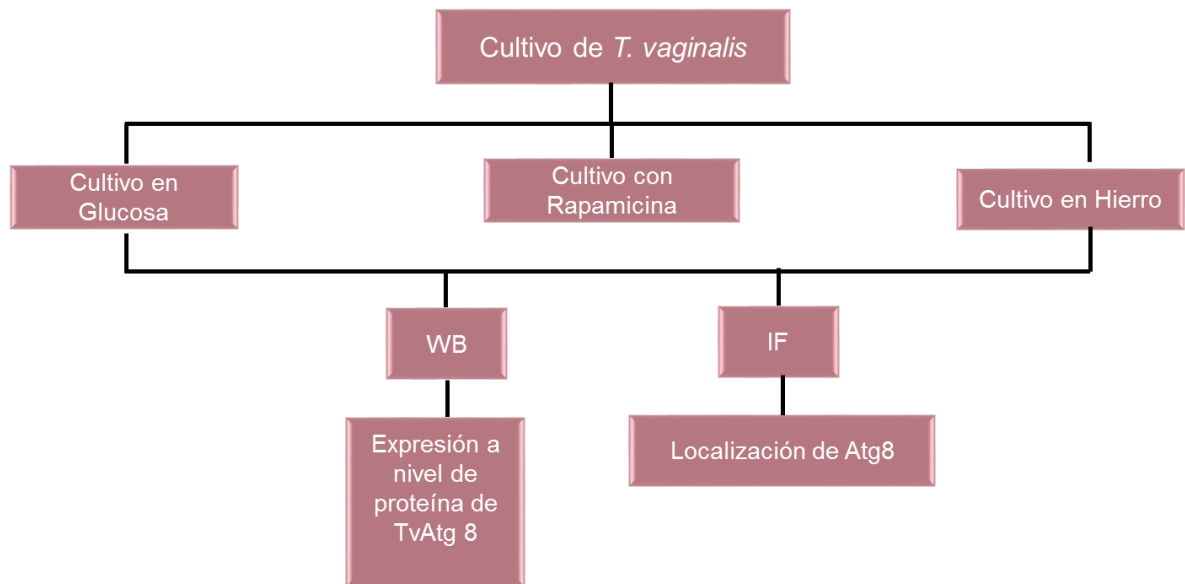
Con este objetivo se pretende responder la siguiente pregunta: ¿Cualquier condición inductora de autofagia induce la autofagia selectiva de hidrogenosoma?

2. Analizar la expresión a nivel de proteína y localización de Atg8 en *T. vaginalis* en condiciones inductoras de autofagia.

2.1. Clonar y expresar las proteínas recombinantes Atg8 de *T. vaginalis*.

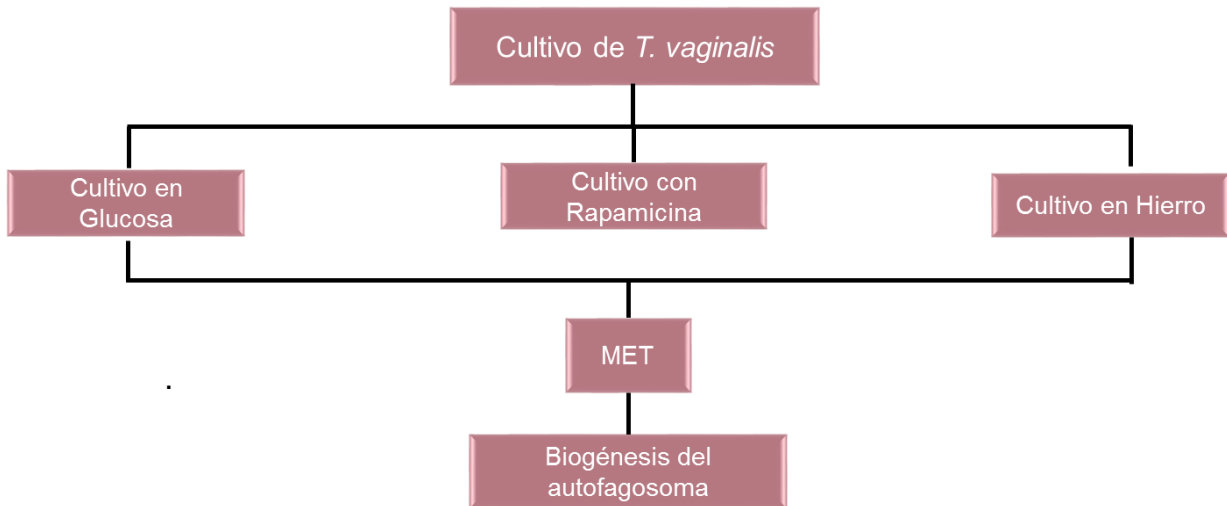


2. Analizar la expresión a nivel de proteína y localización de Atg8 en *T. vaginalis* en condiciones inductoras de autofagia.



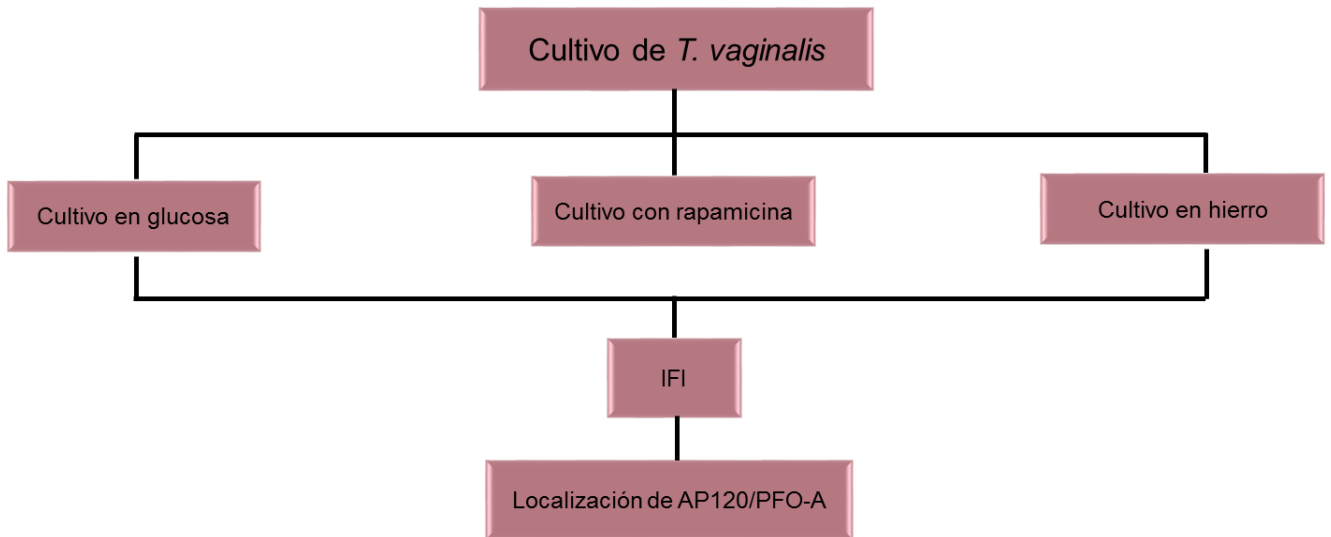
¿Porqué es importante seguir la expresión de Atg8? La detección de esta proteína es importante ya que es el marcador específico de autofagia, dado que se ancla a la membrana del autofagosoma, organelo característico de este proceso.

3. Describir la biogénesis del autofagosoma en las diferentes condiciones inductoras de autofagia.



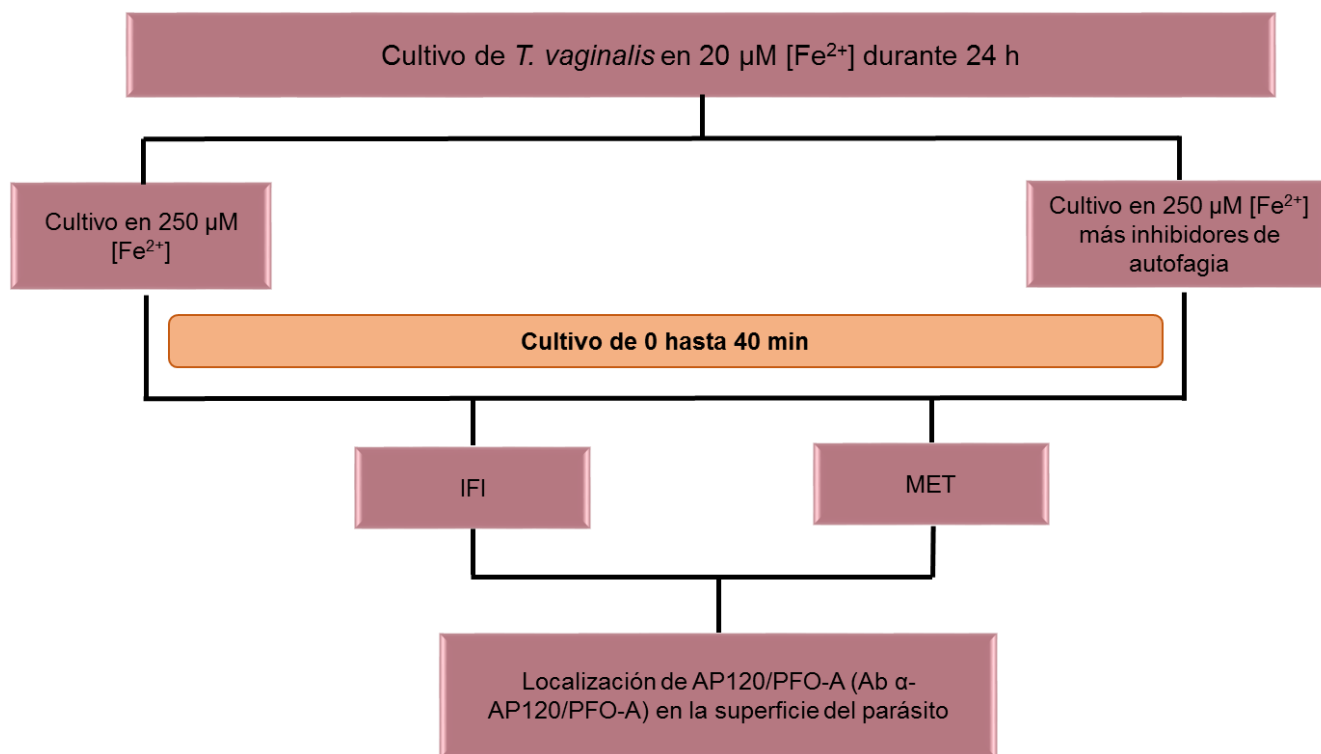
¿Porqué es importante visualizar la formación de este organelo? La presencia de los diferentes pasos de la formación del autofagosoma, confirmarían un proceso autofágico activo presente en la diferentes condiciones ambientales.

4. Analizar la localización de PFO/AP120 en *T. vaginalis* en condiciones inductoras de autofagia.



Con este objetivo se pretende responder la siguiente pregunta: ¿Se requiere de la autofagia de hidrogenosoma inducida por alto hierro para relocalizar a PFO-A del hidrogenosoma a la superficie del parásito?

5. Estudiar la relocalización de AP120/PFO-A del hidrogenosoma hacia la superficie del parásito en la condición de alto hierro, utilizando inhibidores de autofagia.



Con este objetivo se pretende responder la siguiente pregunta: ¿Si se inhibe la autofagia, AP120/PFO-A ya no se relocaliza a la membrana plasmática de *T. vaginalis*?

6. Materiales y Métodos

6.1. Cultivo de parásitos

Parásitos de *T. vaginalis* ($3.75 \times 10^6/30$ ml) del aislado CNCD 188 (Centro Nacional de Clínicas de Displasias del Hospital General de México) de una semana de descongelación se cultivaron por 24 h a 37°C en medio triptona-extracto de levadura-maltosa (TYM) (apéndice), el cual contiene 20 μ M de hierro (condiciones normales, N) con 10% de suero de bovino adulto (SBA) inactivado por calor, para obtenerlos en fase logarítmica de crecimiento. Para los cultivos suplementados con altas (AH) o bajas (RH) concentraciones de hierro, se agregó al medio la solución de sulfato ferroso amoniacal a una concentración final de 250 μ M (apéndice) o 2,2-dipiridilo (agente quelante de hierro) (Cat. No. D-7505, Sigma-Aldrich) a una concentración final de 150 μ M (apéndice) ~18 h antes de agregar el inóculo de parásitos. Para los ensayos de glucosa, los parásitos se crecieron a 37 °C en medio triptona-extracto de levadura (TY) suplementado con 10% SBA y con glucosa ((D(+)-Glucosa anhidra), Cat. No. 15866, Merck) a una concentración final de 50 mM (alta glucosa; AG) durante 3 días, al cuarto día se iniciaron los ensayos con cultivos en AG o en restricción de glucosa (RG) sin adicionar glucosa al medio TY-10% SBA (concentración final de glucosa ≤ 1 mM proveniente de los componentes del medio). Para los ensayos con Rapamicina (Rapa; Cat. No. R8781, Sigma-Aldrich), los parásitos se cultivaron con este inductor a una concentración final de 500 nM en medio TYM suplementado con 10% SBA durante 12 h a 37 °C (en el apartado de resultados se muestra la viabilidad celular y la razón por la cual se eligió esta concentración final y este tiempo).

6.2. Procesamiento de muestras para estudio ultraestructural por microscopía electrónica de transmisión (MET)

6.2.1. Fijación

Los parásitos (30×10^6) lavados con PBS pH 7.0 se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en cacodilato de sodio 0.1 M durante 1 h a temperatura ambiente (TA),

se centrifugaron a 2, 300 rpm durante 5 min a TA, se hicieron cuatro lavados con amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M; entre cada lavado la muestra se centrifugó a 2, 500 rpm durante 5 min a TA. Luego se post-fijó con tetraóxido de osmio (OsO_4) 1% en cacodilato de sodio 0.1 M conteniendo ferri-cianuro de potasio 1.5% por 20 min a TA, (a partir de aquí las muestras van protegidas de la luz), se centrifugó a 2, 600 rpm por 5 min a TA, se hicieron tres lavados con cacodilato de sodio 0.1 M centrifugando a 2, 300 rpm por 6 min a TA, se realizó un lavado con agua bidestilada centrifugando a 2, 300 rpm por 6 min a TA.

6.2.2. Deshidratación

Las muestras se deshidrataron con concentraciones graduales de alcohol etílico de 25%, 50%, 70%, 90% y dos veces con 100%. Con cada porcentaje de alcohol se incubó 10 min en movimiento (agitación orbital) a TA. Entre cada uno se centrifugó a 2, 300 rpm por 5 min a TA. Por último, los parásitos se trataron con óxido de propileno por 10 min a temperatura ambiente en movimiento y protegidos de la luz, se centrifugó a 2, 300 rpm por 5 min a TA para eliminar el óxido de propileno (Polyscience, Inc.).

6.2.3. Preinclusión

Para la preinclusión, las muestras se dejaron en una mezcla 1:1 de resina Poly/Bed 812 (Kit Polyscience, Inc.) y óxido de propileno durante toda la noche en movimiento a TA.

6.2.4. Inclusión

Los parásitos se centrifugaron a 2, 300 rpm por 10 min a TA, se decantó el sobrenadante y se añadió una mezcla de 2:1 de resina Poly/Bed 812 y óxido de propileno por 1.5 h a TA, se centrifugó a 2, 300 rpm por 10 min a TA, se hicieron dos cambios de resina Poly/Bed 812 pura (dos cambios durante 80

min cada uno) se centrifugó a 3, 000 rpm por 20 min a TA. La muestra se cubrió bien con la resina nueva, se etiquetó y se polimerizaron las muestras en un horno a 56 °C por 24 o 48 h para que la resina polimerizara.

6.2.5. Corte

La pirámide se talló y se realizaron los cortes en el ultramicrotomo iniciando con una cuchilla de vidrio, para obtener cortes semifinos; los cuales se recogieron con ayuda de un asa y se tiñeron con azul de toluidina. Este colorante se calentó en la parrilla hasta que la superficie del colorante mostró un tono metálico, entonces se lavó con agua destilada y la muestra se observó en el microscopio óptico y se ubicó dentro de la pirámide el sitio para iniciar los cortes finos, los cuales se realizaron mediante una cuchilla de diamante y se colocaron en rejillas de cobre de 300 cuadros.

6.2.6. Contraste

Para contrastar los cortes se montó una cámara libre de humedad (con perlas de NaOH), dentro de la cámara se añadieron gotas de acetato de uranilo 5% (cada gota corresponde a una rejilla), las rejillas se colocaron sobre las gotas de uranilo de tal manera que los cortes estuvieran en contacto con la solución durante 20 min, se lavaron con agua bidestilada y se dejaron secar sobre papel filtro. En la misma cámara se añadieron gotas de citrato de plomo, las rejillas se incubaron durante 1 min y se enjuagaron con agua bidestilada. Por último, las rejillas se secaron sobre papel filtro y se observaron al microscopio electrónico de transmisión (JEM-1011, JEOL Ltd., Tokio, Japón).

NOTA: En los resultados se muestran las imágenes representativas de cada condición. Se cuenta con una fototeca de cada condición, en la cual hay un mínimo de 10 imágenes por condición.

6.3. Ensayo RT-PCR

Para amplificar los genes *tvatg8a* y *tvatg8b* encontrados en el genoma de *T. vaginalis* (Carlton y col., 2007), se diseñaron oligonucleótidos específicos como iniciadores para cada uno de los genes (Sigma-Aldrich) en sentido (5'-ATGTTTTTCATCAAAGAACGAATCTCGCTACAAACGCG-3') y en antisentido (3'-TTAATTAGAGCCGAATGAGTTATCAGAGCTG-5') para el gen *tvatg8a*. Para el gen *tvatg8b* se usaron estos oligonucleótidos en sentido (5'-ATGGAGTTGCAAAGTCTTGACAGATC-3') y en antisentido (3'-TCACAAAAATCCGTAAGCAGAGTCAG-5'). La mezcla para la RT-PCR se realizó en tubos con paredes delgadas de 0.6 ml y como volumen final 50 μ l, añadiendo un volumen de agua inyectable de 30.5 μ l, amortiguador de la enzima Easy-A 10 \times con MgCl₂ 5 μ l, 1 μ l de deoxirribonucleótidos trifostatados (dNTPs) 10 mM (dATP, dTTP, dGTP y dCTP), 0.5 μ l de la enzima de alta fidelidad Easy-A (Agilent Technologies; Stratagene), 1 μ l de cada par de iniciadores correspondiente para cada gen y 3 μ l de cDNA (100 ng/ μ l). Como controles: (+) se utilizó DNA genómico (3 μ l), (-) sin el DNA templado, como control de carga β -*tubulina* y como control de RT se utilizó el RNA tratado con DNasa I. Las condiciones de RT-PCR fueron las siguientes: desnaturalización a 94 °C 2 min 1 ciclo, desnaturalización a 94 °C, alineamiento a 55 °C, extensión a 72 °C 1 min; estas tres etapas por 30 ciclos; la extensión final a 72 °C 7 min 1 ciclo y enfriamiento a 4 °C hasta su análisis.

Para el gen *tvatg4* (TVAG_023970) se diseñaron oligonucleótidos específicos como iniciadores, en sentido (5'-GGGAACCACCATCATACAATCT-3') y en antisentido (5'-CAACTTCCCAGTCGTCTTCTAC-3'). La mezcla para la RT-PCR se realizó igual que arriba mencionado, lo que cambió fueron las condiciones de PCR, las cuales fueron las siguientes: desnaturalización a 94 °C 2 min 1 ciclo, desnaturalización a 94 °C, alineamiento a 55 °C, extensión a 72 °C; estas tres etapas 1 min 25 ciclos; la extensión final a 72 °C 7 min 1 ciclo y enfriamiento a 4 °C hasta su análisis.

6.4. Extracción de DNA plasmídico por el kit “GENE JET™ PLASMID MINIPREP KIT PROMEGA-FERMENTAS”

Los cultivos bacterianos provenientes del glicerol de la clona 1 (DH5α) del gen *tvatg8b* se centrifugaron a 8 000 rpm durante 2 min a 4 °C en tubos Eppendorff de 1.5 ml, las pastillas se resuspendieron en 250 µl de la solución de resuspensión, se agregaron 250 µl de la solución de lisis mezclando por inversión, se agregaron 350 µl de la solución de neutralización mezclando inmediatamente por inversión, se centrifugó a 13 000 rpm durante 5 min para precipitar el DNA cromosomal, el sobrenadante se transfirió a la columna del kit “Gene JET™”, se centrifugó a 13 000 rpm durante 1 min a 4 °C, se descartó el eluido, se agregó 500 µl del amortiguador de lavado, se centrifugó a 13 000 rpm a 4 °C, se descartó el eluido y el DNA plasmídico (DNAp) se eluyó en 40 µl de agua inyectable. Se almacenó a -20 °C. Se verificó la extracción del DNAp en un gel de agarosa al 1.5% en TBE 1x (apéndice).

6.5. Amplificación por PCR del inserto *tvatg8a/b* con los sitios de corte para las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III

Para amplificar el gen *tvatg8a* (TVAG_486080) encontrado en el genoma, se diseñaron oligonucleótidos específicos (Sigma-Aldrich) en sentido (5'-GGCGGGATCCATGTTTTTCATCAAAGAACGAATCTCGCTACAAACGCG-3') el cual tiene el sitio de corte para *Bam*HI y en antisentido (3'-GGCGAAGCTTTTAATTAGAGCCGAATGAGTTATCAGAGCTG-5') para el gen *tvatg8a*. Para el gen *tvatg8b* (TVAG_239800) encontrado en el genoma, se diseñaron oligonucleótidos específicos (Sigma-Aldrich) en sentido (5'-GGCGGGATCCATGGAGTTGCAAAGTCTTGACAGATC-3'), el cual tiene el sitio de corte para *Bam*HI y en antisentido (5'-GGCGAAGCTTTCACAAAAATCCGTAAGCAGAGTCAG-3'), el cual tiene el sitio de corte para *Hind*III. La mezcla para la PCR se realizó en tubos con paredes delgadas de 0.6 ml y como volumen final 50 µl, añadiendo un volumen de agua inyectable de 41 µl, amortiguador de la enzima Easy-A 10x con MgCl₂ 5 µl, 1 µl de deoxirribonucleótidos trifostados (dNTP's) 10 mM (dATP, dTTP,

dGTP y dCTP), 0.4 μ l de la enzima de alta fidelidad Easy-A (Agilent Technologies; Stratagene), 0.3 μ l de cada uno de los iniciadores y 2 μ l de DNA plasmídico (DNAp) (100 η g/ μ l). Como controles: (+) se utilizó DNA genómico (2 μ l), (-) sin el DNA templado. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización a 94 °C 2 min 1 ciclo, desnaturalización a 94 °C 1 min, alineamiento a 57 °C 30 seg, extensión a 72 °C 1 min; 30 ciclos; la extensión final a 72 °C 7 min 1 ciclo y enfriamiento a 4 °C hasta su análisis. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1x.

6.6. Purificación del producto de PCR

A partir de un gel preparativo de agarosa al 2% en TBE 1x, se prosiguió a realizar la purificación del fragmento de DNA con el kit QIAGEN (QIAquick gel extraction kit 250; Cat. No. 28706; Lot. No. 130157007) cortando el fragmento de agarosa (con el producto de interés) con un bisturí estéril en un transiluminador de luz ultravioleta, los fragmentos se colocaron en tubos Eppendorff de 1.5 ml, se agregó a cada tubo 800 μ l del amortiguador QG, se incubó a 50 °C por 10 min mezclando por inversión cada 2 o 3 min durante la incubación. Después de que el gel se disolvió completamente, se revisó el color de la mezcla la cuál debía tener un color similar al del amortiguador QG, en caso contrario se añadieron 10 μ l de acetato de sodio 3 M pH 5.0 (apéndice). Para la purificación del DNA se tomaron 1.6 ml y se colocaron en la columna de purificación del Kit, se centrifugó a 13 000 rpm durante 1 min a 4 °C; para que se una el DNA a la columna; se descartó el eluido, se le añadió 500 μ l del amortiguador QG a la columna, se centrifugó a 13 000 rpm durante 1 min a 4 °C, se descartó el eluido, se agregó 750 μ l del amortiguador PE a la columna y se centrifugó a 13 000 rpm durante 1 min a 4 °C. A la columna se le dio una última centrifugación adicional para eliminar el etanol residual. Para eluir el DNA se agregaron 30 μ l de agua inyectable y antes de centrifugar se dejó 5 min a temperatura ambiente. La purificación del DNA se verificó en un gel de agarosa al 1.5% en TBE 1x. El DNA purificado se almacenó a -20 °C.

6.7. Ligación en el vector pGEM[®]T easy

Para clonar y secuenciar el amplicón obtenido por PCR, se preparó la siguiente mezcla de ligación en un tubo de 0.6 ml, se añadió 6 µl del amortiguador de ligación 2× (Promega), se agregó 8 µl del inserto purificado (*tvatg8a/b*), se añadió 1 µl del DNA vector (pGEM[®]T 50 ηg/µl Promega) y se agregó 1 µl de T4 DNA ligasa (100 U, Promega), se homogenizó cuidadosamente y la mezcla se incubó toda la noche a 4 °C.

6.8. Transformación de células competentes JM109

Las células competentes se colocaron en hielo (4 °C), para que se descongelaran, dos viales de JM109, se les añadió 10 µl de reacción de ligación para cada vial de células competentes, se incubaron en hielo durante 30 min, se dio un choque térmico a las células a 42 °C por 45 s y se colocaron en hielo durante 2 min. Las células se resuspendieron en 1 ml de medio LB (Medio Luria-Bertani) (apéndice) a 37 °C, se incubaron durante 2 h con 20 min a 37 °C en agitación constante (200 rpm), se centrifugó a 13, 000 rpm durante 1 min a 4 °C, se descartó 800 µl del sobrenadante, las bacterias se resuspendieron con 20 µl de LB y se espatularon con la varilla de vidrio en LB agar (apéndice) (20 ml de medio LB agar, 20 µl de ampicilina 100 µg/ml, 100 µl de IPTG 0.5 mM y 20 µl de X-Gal 50 mg/ml) y se incubó toda la noche a 25 °C, para observar el crecimiento de colonias blancas/azules.

En este paso se realizó la extracción del DNAp con kit para la secuenciación y para realizar la doble digestión, seguido de la purificación del inserto con kit para finalmente ligar al inserto con el vector de expresión pColdI.

6.9. Caracterización de las clonas positivas mediante secuenciación de DNA

La secuenciación del DNAp de las clonas seleccionadas se realizó por el método de Sanger con iniciadores universales (T7 “promotor” y M20 “reverse”) en el secuenciador automático del Instituto de Biología de la UNAM.

Posteriormente, la traducción teórica de la secuencia se realizó con los programas DNAMAN y MUSCLE (3.8).

6.10. Caracterización de las clonas positivas mediante doble digestión (DD) con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III

El DNAp de la construcción pGEM®-T Easy/*tvatg8a/b* (5 µg) se trató con las enzimas de restricción que generan extremos cohesivos (*Bam*HI y *Hind*III) de acuerdo a las siguientes condiciones de reacción, en un volumen final de reacción de 50 µl en tubos de 0.6 ml. Al tubo se añadió 22.5 µl de agua inyectable, Buffer 2 (New England, BioLabs.) 5 µl equivalentes a una concentración final 1x, 0.5 µl de BSA 100x, equivalente a una concentración final 1x, 3 µl de cada una de las enzimas de restricción (*Bam*HI y *Hind*III). La reacción se incubó a 37 °C durante 3 h. Se corroboró la DD por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% en TBE 1x.

El inserto liberado se purificó nuevamente utilizando el Kit QIAquick®, corroborando su purificación mediante la electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% en TBE 1x, se almacenó a -20 °C.

6.11. Clonación y expresión de las proteínas *TvAtg8a* y *TvAtg8b* en un sistema procarionte

El vector pColdI tiene un tamaño de 4, 407 pb, un marcador de resistencia a ampicilina y una secuencia de 6 histidinas en el N-terminal para la purificación de la proteína recombinante por afinidad a níquel. Para la subclonación del gen *tvatg8a/b* se utilizó el inserto liberado mencionado en la metodología anterior. Se extrajo DNap del vector vacío el cual fue linearizado usando primero la enzima *Hind*III, con la siguiente condición de reacción: Volumen total de 50 µl en tubos de 0.6 ml. Se añadió 23.25 µl de agua inyectable, Buffer 2 (New England, BioLabs.) 5 µl equivalentes a una concentración final 1x, 3 µl de la enzima de restricción *Hind*III y 6 µg de DNAp. La reacción se incubó a 37 °C durante 3 h. Se corroboró la linearización por electroforesis en un gel de

agarosa al 1.5% en TBE 1x, seguido de la purificación del vector linearizado con el Kit QIAquick®, corroborando su purificación mediante la electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% en TBE 1x. Se trató con la enzima de restricción *Bam*HI, se utilizó la siguiente condición de reacción: Volumen total de 50 µl en tubos de 0.6 ml, se añadió 15 µl de agua inyectable, Buffer 3 (New England, BioLabs.) 5 µl equivalentes a una concentración final 1x, 3 µl de la enzima de restricción *Bam*HI y 5 µg de DNAp, incubándose a 37 °C por 3 h. Sólo el vector se trató con 1 µl de la enzima fosfatasa alcalina (CIP) (New England, BioLabs.) a 50 °C por 2 h. Se adicionó esta enzima principalmente para quitar los grupos fosfatos el extremo 5´ y 3´ y de este modo evitar que el vector se religue. Se volvió a purificar el vector con el Kit QIAquick®, obteniendo un volumen final de 40 µl del purificado.

El vector pColdI y los insertos de 372 pb del gen *tvatg8a* y el de 342 pb del gen *tvatg8b* se ligaron en una proporción 1:3 (vector: inserto) usando 0.5 µl de T4 DNA ligasa 40, 000 U (BioLabs) en una reacción de 20 µl, incubando toda la noche (aprox 16 h) a 16 °C. Para la inactivación de la ligasa, la reacción de ligación se incubó a 65 °C durante 10 min.

Después, en las células competentes *E. coli* (DH5α) (50 µl) el DNAp se transformó con 5 µl de reacción de ligación, se incubaron en hielo durante 30 min, se les dio un choque térmico a 42 °C por 45 seg, se colocaron en hielo durante 2 min, se adicionó 900 µl de medio LB y se incubó 37 °C durante 1 h con agitación constante (200 rpm), se centrifugó a 8 000 rpm durante 2 min a 4 °C, descartando el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 20 µl de medio LB y estrió en una placa de LB agar-ampicilina (100 µg/ml). Para determinar la presencia del inserto se obtuvo el DNAp por lisis alcalina, se analizó mediante PCR con los oligos específicos del vector pColdI; sentido (5´-ACGCCATATCGCCGAAAGG-3´) y antisentido (5´-TGGCAGGGATCTTAGATTCTG-3´) y por restricción con las enzimas usadas en la clonación (*Bam*HI y *Hind*III). Los productos de PCR así como las DD se

analizaron en un gel de agarosa al 1.5% en TBE 1x. Las clonas positivas se almacenaron con glicerol al 10% a -72 °C.

6.12. Miniprep lisis alcalina para la obtención de DNAp

Para obtener el DNAp, de los cultivos bacterianos en un volumen de 5 ml se tomaron alícuotas en tubos Eppendorff de 1.5 ml, se centrifugó a 13 000 rpm por 1 min entre cada alícuota. Cada pastilla de bacterias obtenida se resuspendió con 100 µl de solución I (apéndice) fría y se mezcló por inversión. A cada tubo se le agregaron 200 µl de solución II (apéndice) fresca (se prepara al momento), se mezcló por inversión dejando en hielo; inmediatamente después se adicionó 150 µl de solución III (apéndice) fría, se mezcló suavemente por 10 s, se incubó en hielo 5 min y se centrifugó a 13 000 rpm durante 5 min. Se recuperaron los sobrenadantes en tubos nuevos y se realizaron las extracciones fenol-cloroformo. La primera extracción fue con un volumen 1:1 de fenol:cloroformo, se homogenizó por inversión y se centrifugó a 13 000 rpm por 5 min. Las fases acuosas se transfirieron a tubos nuevos, se realizó la segunda extracción con un volumen de cloroformo, se homogenizó por inversión y se centrifugó a 13 000 rpm durante 3 min a 4 °C y se transfirieron las fases acuosas a tubos nuevos. Posteriormente, se precipitaron los ácidos nucleicos de la fase acuosa con 2 volúmenes de etanol absoluto a -20 °C durante 2 h, se centrifugó a 13 000 rpm durante 10 min, las pastillas se lavaron con 1 ml de etanol al 70%, se centrifugó a 13 000 rpm durante 5 min a 4 °C y las pastillas se resuspendieron en 30 µl de agua inyectable, se agregó 1 µl de RNAsa A y se incubó a 37 °C por 2.5 h. Los DNAp obtenidos de las clonas se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% en amortiguador TBE 1x.

6.13. Transformación de células competentes BL21 (DE3) de *E. coli*

Las células competentes se colocaron en hielo (4 °C), para que se descongelaran, dos viales de BL21 (DE3), se les añadió 2 µl de DNAp para

cada vial de células competentes, se incubaron en hielo durante 30 min, se dio un choque térmico a las células a 42 °C por 45 s y se colocaron en hielo durante 2 min. Las células se resuspendieron en 1 ml de medio LB a 37 °C, se incubaron durante 1 h con 20 min a 37 °C en agitación constante (200 rpm), se centrifugó a 13 000 rpm durante 1 min a 4 °C, se descartó 800 µl del sobrenadante, las bacterias se resuspendieron con 20 µl de LB y se espatularon con la varilla de vidrio en placas LB agar-ampicilina (100 µg/ml), y se incubó toda la noche a 37 °C.

6.14. Inducción de las proteína recombinantes TvAtg8a y TvAtg8b con IPTG

La inducción de las proteínas recombinantes se realizó de acuerdo al manual del sistema pColdI (TAKARA-BIO Inc., Japón). Para ello, se agregó 12 ml de medio LB con ampicilina (100 µg/ml) a dos tubos cónicos de 50 ml, los cuales se inocularon con las bacterias transformadas, los cultivos se incubaron a 37 °C con agitación constante (200 rpm), hasta que alcanzaron una densidad óptica de 0.6 a 600 nm. La inducción se realizó con IPTG 1 mM a 16 y 37 °C por 3 h.

El análisis de la expresión de las proteínas recombinantes a diferentes temperaturas se visualizó por electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) en geles de poliacrilamida al 12 % y con ensayos de WB con el anticuerpo monoclonal α -His Tag (Sigma-Aldrich). Las proteínas de cada una de las pastillas obtenidas de los cultivos, se solubilizaron con amortiguador de muestra 1x (BM1x) (apéndice) y se hirvieron por 3 min.

Para saber si las proteínas recombinantes eran solubles, los cultivos se centrifugaron a 8 000 rpm durante 10 min a 4 °C para obtener una pastilla de bacterias, la cual se resuspendió de acuerdo a la siguiente regla: Por cada gramo de pastilla se agregó 4 ml del amortiguador de lisis (NaCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7.5, EDTA 2 mM), los lisados se sonicaron en frío dándoles 6 ciclos de 30 seg con 10 seg de reposo y 40 % de Amplitud. Después, los

lisados de bacterias se centrifugaron a 7 000 rpm durante 10 min a 4 °C. La pastilla obtenida cuerpos de inclusión (CB) así como el sobrenadante (fracción soluble, FS) se analizaron por SDS-PAGE al 12%.

6.15. Solubilización de los cuerpos de inclusión (CB)

Ambas proteínas recombinantes se encontraron en los CB, por lo que antes de purificarlas teníamos que solubilizar dicha fracción. Para la solubilización de los CB se realizó lo siguiente: Se realizaron 3 pasos de lavado de la fracción insoluble, resuspendiendo la pastilla en cada uno de los amortiguadores de lavado, dejando en agitación orbital durante 15 min a TA, seguido de una centrifugación a 13 000 rpm durante 20 min a 4 °C y eliminando el sobrenadante, se realizó 2 veces con cada amortiguador.

Amortiguador de lavado I: (NaCl 500 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8.0, Urea 2 M, Tritón X-100 2% v/v), utilizando 5 ml del amortiguador por 1 g de biomasa.

Amortiguador de lavado II: Tris-HCl 20 mM pH 8.0, DTT 1 mM, GnHCl 2 M.

Amortiguador de lavado III: Tris-HCl 20 mM pH 8.0, DTT 1 mM, sarcosil 2% p/v.

Se resuspendió en amortiguador de solubilización (NaCl 0.1 M, Tris-HCl 20 mM pH 8.0, Urea 8 M, β -mercaptoetanol 1 mM, Imidazol 5 mM) y se mantuvo en agitación constante a temperatura ambiente toda la noche y finalmente se centrifugó a 13 000 rpm durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante se filtró a través de una unidad de filtración de 0.45 μ m.

6.16. Purificación de las proteínas recombinantes por afinidad a níquel

Para la cromatografía de afinidad a níquel, la fracción de CB_{solubilizados} obtenida con la metodología mencionada en la parte superior se pasó por una resina de níquel utilizando columnas comerciales His-TrapTMFF 1 ml (Ni Sepharose) y Sepharose 6 Ni (GE Healthcare). Primeramente, la columna se hidrató, se

equilibró con amortiguador de unión (apéndice) y se pasó la fracción de CB_{solubilizados}, previamente filtrada. Posteriormente, la columna se lavó con el amortiguador de lavado 1 y lavado 2 (apéndice) y la proteína se eluyó con el amortiguador de elución (apéndice). La proteína recombinante purificada se visualizó en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) geles de poliacrilamida al 12 %.

6.17. Uso de columna de intercambio iónico pD10

Se utilizó una columna de intercambio iónico pD10 (GE Healthcare) para remover las sales. Primero, se hidrató la columna, y después se equilibró con amortiguador de fosfatos salino pH 7.0 (PBS pH 7.0) (apéndice) y se pasó la fracción E1 y E2 de la metodología anterior y la proteína se eluyó con el amortiguador de fosfatos pH 7.0. La proteína recombinante solubilizada en PBS pH 7.0 se visualizó en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12%.

6.18. Producción de anticuerpos policlonales anti- TvAtg8a y anti- TvAtg8b en conejo

Para producir anticuerpos policlonales contra la proteína TvAtg8b se inmunizó un conejo macho de 6 semanas de edad (New Zealand). El suero preinmune control se obtuvo antes de inmunizar al conejo. La inmunización en conejo se realizó vía subcutánea, macerando la banda de acrilamida que correspondía al reconocimiento dado por el anticuerpo anti-His Tag en ensayos de WB.

Se realizó de acuerdo al siguiente esquema de inmunización.

Nombre del Ab	Antígeno	Huésped	Adyuvante completo de Freud	Adyuvante incompleto de Freud	Titter max gold	Inmunizaciones	Vía de Administración	Sangrados	Contra que fue probado
R α -TvAtg8	La banda del gel de acrilamida	R=Rabbit (conejo)	Sí (primera inmunización)	Sí (a partir de la segunda inmunización)	No	7	Vía Subcutánea	6	rTvAtg8b

La reactividad de los sueros entre las inmunizaciones se revisó por ensayos de WB cada mes utilizando a la proteína rAtg8b como antígeno, hasta alcanzar el título adecuado. El conejo finalmente se sangró a muerte para obtener el suero total.

6.19. Selección del tipo de amortiguador de lisis para la detección de la proteína LC3 (ortólogo de Atg8) en células HeLa

Para este ensayo, se partió de la cosecha de un cultivo de células HeLa en presencia del inductor de autofagia (500 nM de Rapamicina) durante 12 h. Primero, se desechó el sobrenadante y para favorecer que se despegaran las células, se incubó con PBS-EDTA 0.2% durante 10 min, se pipeteo tres veces, recuperando el sobrenadante, el cual se centrifugó a 1, 800 rpm durante 5 min a 4 °C, se hicieron 3 lavados con PBS pH 7.0, se resuspendió la pastilla y se centrifugó a 1, 800 rpm durante 5 min a 4 °C, se resuspendieron 3×10^6 células con el amortiguador de lisis A (Tris HCl 500 mM pH 6.8, EDTA 10 mM, NaCl 150 mM, IGEPAL®CA-630 (Cat. No. I8896-100ML, Sigma-Aldrich) 1%) y 3×10^6 células se resuspendieron con el amortiguador de lisis B (Tris HCl 500 mM pH 8.0, NaCl 300 mM, glicerol al 10%, Tritón X-100 1%). Ambos amortiguadores fueron suplementados con 1x de cocktail de inhibidores (cOmlplete, Cat. No. 04 693 116 001, Roche), se incubó en hielo 30 min, vortexeando cada 10 min, se centrifugó a 14, 000 rpm durante 15 min a 4 °C, se recuperó el sobrenadante, se añadió BM2x para geles de tricina (apéndice)

en una relación 1:1. La muestra se hirvió durante 5 min y se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 min a 4 °C.

6.20. Electroforesis de lisados proteicos en geles de tricina y electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa

El gel separador se preparó: 1) 3.52 ml de agua bidestilada, 2) 4.9 ml de 30% acrilamida/0.8% bisacrilamida (apéndice), 3) 5.0 ml de Tris-Cl/SDS pH 8.45, 4) 1.59 ml de glicerol, 5) 75 µl de persulfato de amonio (PSA) 10% (w/v) (apéndice) y 6) 15 µl de TEMED. Se dejó polimerizar para después preparar el gel concentrador: 1) 3.89 ml de agua bidestilada, 2) 0.81 ml de 30% acrilamida/0.8% bisacrilamida, 3) 1.55 ml Tris-Cl/SDS pH 8.45, 4) 35 µl de PSA 10% y 5) 7 µl de TEMED.

Para la electroforesis se utilizan dos amortiguadores: Amortiguador cátodo (va dentro de la cámara interna de electroforesis) (apéndice) y el amortiguador ánodo (va en el tanque de la cámara de electroforesis) (apéndice). Se realizó siempre 1 h a 30 volts y posteriormente se sube a 120 volts.

La electrotransferencia se hizo en cámara húmeda usando amortiguador de transferencia (apéndice), en frío, con agitación constante. Se usaron para todos los ensayos de Western Blot, membranas de nitrocelulosa (Cat. No. 1620112, BIO-RAD) de 0.2 µm y el tiempo siempre fue de 30 min a 40 volts y después 1 h a 100 volts.

6.21. Ensayos de Western Blot (WB)

Para verificar la transferencia, las membranas se tiñeron con solución de rojo de Ponceau (Cat. No. P7170-1L, Sigma-Aldrich) al 100% y se destiñeron con PBS-Tween 20 (Cat. No. 170-6531, BIO-RAD) al 0.1% pH 7.0. Después las membranas se bloquearon con leche (“svelty”) al 10% en PBS-Tween 20 al 0.1% toda la noche en agitación constante a 4 °C. Las membranas se lavaron cinco veces con PBS-Tween 20 al 0.1% en agitación durante 10 min (por

lavado) a TA. A continuación, se incubaron toda la noche en agitación suave a 4 °C con el anticuerpo primario diluido en leche al 5% en PBS-Tween 20 al 0.1%, sólo cuando se usó el anticuerpo monoclonal anti-His Tag se resuspendió sólo en PBS-Tween 20 al 0.1%. Las diluciones utilizadas del anticuerpo primario se determinaron para el revelado por color y por quimioluminiscencia (usando placa o fotodocumentador).

Las membranas se lavaron cinco veces con PBS-Tween 20 al 0.1% en agitación durante 10 min a temperatura ambiente; después se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo o anti-IgG de ratón acoplado a HRP (Bio-Rad) diluido en leche al 2.5% en PBS-Tween 20 al 0.1% durante 2.5 h a temperatura ambiente o 1 h a 37 °C con agitación suave. Finalmente, las membranas se lavaron cinco veces con PBS-Tween 20 al 0.1% en agitación durante 10 min a TA. En el revelado por color, las membranas se sumergieron por 30 min a TA en la solución de revelado que contiene 15 mg de HRP-4CN (Cat. No. 170-6534, BIO-RAD) disueltos previamente en 5 ml de metanol, 30 ml de TBS (apéndice) y 30 µl de peróxido de hidrógeno al 30%.

Para el revelado por quimioluminiscencia, se utilizó el kit de revelado SuperSignal®West Pico sustrato de quimioluminiscencia (Thermo Scientific), mezclando las soluciones A+B en una relación 1:1, luego se reveló con ayuda del fotodocumentador ChemiDoc™ (BIO-RAD) o usando placas (Medical X-ray Blue/MXB Film; Cat. No. 604 0331; Carestream) y la solución reveladora GBX (Cat. No. 1901859, Carestream DENTAL) y la solución fijadora GBX (Cat. No. 1901859, Kodak).

6.22. Lisados proteicos de *T. vaginalis* utilizando el amortiguador de lisis que contiene IGEPAL®CA-630 así como inhibidores de proteasas y fosfatasa

Parásitos en fase logarítmica de crecimiento se lavaron tres veces con PBS pH 7.0 frío, se resuspendieron 20×10^6 parásitos con 209 µl de amortiguador de lisis IGEPAL®CA-630 (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, DOC 0.2%,

SDS 0.1%, IGEPAL®CA-630 1%, 1x cocktail de inhibidores de proteasas (Cat. No. 04 693 116 001, Roche) (apéndice), 1x de PhosSTOP (Cat. No. 04 906 845 001, Roche) (apéndice), el cual es un inhibidor de fosfatasa), se incubó 30 min en hielo, vortexeando cada 5 min, se centrifugó a 14, 000 rpm durante 15 min a 4 °C, se recuperó la pastilla (sólo para el ensayo mostrado en la Fig. 30 se recuperó pastilla y sobrenadante, del cual se tomó 200 µl y se diluyó 1:1 con BM2x para geles de tricina), resuspendiendo con 100 µl de BM2x para geles de tricina, se hirvió durante 5 min y finalmente se centrifugó a 13, 000 rpm durante 5 min, se realizó la electroforesis en geles de tricina y la electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa de 0.2 µm.

6.23 Lisado de parásitos crecidos en alto hierro en ausencia y presencia del inhibidor Wortmanina durante 60 min

Parásitos del aislado CNCD 188 se cultivaron en alto hierro durante 60 min en ausencia y presencia del inhibidor Wortmanina, el cual actúa sobre fosfatidilinositol 3-cinasa (Cat. No. tlr-wtm, InvivoGen), se añadió este reactivo a una concentración de 50 µM, se continuó con la lisis como se señala en 6.22 de esta sección.

6.24. Lisado de parásitos crecidos en alto hierro previamente tratados con fijador (ensayo para la detección de complejos entre proteínas)

Parásitos del aislado CNCD 188 de 1 semana de descongelación se cultivaron en alto hierro (250 µM) durante 24 h y se lisaron diferentes cantidades de parásitos, (2.5, 5, 10, 20 y 40 × 10⁶ parásitos). Cada pastilla se resuspendió con 1 ml de formaldehído al 1.6% en PBS pH 7.0, se incubó a TA con agitación suave por 10 min, seguido de una centrifugación a 2, 000 rpm por 5 min a TA. La pastilla de parásitos se resuspendió con 0.5 ml de Glicina fría (1.25 M), se centrifugó a 1800 rpm por 5 min a 4°C. Las pastillas se resuspendieron e incubaron con el volumen correspondiente del amortiguador de lisis como se señala en la sección 6.22. El lisado se diluyó 1:1 con BM2x, en lugar de hervir,

se calentó 15 min a 65 °C en el termo block y se centrifugó a 13, 000 rpm por 5 min a 4°C. Las proteínas se separaron por electroforesis en geles de tricina y se realizó la electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa de 0.2 µm (Lougheed y col., 2014).

6.25. Ensayo de inmunofluorescencia indirecta

Parásitos en las distintas condiciones inductoras de autofagia se colocaron en laminillas previamente tratadas con una solución 1:10 de poli-L-lisina (P8920-100ML, Sigma Aldrich) por 15 min. Los parásitos se fijaron en suspensión con paraformaldehído al 2% en PBS (apéndice), durante 30 min a TA (con agitación suave, de aquí en adelante), excepto para la condición de AH, se hicieron cinco lavados con PBS filtrado y únicamente los parásitos permeabilizados se trataron con 1 ml de Tritón X-100 al 0.2% (apéndice) por 10 min seguido de cinco lavados con 1 ml de solución de albúmina (BSA) al 1%, se bloqueó con 1 ml de glicina 0.5 M (apéndice) por 1 h, se lavó tres veces con 1 ml de glicina 0.5 M, se añadió 1 ml de suero fetal bovino (SFB) 1%, se incubó por 15 min a TA, se hicieron tres lavados con 1 ml de SFB 1% y tres lavados con 1 ml de PBS filtrado. Las muestras se incubaron con el anticuerpo primario toda la noche en cámara húmeda a 4 °C, se hicieron cinco lavados con PBS filtrado, se incubaron con el anticuerpo secundario acoplados a FITC (anti-IgG de conejo o anti-IgG de ratón acoplado a fluoresceína PIERCE) a una dilución 1:100 durante 2 h cubiertos de la luz a TA y se lavó cinco veces con PBS. En los ensayos para localización en membrana se incubó con el DIL (Sigma-Aldrich) a una dilución 1:2, 000 durante 30 min a TA cubiertos de la luz, se hicieron diez lavados y las laminillas se montaron en portaobjetos con 7 µl de Vectashield-DAPI (Vector Laboratories), se sellaron con esmalte de uñas y se almacenaron a 4 °C en oscuridad hasta su observación por microscopía confocal.

6.25a. Ensayo de detección del flujo autofágico

Para la detección de autolisosomas en *T. vaginalis*, se analizó la colocalización de autofagosomas (Kit Cyto-ID® “Autophagy detection”) con lisosomas (“LysoTracker Red” DND-99, Invitrogen) por marcaje *in vivo*. Parásitos en fase logarítmica se cultivaron por 24 h en condiciones de RG (≤ 1 mM de glucosa) a 37 °C, se lavaron tres veces con PBS pH 7.0 frío y 5×10^5 células se resuspendieron con 500 μ l del amortiguador 1 \times del Kit Cyto-ID® “Autophagy detection” (Cat. No. ENZ-51031-k200, Enzo Life Sciences Inc.), el cual contenía 5 μ l de Cyto-ID™ Green detection, reactivo que detecta vesículas autofágicas y 2 μ M de LysoTracker Red DND-99 para la detección de lisosomas. Las células se incubaron 30 min a 37 °C con agitación suave, se lavaron tres veces con el amortiguador 1 \times y se fijaron con formaldehído al 4% en PBS (apéndice) por 20 min a TA sobre laminillas pretratadas con una solución de poli-L-lisina. Para teñir los núcleos se utilizó la solución de montaje, la cual ya contenía DAPI (Vectashield® con DAPI (Vector Laboratories)). Los parásitos teñidos se observaron en un microscopio confocal Zeiss (Carl Zeiss, Alemania) y las imágenes se analizaron con el programa ZEN 2012.

6.25b. Detección de autolisosomas con el anticuerpo anti-TvAtg8b y el marcador de lisosomas

Parásitos crecidos en RG se incubaron con “LysoTracker Red” DND-99 usando el mismo protocolo descrito en la parte superior excepto el uso del reactivo de Cyto-ID™ Green. Los parásitos teñidos se fijaron con formaldehído al 4% en PBS pH 7.0 por 20 min a TA, se hicieron dos lavados con cloruro de amonio 20 mM en PBS pH 7.0 (NH₄Cl-PBS) (apéndice), dos lavados con BSA al 0.2% en PBS pH 7.0 (BSA-PBS) y dos lavados con PBS pH 7.0 antes de permeabilizar con Tritón X-100 al 0.01% en PBS pH 7.0 por 5 min a TA, se hicieron 3 lavados con PBS pH 7.0 y dos lavados con BSA-PBS. Las laminillas se incubaron con el anticuerpo primario anti-TvAtg8b (dilución 1:200) en BSA-PBS durante 1 h a TA, se lavaron cinco veces con BSA-PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado a FITC (dilución

1:200) (Thermo Scientific-Pierce) 1 h a TA, se lavaron tres veces con BSA-PBS y dos veces con PBS pH 7.0 y las laminillas se montaron en portaobjetos con la solución de Vectashield-DAPI para ser analizadas por microscopía confocal.

6.25c. Detección de autolisosomas con el anticuerpo anti-TvAtg8b y el marcador de lisosomas en ausencia y presencia del inhibidor E-64d

Parásitos (2×10^6 parásitos) en 2 ml de medio en RG se incubaron en ausencia y presencia del inhibidor de cisteína proteasas permeable (papaína y otras tiol proteasas tipo catepsina B y L) E64d (Sigma-Aldrich) a 10 $\mu\text{g/ml}$, se incubaron 30 min a 37 °C, cubierto de la luz, se realizaron 3 lavados con PBS pH 7.0, se centrifugó entre cada lavado a 1, 800 rpm por 5 min a 4 °C; los parásitos se incubaron con “Lysotracker Red” DND-99 como se señala en el número 6.25b de esta sección.

6.26. Electroforesis en geles de sustrato, zimograma

Los parásitos tratados sin y con inhibidor E-64d como se menciona en el número anterior 6.25c, las pastillas después de los lavados se resuspendieron con 50 μl de BM2 \times y se incubaron a 37 °C sin agitación por 30 min. Para analizar la actividad de proteasas, el lisado se separó en geles de poliacrilamida co-polimerizados con gelatina al 0.2% (apéndice). Los geles se re-naturalizaron en Tritón X-100 al 2.5% (apéndice) 1 h a TA en agitación suave, se activó por 1, 4 y 16 h a 37 °C o por 16, 42 y 48 h a 16 °C en 7 ml de amortiguador de activación (apéndice), se tiñó con azul de Coomassie (apéndice) y se decoloró con la solución decolorante (apéndice).

6.27. Inmunomarcaje con el anticuerpo anti-TvAtg8b y MET

Parásitos crecidos en condiciones de autofagia por 30 min a 37 °C se fijaron con formaldehído al 4%-glutaraldehído al 0.5% en medio DMEM sin suero. Las

muestras se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol, se incluyeron en resina LR-White (London Resin, Reino Unido) y se polimerizaron con calor a 56 °C toda la noche, se realizaron cortes ultrafinos los cuales se montaron en rejillas de níquel y se incubaron con el anticuerpo primario anti-TvAtg8b (dilución 1:50) durante 2 h a TA. Después de varios lavados con PBS, las rejillas se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplada a partículas de oro de 15 nm (Ted Pella, Inc., USA) 1 h a TA. Como control negativo, las rejillas se incubaron sólo con el anticuerpo secundario. Las muestras se analizaron por MET. Nota: Se seleccionaron las imágenes más representativas del resultado.

6.28. Cinética de alto hierro (AH) en presencia del inhibidor Wortmanina

Los parásitos en fase logarítmica crecidos en condiciones normales se lavaron tres veces con PBS pH 7.0, se centrifugaron a 1, 800 rpm 5 min a 4 °C. Mientras se hacían los lavados los cubreobjetos se trataron 15 min con una dilución 1:1 de poli-L-lisina y se dejaron secar.

Después de los lavados los parásitos se resuspendieron en medio TYM suplementado con 10 % SBA y con Sulfato ferroso amoniacal a una concentración final de 250 µM. A los parásitos con el inhibidor Wortmanina, se les añadió este reactivo a una concentración de 50 µM, se cosecharon sin y con tratamiento a los siguientes tiempos: 0, 20, 30 y 40 min. Las laminillas se trabajaron como se describió en Materiales y Métodos, número 6.25.

7. Resultados

7.1. Comparar a nivel de ultraestructura diferentes condiciones inductoras de autofagia.

En los antecedentes directos de este trabajo, se describe la condición de restricción de glucosa (RG) como una condición inductora de autofagia que favorece la sobrevivencia del parásito (Huang et al., 2014). Sin embargo, en este trabajo, no se menciona ¿qué material citoplásmico es “secuestrado” dentro de los autofagosomas? y ¿si entre este se encontró al hidrogenosoma?

Por lo que en este trabajo se realizó el análisis de la ultraestructura de los parásitos en la condición típica inductora de autofagia, en restricción de glucosa (RG). En la Fig. 13 se muestra el corte de un parásito crecido en RG, así como los diversos tipos de vesículas detectados en RG. Además, se detectaron las diferentes etapas que conforman la biogénesis del autofagosoma (Fig. 13, paneles F-J). En el panel A (Fig. 13A), se observa la presencia de gran número de vesículas o vacuolas de diferentes tamaños (V), vesículas digestivas (dV) (Fig. 13D, asterisco blanco), así como vesículas tipo autofagosomas (AV), lo cual podría estar relacionado a un proceso autofágico activo. También cabe destacar que se observaron organelos con mayor tamaño de lo habitual como son: hidrogenosomas (H), retículo endoplásmico (ER) y aparato de Golgi (G). Además, se detectó la presencia de vesículas AVi (Fig. 13B) y vesículas autofágicas degradativas o tardías (Fig. 13E) con las mismas características descritas por Eskelinen, 2008. También se detectaron vesículas con material citoplasmático similar a aparato de Golgi (Fig. 13C, asteriscos) así como vesículas similares a cuerpos multilamelares (MLB) (Fig. 13D), de manera distintiva en esta condición.

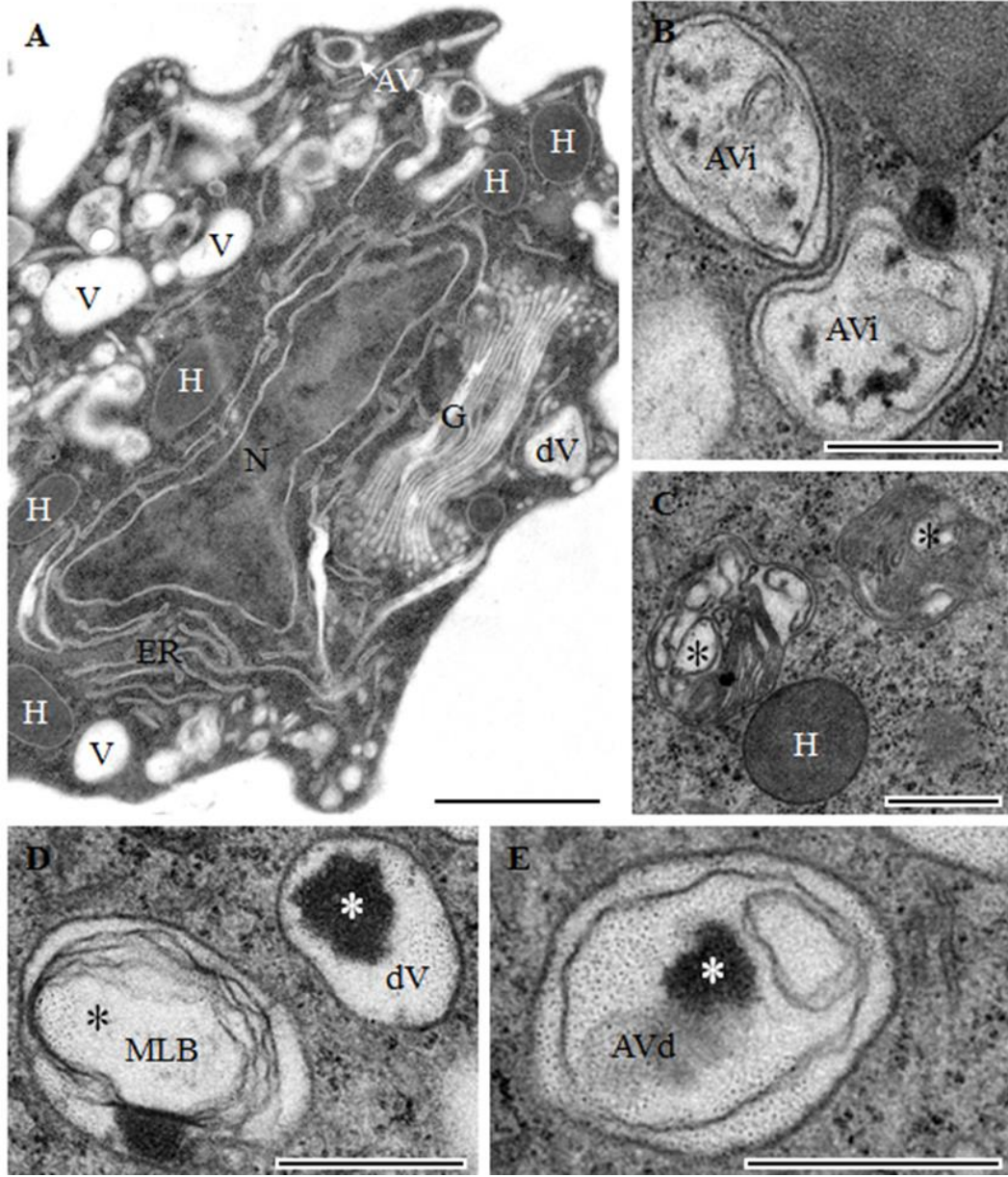
Fue de gran sorpresa e interés que en esta condición se captarán las diferentes etapas de la biogénesis del autofagosoma: 1) Formación del fagóforo (Fig. 13F); 2) Expansión (Fig. 13G); 3) Maduración (Fig. 13H, I) y por

último la 4) Formación de la vacuola autofágica o autofagosoma (AV) (Fig. 13J) con material citoplásmico rodeado por doble membrana.

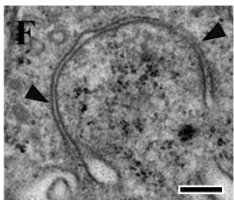
El haber captado los diferentes pasos de la biogénesis del autofagosoma permite apoyar una de las hipótesis originadas a partir de la siguiente pregunta: ¿la membrana de aislamiento o fagóforo proviene de una formación de “novo” o se origina a partir de organelos membranosos? Con este resultado se sugiere que es a partir de una formación de “novo”.

En la condición de alta glucosa (AG), también se detectó la presencia de vesículas autofágicas, por lo que condiciones enriquecidas de esta fuente de carbono se pueden considerar condiciones de estrés para el parásito. En la Fig. 14 se muestran cortes de diferentes parásitos crecidos en esta condición, destacando en el panel A (Fig. 14A) que los organelos como el ER y el G no están tan prominentes como en la condición de RG; están presentes diversas V y dV de diferentes tamaños. En esta condición es notoria la presencia de depósitos de glucógeno (GS); estructuras electrón-densas de menor tamaño a los hidrogenosomas (Fig. 14A, cabezas de flecha). También se detectó la presencia de vesículas de gran tamaño que sugieren ser tipo cuerpos multivesiculares (MVB) y vesículas de glucógeno (Fig. 14B), dado a la similitud que tienen con las vesículas descritas previamente como autofagosomas de glucógeno por Rikihisa (1984). Cercana a este tipo de vesícula, se encuentran dos V de menor tamaño, sugiriendo una posible fusión para formar una vacuola de mayor tamaño. Otra distinción en esta condición, fue la presencia de hidrogenosomas de gran tamaño, mayor a los 300 nm (Fig. 14C) y de igual manera que en la condición de RG se observaron vesículas tipo MLB (Fig. 14D), así como AVd (Fig. 14E).

Figura 13. Ultraestructura de la autofagia de *T. vaginalis* inducida por RG. A. Corte fino de *T. vaginalis* por MET. Se muestra el núcleo (N), varias V de diferentes tamaños, vesículas tipo AV (flechas blancas), hidrogenosomas (H) de gran tamaño, el G alargado y ER prominente. **B.** AVi con doble membrana (membrana vacuolar y membrana de autofagosoma). **C.** Un H electrón-denso y en su forma esférica, cercano a dos vesículas tipo autofagosomas, dentro de las cuales hay porciones de G, sugiriendo autofagia del Golgi (golgifagia, asteriscos negros). **D.** dV, (asterisco negro) con material electrón-denso y una estructura similar a un MLB, (asterisco negro) dentro de la vacuola. **E.** Una AVd, (asterisco negro), la cual contiene remanentes de membrana. Barra = 0.5 μm . **F-J. Biogenesis del autofagosoma.** **F.** 1) formación del fagóforo, a partir de una membrana de aislamiento (cabezas de flecha). **G.** 2) Expansión, es el alargamiento de la membrana de aislamiento alrededor del material citoplásmico a degradar. **H-I.** 3) Maduración, como su nombre lo indica, la vesícula autofágica va adquiriendo la forma esférica englobando el material citoplásmico. **J.** 4) AV en completa formación. Barra = 0.2 μm .



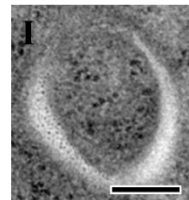
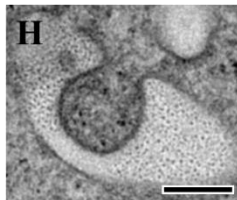
1) Fagóforo



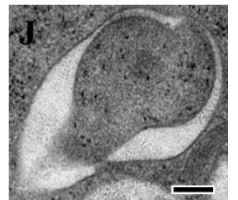
2) Expansión



3) Maduración



4) AV



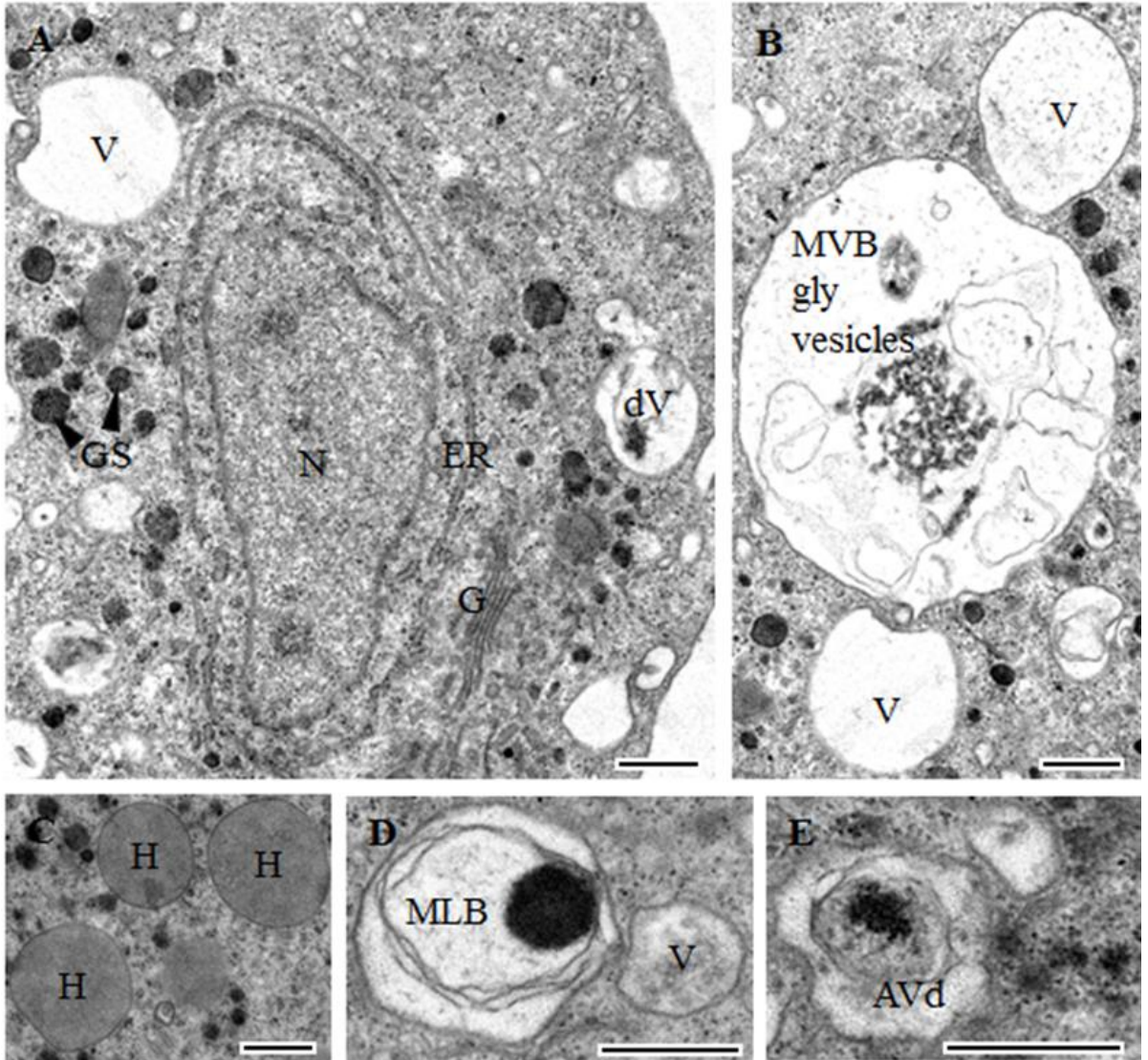
Hasta el momento, al comparar entre exceso o restricción de glucosa podemos observar que existen cambios notables a nivel de ultraestructura que dependen de la manera que responde el parásito para sobrevivir, siendo la autofagia una de las respuestas para adaptarse a dichos cambios.

Al cultivar a *T. vaginalis* con Rapamicina; el inductor de autofagia convencional más utilizado en diferentes tipos celulares. Primero se realizó un ensayo de viabilidad celular mediante exclusión del colorante azul de tripano con diferentes concentraciones de Rapamicina (100, 200, 500, 800 y 1000 nM) en un tiempo de cultivo (1, 2, 4, 8, 12 y 24 h), seleccionando la concentración de 500 nM por 12 h (Gráfica 1). La viabilidad obtenida a esta concentración y tiempo es >90%, la cual es aceptable para los demás ensayos.

En la Fig. 15 se muestra el tipo de vesículas autofágicas inducidas con este inductor en particular, observando en el panel A (Fig. 15) un corte completo de un parásito crecido en esta condición (Rapamicina 500 nM durante 12 h), en el cual están presentes gran número de dV de diversos tamaños que podría estar relacionadas a un proceso autofágico activo y avanzado. También se detectó la formación de autofagosomas típicos; es decir, vesículas con una doble membrana bien definida que secuestraron parte del citoplasma (Fig. 15B, cabeza de flecha), y cercana a esta vesícula autofágica una vacuola electrón-lúcida (V), sugiriendo una posible fusión que daría origen al autolisosoma (AL); organelo formado en el último paso del proceso autofágico.

De igual manera que en la condición de AG, se observan abundantes depósitos de glucógeno (GS) (Fig. 15C, cabezas de flecha), así como vesículas AVd con remanentes de material citoplásmico. Sorpresivamente, en esta condición se encontraron vesículas autofágicas con contenido que podría ser ER (Fig. 15D), dado que se alcanzan a detectar los ribosomas asociados a este organelo (Fig. 15D, cabeza de flecha) y vesículas con estructuras circulares lamelares (Fig. 15E, cabeza de flecha), de las cuales se desconoce su función y/o participación en el proceso autofágico.

Figura 14. Ultraestructura de la autofagia de *T. vaginalis* inducida por AG. A. Corte fino de *T. vaginalis* por MET. Se muestra el N, varias V de diferentes tamaños, así como dV, el ER, G y GS (cabezas de flechas), estructuras electrón-densas de menor tamaño en comparación a los hidrogenosomas. **B.** Se muestra una vesícula de gran tamaño tipo MVB dado a la presencia de vesículas de menor tamaño en el interior a ésta y a su vez contiene glucógeno en degradación, conocida como autofagosoma de glucógeno (gly vesicles), cercana a esta gran vesícula, V, sugiriendo una posible fusión. **C.** Se muestran H en su forma esférica y electrón-densa mayor a 300 nm. **D.** vesícula tipo MLB con un centro de material electrón-denso, cercana a esta una V de menor tamaño. **E.** Se observa una AVd con material similar al citoplásmico en su interior. Barra = 0.5 μ m.



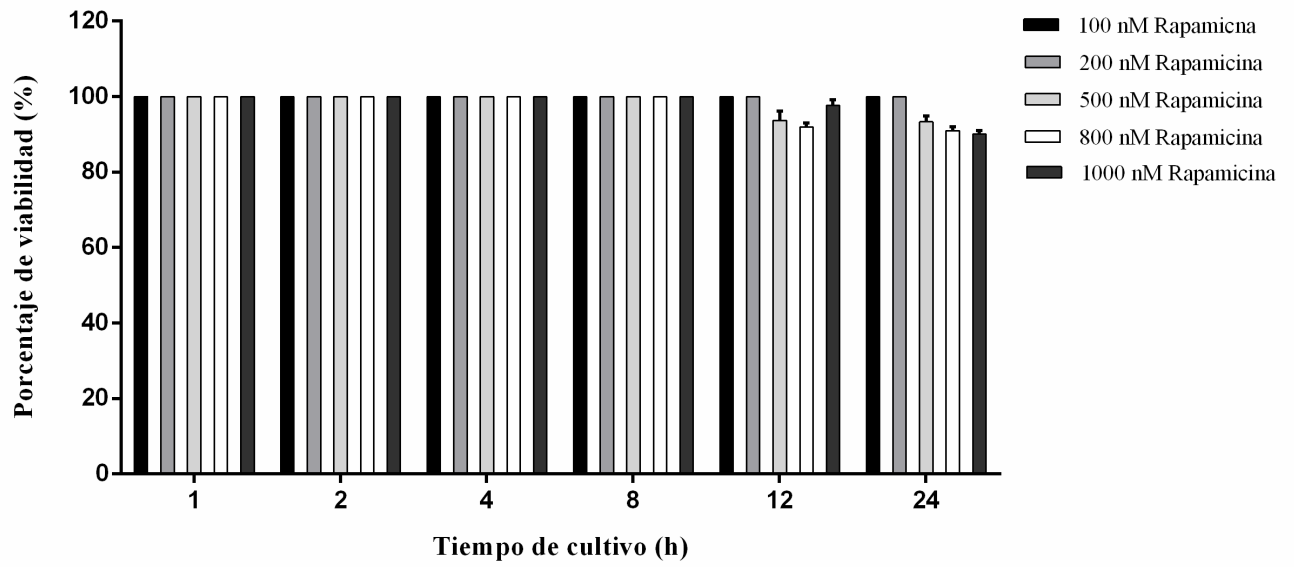
Durante la maestría, las condiciones trabajadas como inductoras de autofagia fueron en ausencia o presencia de hierro y en los resultados obtenidos observamos que a partir de 20 μM de hierro es suficiente para inducirse una autofagia “selectiva” de hidrogenosoma. Sin embargo, nos faltó corroborar si la autofagia de hidrogenosoma era un proceso que ocurría a las 24 h o en 30 min podría ser inducido.

En el caso de restricción de hierro (RH) ni a 24 h (Fig. 16A) ni a 30 min (Fig. 16B-E) se observó al hidrogenosoma en el interior de los autofagosomas. Lo que se observó a 30 min de cultivo en esta condición fue la formación de AVi con citoplasma en el interior así como la presencia de vesículas/vacuolas (V) de diferentes tamaños (Fig. 16B) cercanas a los autofagosomas, sugiriendo nuevamente una posible fusión entre estas vesículas para formar AL. Por primera vez se observó una vesícula tipo MVB en *T. vaginalis* (Fig. 16C), así como la presencia de lisosomas tardíos (Fig. 16D, asterisco), organelos con material electrón-denso y localizados cercanos a la membrana plasmática. Por último, en la Fig. 16E se observa una vesícula con material heterogéneo, similar a citoplasma y remanentes multilamelares (asterisco).

La siguiente y última condición analizada de inducción de autofagia fue el cultivo en alto hierro (AH; 250 μM). En este caso los resultados obtenidos en la maestría nos mostraron que la autofagia inducida era principalmente de hidrogenosoma (Fig. 17A-C) cuando cultivamos al parásito en esta condición durante 24 h; sin embargo, cuando fue a corto tiempo (30 min) en el tipo de vesículas inducidas no se encontró material que sugiriera hidrogenosoma sino más bien se detectaron autofagosomas de glucógeno (Fig. 17E) principalmente así como vesículas de gran tamaño con contenido citoplásmico en degradación y remanentes multilamelares (Fig. 17D).

Gráfica 1. Ensayo de Viabilidad Celular por exclusión del colorante azul de tripano. En el eje de las ordenadas está el porcentaje de viabilidad vs el eje de las abscisas donde se encuentra el tiempo de cultivo (h). Se utilizaron 5 concentraciones de Rapamicina siendo la más baja 100 nM y la más alta 1000 nM.

Viabilidad celular



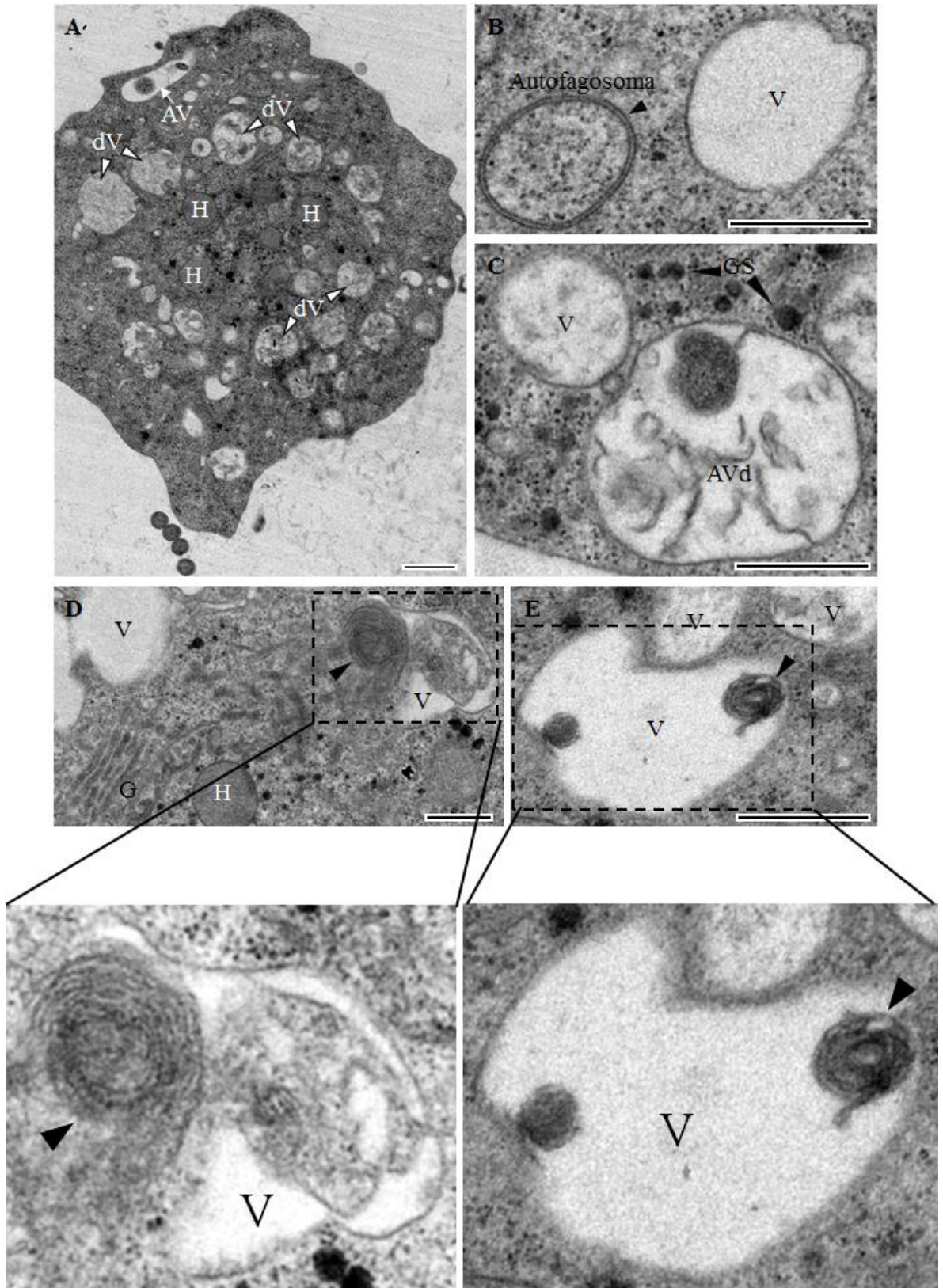
Estos últimos resultados originaron las siguientes preguntas: ¿Se necesita un tiempo prolongado en un ambiente con exceso de hierro para que sea un proceso “selectivo” de organelo? O ¿el fenómeno ocurre de una manera más rápida y el tiempo seleccionado no fue el correcto para esta condición? Esta última pregunta en relación a la hipótesis que en esta condición la autofagia “selectiva” de hidrogenosoma tiene como finalidad ser una vía de secreción no convencional para las proteínas de hidrogenosoma que también se localizan en la membrana plasmática con función de adhesinas y no para la sobrevivencia. Sin embargo, no se descarta que puedan ocurrir para ambos casos.

7.2. Analizar la expresión a nivel de proteína y localización de Atg8 en *T. vaginalis* en condiciones inductoras de autofagia.

Antes de analizar la expresión a nivel de proteína, se analizó la expresión a nivel de transcrito de ambos genes que codifican para Atg8 en *T. vaginalis*, los cuales fueron nombrados por Huang y col., 2014 de la siguiente manera: *tvatg8a* (TVAG_486080) y *tvatg8b* (TVAG_239800). Se realizaron ensayos de RT-PCR en las diferentes condiciones de cultivo, utilizando otro gen de la maquinaria autofágica, *tvatg4* (TVAG_023970) como control, el cual a nivel de proteína se encarga del procesamiento de la proteína Atg8 para su conversión a la forma lipídica. Otro gen control que utilizamos fue la *β -tubulina* para detectar la expresión de un gen constitutivo. En la Fig. 18, se observa que no hubo cambios significativos en la expresión de ambos genes en las diferentes condiciones inductoras de autofagia.

Para continuar con este objetivo necesitábamos obtener a las proteínas Atg8 de *T. vaginalis* de manera recombinante con el fin de producir anticuerpos y así hacer la identificación de este marcador de autofagia en el parásito y realizar los ensayos funcionales de seguimiento de la autofagia en las diferentes condiciones de cultivo.

Figura 15. Ultraestructura de la autofagia de *T. vaginalis* inducida durante el cultivo en Rapa 500 nM durante 12 h. **A.** Corte fino de *T. vaginalis* por MET. Se muestra gran número de dV de diversos tamaños así como una vacuola tipo AV y los hidrogenosomas electrón-densos y en forma esférica (H). **B.** Se señala con cabeza de flecha la detección de un autofagosoma con doble membrana y material citoplásmico en su interior y cercano a este una V. **C.** Una AVd con remanentes de material citoplásmico, próximo a esta, una V así como la presencia notable de GS (cabezas de flecha). **D.** Se distinguen al H en su forma esférica y electrón-densa así como el G y cercana a este una vesícula naciente que está por secuestrar material perteneciente a ER ya que se alcanzan a apreciar los ribosomas asociados a este organelo (cabeza de flecha). **E.** Se detectó la formación de una vesícula con una estructura circular-lamelar (cabeza de flecha) de menor tamaño en su interior. Barra = 0.5 μm .

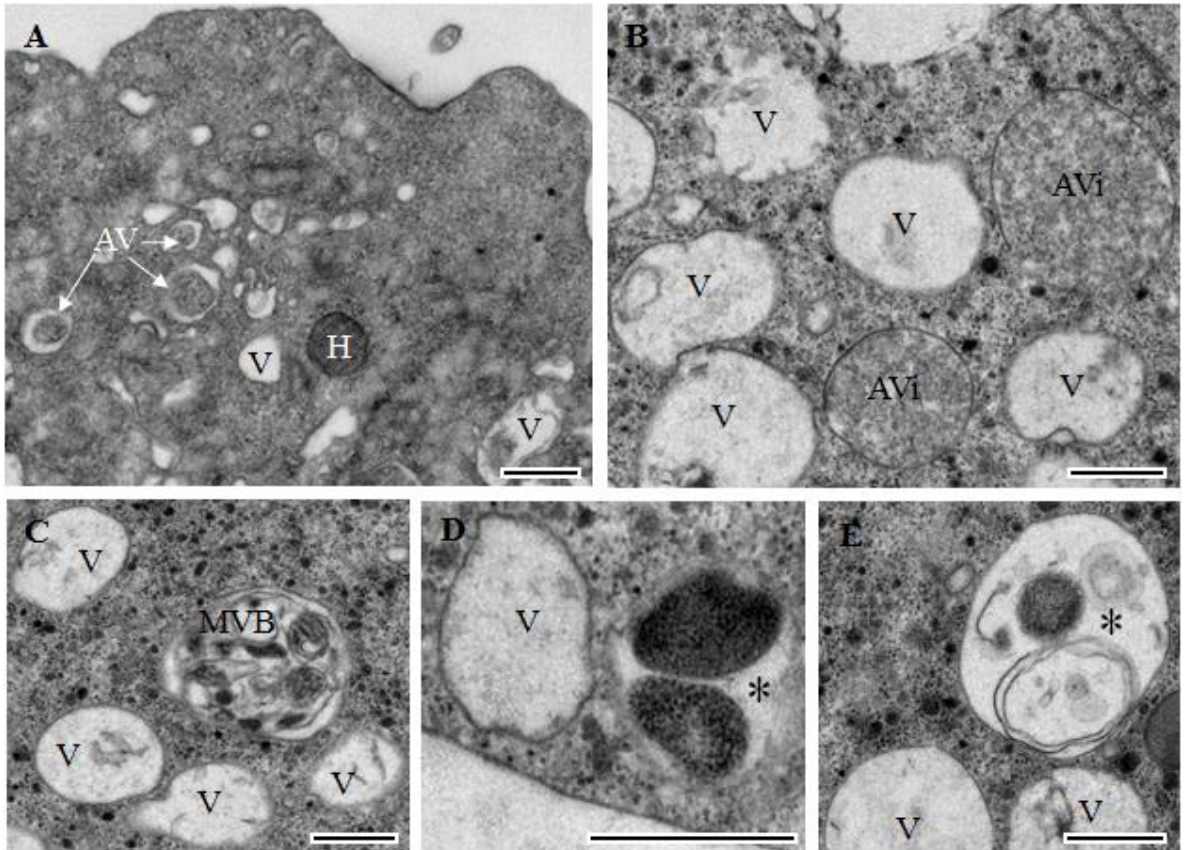


7.2.1. Clonación de los genes *tvatg8a/b* en el vector pGEM®T-Easy y transformación en células *E. coli* DH5α y/o JM109

Para subclonación de los genes *tvatg8a/b* (TVAG_486080 y TVAG_239800; respectivamente) en el vector de expresión, partimos de las clonas obtenidas durante la maestría, las cuales contienen los genes de interés (TVAG_486080 y TVAG_239800) (*tvatg8a*, *tvatg8b*; respectivamente) ligado al vector pGEM®T Easy (Fig. 19A), lo cual fue corroborado por doble digestión así como por secuenciación (tesis de maestría, págs. 68-71). Con el DNAp de dichas clonas se realizó un ensayo de PCR con las condiciones descritas en Materiales y Métodos con los oligonucleótidos específicos para los genes *tvatg8a/b* para amplificar las secuencias completas de los genes, con un tamaño de 372 pb y 342 pb; respectivamente, con los sitios de restricción que permitieron la clonación dirigida en el vector de expresión pCold I (Fig. 19B).

El producto de PCR se purificó con el Kit QIA Quick® para posteriormente ligarlo con el vector de transición pGEM®-T Easy (Fig. 19C), se transformaron células *E. coli* DH5α, de las cuales se extrajo DNAp (Fig. 20A) y se realizó un ensayo de restricción con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III las cuales son específicas para el inserto liberado (Fig. 20B). Las clonas analizadas presentaron los insertos (372 pb/342 pb), los cuales fueron purificados con el Kit QIA Quick® (Fig. 20C). El DNAp de 3 clonas con el inserto, se enviaron a secuenciar al Instituto de Biología de la UNAM. La secuencia obtenida se analizó con el programa MUSCLE (3.8) para comparar con las secuencias de los genes *tvatg8a/b* (TVAG_486080, TVAG_239800) provenientes del genoma de *T. vaginalis*, presentando para el caso de *tvatg8a* una similitud del 100% entre ambas y para el caso de *tvatg8b* 99.1% de similitud entre ambas (Fig. 21), mostrando 3 cambios en las posiciones: 17, 162 y 234, de los cuales sólo uno de ellos se reflejó en el cambio de un aminoácido de lisina (N) por Asparagina (K) (Fig. 21B-C).

Figura 16. Ultraestructura de la autofagia de *T. vaginalis* inducida en RH. A. Corte fino de *T. vaginalis* por MET. Se muestra diversas V de tamaño pequeño, así como a un H electrón-denso y de forma esférica. Se señala con flecha blanca tres AV secuestrando parte del citoplasma. **B.** Se muestran dos AVi que contienen material citoplásmico intacto y cercanas a ellas V de diferentes tamaños. **C.** Se destaca la presencia de una vesícula tipo MVB ya que se alcanza a visualizar vesículas pequeñas dentro de este tipo de organelo, algunas de ellas más electrón-densas que las otras. **D.** Un lisosoma tardío (asterisco) cercano a la membrana plasmática con contenido electrón-denso. **E.** Se detectó la presencia de una vesícula con contenido citoplásmico heterogéneo así como con remanentes lamelares circulares (asterisco). Barra = 0.5 μ m.

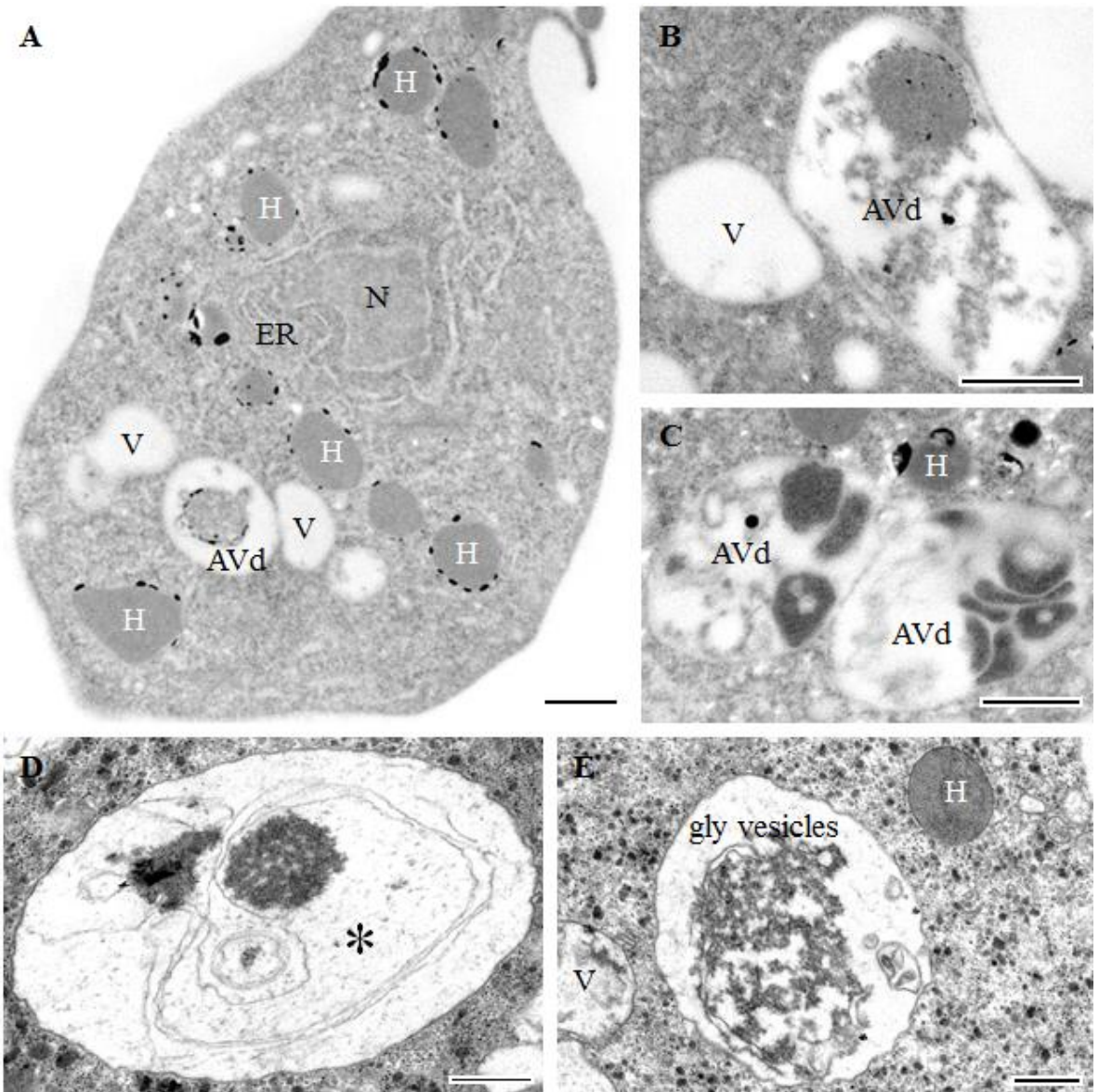


7.2.2. Sub-clonación de los genes *tvatg8a/b* en el vector pColdI y expresión de las TvAtg8a/b recombinantes.

Teniendo en cuenta que se contaba con las secuencias correctas en el plásmido pGEM®T-Easy, el siguiente paso fue la subclonación de estas secuencias en un vector de expresión. Para esto se eligió el plásmido pColdI que contiene una etiqueta de histidinas en el N-terminal para su purificación por cromatografía de afinidad a níquel (Takara). Primeramente, se realizó la extracción masiva de DNAp de células DH5 α que contenían el vector pColdI vacío (Fig. 22A), el cual fue linearizado con la enzima de restricción *Hind*III por 3 h a 37 °C, la banda del vector linearizado se purificó con el kit QIA Quik®. El vector purificado se trató con la segunda enzima de restricción *Bam*HI durante 3 h a 37 °C. Posteriormente al plásmido linearizado se trató con la enzima fosfatasa alcalina (CIP) durante 2 h a 50 °C. La linearización del plásmido se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (Fig. 22B) y se purificó utilizando nuevamente el kit QIA Quik®.

Como ya se contaba con el inserto purificado, se realizó la ligación entre el plásmido de expresión y los insertos *tvatg8a/b* en una relación 1:3 (vector: inserto) durante toda la noche a 16 °C, se transformaron células *E. coli* DH5 α de las cuales se extrajo el DNAp (Fig. 22C), el cual fue utilizado en: 1) ensayos de PCR, como DNA molde, utilizando los oligos específicos para pColdI, obteniendo dos amplicones; 587 y 557 pb (Fig. 22D), 2) que en ensayos de doble digestión con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III, se liberó dos insertos: de 372 y de 342 pb; respectivamente (Fig. 22E) y finalmente 3) para transformar células *E. coli* BL21 (DE3) mediante choque térmico, para la expresión de las proteínas recombinantes.

Figura 17. Ultraestructura de la autofagia de *T. vaginalis* inducida en AH. **A.** Corte fino de *T. vaginalis* por MET, en el cual se observa el N, el ER, y varios H de diferentes tamaños y formas, algunos de ellos con las vesículas periféricas de gran tamaño. Destacando una AVd, la cual contiene a un hidrogenosoma parcialmente degradado. **B-C.** Se muestran AVd que contienen material tipo hidrogenosoma parcialmente degradados, ya que se asemeja la electrón-densidad que caracteriza a este organelo. **D.** Vesícula de gran tamaño que contiene remanente citoplásmico así como estructuras largas multilamelares (asterisco) **E.** Se detectó autofagosomas de glucógeno de gran tamaño. Barra = 0.5 μm .



7.2.3 Expresión de Atg8a/b de *T. vaginalis* recombinante (rTvAtg8a/b)

Las células *E. coli* BL21 (DE3) conteniendo el plásmido pColdI-*tvatg8a/b* se crecieron en placas y las colonias se sometieron a crecimiento en medio líquido LB con ampicilina (100 µg/ml) con incubación de 1 mM de IPTG durante 3 h para inducir la expresión de las proteínas TvAtg8a/b recombinantes a 16 °C debido a que el vector pColdI favorece la expresión de proteínas recombinantes a baja temperatura y a 37 °C para observar a que temperatura se obtenía una mejor inducción. Después de la inducción los extractos proteicos bacterianos se analizaron por electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) en geles de poliacrilamida al 12% en los que se observó la inducción principalmente a 37 °C de una proteína de 20 kDa y otra de 18 kDa (Fig. 23A), las cuales son codificadas por los genes *tvatg8a* de 372 pb y *tvatg8b* de 342 pb. Cabe mencionar que también se observó una inducción a 16 °C; sin embargo, ésta fue menor en comparación a la inducción obtenida a 37 °C (Fig. 23A).

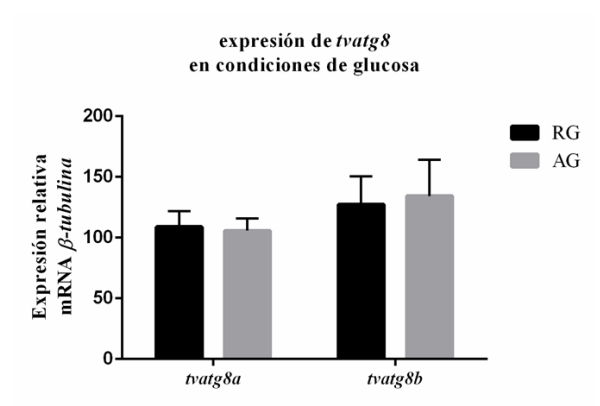
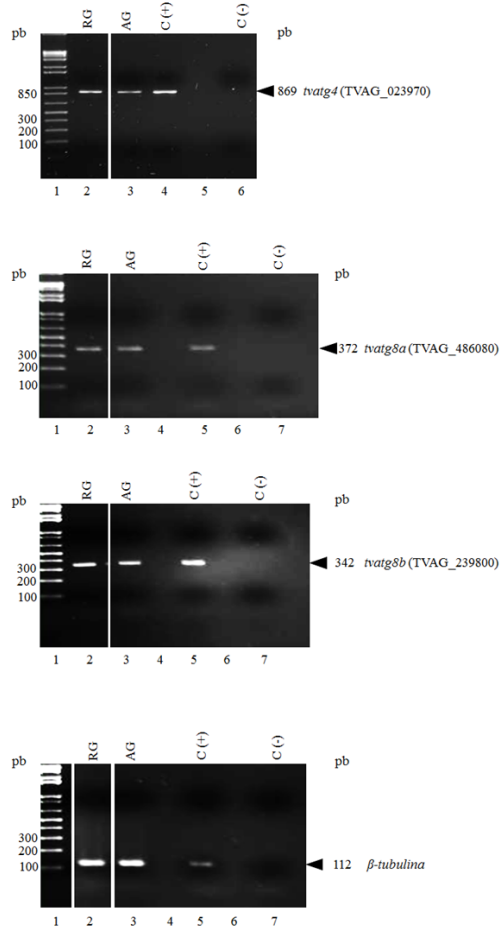
Para corroborar que se trataba de las proteínas recombinantes TvAtg8b (rTvAtg8a/b) se utilizaron los extractos proteicos bacterianos sin y con inducción en un ensayo de WB, utilizando el anticuerpo anti-histidinas (α -His). Obteniendo sólo el reconocimiento en la fracción inducida (Fig. 23B) de una banda de aprox 20 kDa y otra de 18 kDa.

7.2.4. Purificación de las proteínas recombinantes rTvAtg8a/b.

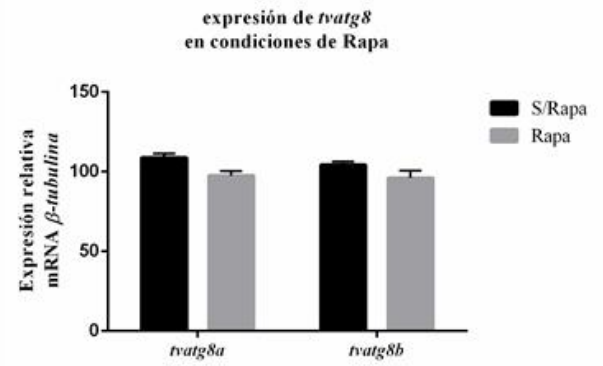
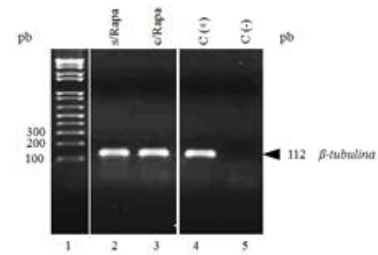
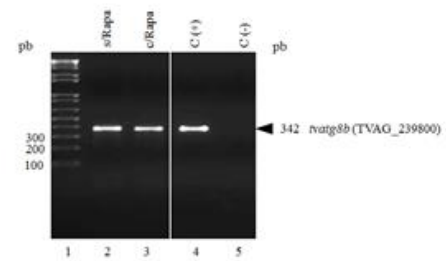
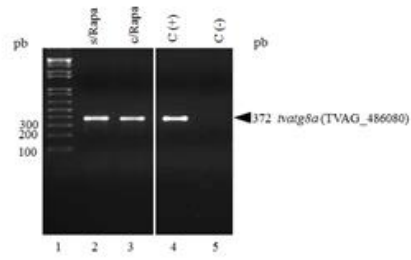
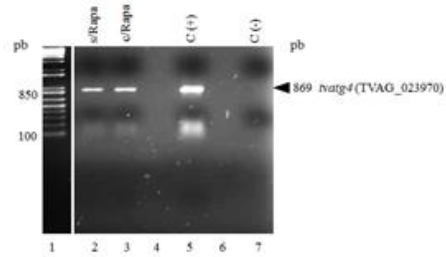
Para analizar en qué fracción se encontraban las proteínas recombinantes se realizó una lisis de bacteriana de las cepas obtenidas y se analizó la fracción soluble (FS) y la insoluble (FI) de los lisados bacterianos. Los resultados mostraron que la proteína rTvAtg8a/b se encontraban principalmente en la FI (cuerpos de inclusión, o IB) (Fig. 24A).

Figura 18. Expresión de *tvatg8a/b* en las distintas condiciones inductoras de autofagia. Ensayo de RT-PCR. A. Se muestra los productos amplificados de cada gen correspondiente para *tvatg4*, *tvatg8a* y *tvatg8b* en RG y AG. **B.** Se muestra los productos amplificados de cada gen correspondiente para *tvatg4*, *tvatg8a* y *tvatg8b* en ausencia y presencia del inductor Rapa (conc. 500 nM/12h). **C.** Se muestra los productos amplificados de cada gen correspondiente para *tvatg4*, *tvatg8a* y *tvatg8b* en RH y AH. Se utilizó a β -*tubulina* como control de carga. C(+) DNA genómico; C(-) sin DNA genómico. Se muestra el análisis densitométrico de los genes *atg8* de *T. vaginalis* en las distintas condiciones inductoras de autofagia.

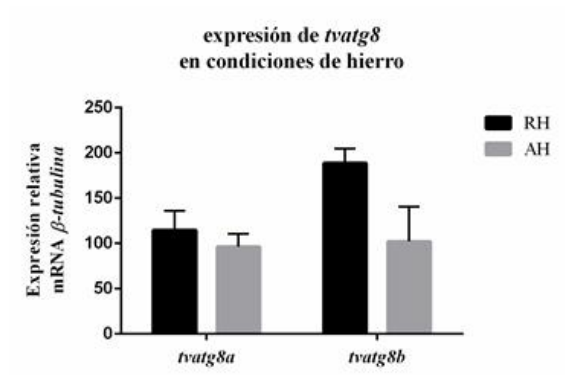
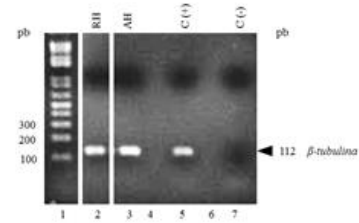
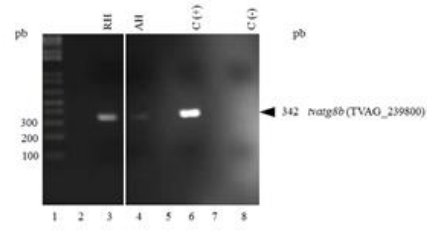
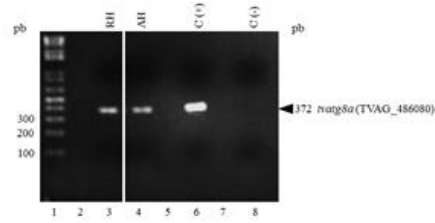
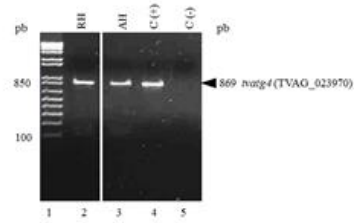
A



B



C



Se siguió la metodología para la solubilización de cuerpos de inclusión (Fig. 24B) descrita en Materiales y Métodos para posteriormente purificarlas por cromatografía de afinidad a níquel, ya que las proteínas presenta una etiqueta de histidinas. Posteriormente, estas fracciones se analizaron por electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) (Fig. 24C) y finalmente se pasaron por una columna de intercambio iónico (PD-10) para remover las sales, como se observa en la Fig. 24E la proteína no se logró obtener pura.

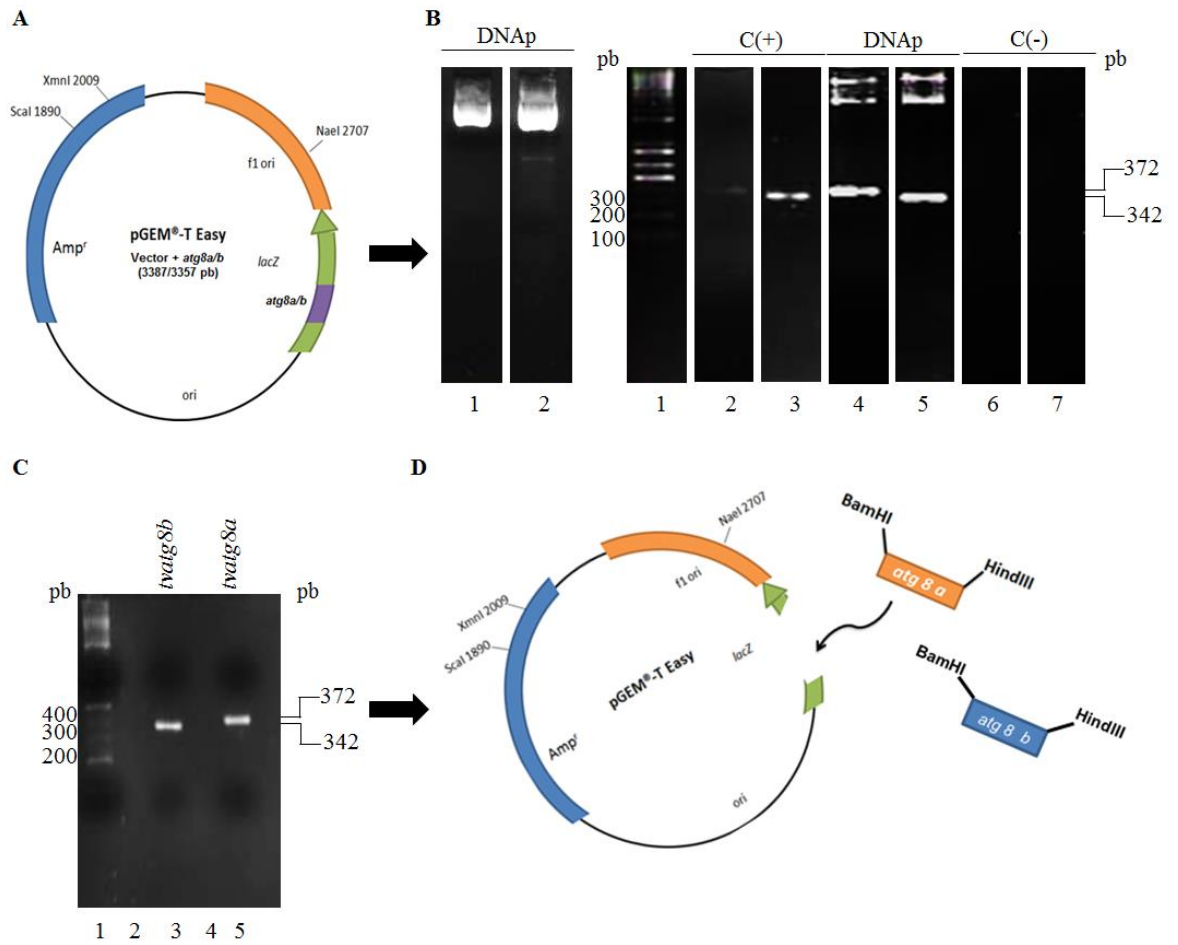
Después de pasar los cuerpos de inclusión solubilizados por la columna de afinidad a níquel, en los eluidos correspondientes a la proteína recombinante rTvAtg8b se observó una doble banda entre los marcadores de 15 y 20 kDa (Fig. 24C) por lo que realizamos un ensayo de WB con estas fracciones y ver cuál de las dos bandas era reconocida por el anticuerpo α -His (Fig. 24D), para posteriormente cortar esta banda del gel de acrilamida y ser utilizada para inmunizar conejos y obtener anticuerpos.

7.2.5 Obtención de anticuerpos policlonales anti-rTvAtg8a/b en ratones o conejo.

Para poder determinar la expresión a nivel de proteína y la localización de este marcador de autofagia en las diferentes condiciones inductoras de este tipo de respuesta celular en *T. vaginalis* fue necesario la producción de anticuerpos policlonales contra las proteínas rTvAtg8a/b por lo cual para el caso de rTvAtg8b se maceró la banda del gel de acrilamida que previamente fue fuertemente reconocida con el Ab α -His en un ensayo de WB.

Un conejo macho de 6 semanas de edad se inmunizó como se describe en Materiales y Métodos. En la Fig. 25 se muestra la dilución a la que se utilizó este anticuerpo contra ambas proteínas recombinantes (rTvAtg8a/b), en ensayos de reconocimiento cruzado y posteriormente fue usado para el reconocimiento de la proteína Atg8b nativa de *T. vaginalis* en extractos de proteínas totales de este parásito así como su localización en las distintas condiciones inductoras de autofagia.

Figura 19. Diagrama de clonación de los genes *tvatg8a/b*. **A.** Construcción obtenida en la maestría con el plásmido pGEM®-T Easy/*tvatg8a/b*, la cual tiene un tamaño de 3387/3357 pb. Ésta construcción no contenía sitios de corte para enzimas de restricción necesarias para la subclonación en pCold I. **B.** Carriles 1-2, se muestra la electroforesis del DNAP (4 µl más 2 µl de BC6x) de la construcción mencionada en **A**, en un gel de agarosa al 1.5% en TBE 1x. Carriles 1-7 se muestra el ensayo de PCR con los oligos que amplifican los genes *tvatg8a/b* con los sitios de corte para *Bam*HI y *Hind*III. Se cargó 10 µl de marcadores de 1 kbp; se utilizó DNAP como C(+); se utilizó el DNAP de la construcción en **A** como DNA molde; sin DNA como C(-). Se obtuvo un amplicón del tamaño de 372 y otro de 342 pb. Electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% en TBE 1x, en el cual se cargó 10 µl del producto de reacción más 2 µl de BC6x. **C. Inserto purificado (*tvatg8a/b*).** Carril 1, 10 µl de marcadores de 1 kbp; carril 3, se cargó 4 µl del inserto purificado (*tvatg8b*) (más 2 µl de BC6x) con un tamaño de 342 pb; carril 5, se cargó 4 µl del inserto purificado (*tvatg8a*) (más 2 µl de BC6x) con un tamaño de 372 pb. Electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% en TBE 1x. El inserto liberado fue incorporado al vector de transición pGEM®-T Easy.



7.3. Identificación del marcador de autofagia (Atg8b) a nivel de proteína en *T. vaginalis* en condiciones inductoras de este proceso.

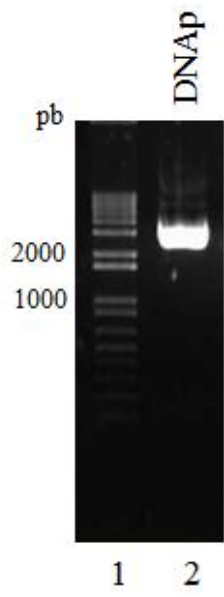
Cabe mencionar que para la detección de esta proteína en extractos de *T. vaginalis* tuvimos que buscar en la literatura un tipo de extracto que permitiera la detección de la proteína Atg8b ya que cuando se utilizaron extractos con TCA 10% o extracto de adhesinas; el cual contenía inhibidores de proteasas; no pudimos detectar por WB a la proteína TvAtg8b. Al parecer esta proteína es muy lábil y susceptible a degradación.

Se utilizaron dos tipos de amortiguadores de lisis: El primero, contenía el detergente IGEPAL®CA-630 y el segundo, contenía Tritón X-100, ambos contenían inhibidores de proteasas así como inhibidores de fosfatasas, como se recomienda por Gómez-Sánchez y col., 2015. Este tipo de lisado está descrito detalladamente en Materiales y Métodos. Se verificó que esta metodología fuera funcional mediante ensayos de WB y utilizando extracto de células HeLa, cultivadas en presencia de Rapamicina (500 nM) (inductor de autofagia) así como el anticuerpo α -LC3, el cual reconoce a la proteína LC3 (ortólogo de Atg8 en células de eucariontes superiores) en ensayos de WB.

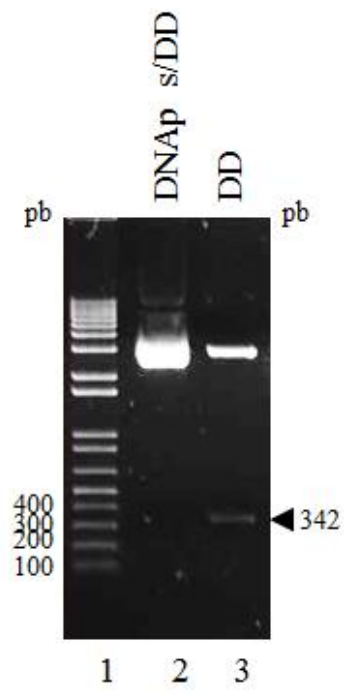
En la Fig. 26D se observa el reconocimiento de dos bandas (14 y 12 kDa) en los dos tipos de extractos. Las cuales corresponden a la forma soluble (LC3-I); reconocida con menor intensidad y a la forma insoluble o lipídica (LC3-II); reconocida con mayor intensidad por el anticuerpo α -LC3. Este resultado favorece el uso de ambos tipos de extracto, ya que el haber detectado con mayor intensidad la banda que corresponde a la forma lipídica fue indicativo de la presencia de un proceso autofágico activo.

Figura 20. Análisis de las clonas transformadas con pGEM®-T Easy/*tvatg8b*. **A.** Electroforesis del DNAp con el plásmido pGEM®-T Easy/*tvatg8b* que incluye los sitios de corte para las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III. Carril 1, 7 µl de marcadores de 1 kbp; carril 2, 4 µl de DNAp (más 2 µl de BC6x). Gel de agarosa al 1% en TBE 1x. **B. Liberación del inserto *tvatg8b*.** Carril 1; 6 µl de marcadores de 1 kbp, carril 2; 2 µl de DNAp (más 2 µl de BC6x) sin digerir con las enzimas de restricción, carril 3; 2 µl de DNAp (más 2 µl de BC6x) digerido con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III, liberando un inserto con un tamaño de 342 pb. Gel de agarosa al 1% en TBE 1x. **C. Purificación del inserto *tvatg8b*.** Se corroboró la purificación del inserto de *tvatg8b* con un tamaño de 342 pb mediante la electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% en TBE 1x. Carril 1; 6 µl de marcadores de 1 kbp, carril 2; vacío, carril 3; 4 µl del purificado (más 2 µl de BC6x).

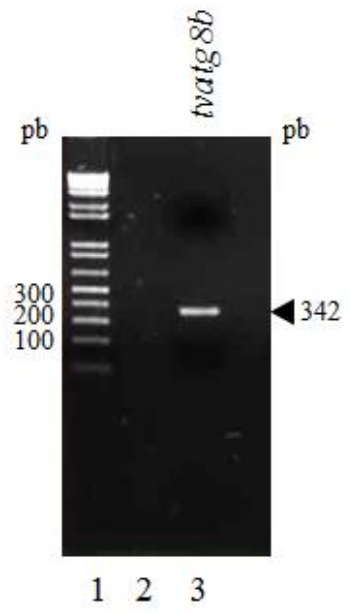
A



B



C



Para los extractos de *T. vaginalis* utilizamos el amortiguador que contenía el detergente IGEPAL®CA-630 y parásitos crecidos durante 24 h en las diferentes condiciones inductoras de autofagia.

En la Fig. 27A se observa la electroforesis de los lisados obtenidos en las condiciones de restricción de glucosa (RG) y alta glucosa (AG), se hicieron réplicas de este gel, las cuales fueron electro transferidas a membranas de nitrocelulosa e incubados con los distintos anticuerpos en ensayos de WB. Como control positivo C(+) de regulación positiva por RG utilizamos el Ab α -TvCP2, el cual reconoció una banda de aprox. 27 kDa; que corresponde a la TvCP2; la cual a nivel de proteína fue más abundante en RG (Fig. 27B).

Una de las proteínas de interés en este proyecto era la PFO-A/AP120 por lo que quisimos saber: ¿cómo era su expresión a nivel de proteína en las condiciones de RG y AG?, ¿era factible que AG regulara positivamente a nivel de proteína su expresión, como ocurría en alto hierro (AH)? Podemos observar en la Fig. 27C al utilizar el anticuerpo anti-PFO50, el cual reconoció una banda de aprox. 120 kDa; que corresponde a la proteína PFO-A/AP120, la cual a nivel de proteína no cambió su expresión en las diferentes condiciones de glucosa.

La otra proteína de interés fue la TvAtg8b en su forma lipídica, ya que era indicativo de un proceso autofágico activo e inducido. En ambas condiciones de glucosa (RG y AG) se detectó con el anticuerpo anti-TvAtg8b una banda de ~9 kDa, la cual podría corresponder a la forma lipídica de TvAtg8b. Esta banda se reconoció con la misma intensidad en ambas condiciones (Fig. 27E) y una banda de mayor peso molecular (18 kDa) que podría corresponder a la forma soluble de TvAtg8b, que no corresponde al peso molecular de la proteína nativa sin procesar (14 kDa) (Fig. 27E) y otras dos bandas de mayor tamaño de las cuales aún no tenemos explicación pero que podrían corresponder al reconocimiento cruzado con otras Atgs.

Figura 21. Secuencia del inserto del plásmido pGEM®-T Easy/tvatg8b. A. Alineamiento de una clona secuenciada proveniente del plásmido pGEM®-T Easy/tvatg8b con la secuencia genómica de *T. vaginalis* G3. Con asterisco (*) se muestran los nucleótidos idénticos, existiendo una similitud del 99.1% entre ambas secuencias. Los nucleótidos libres que no tienen comparación (-) corresponden al vector. Se utilizó el programa MUSCLE (3.8) para hacer el alineamiento múltiple. **B.** Alineamiento entre las secuencias de aminoácidos entre la clona secuenciada y la secuencia correspondiente a Atg8b (TVAG_239800). **C.** Tabla donde se muestra el único cambio a nivel de aminoácidos en la secuencia clonada.

A

CLUSTAL multiple sequence alignment by MUSCLE (3.8)

```

clona      CGGGGCGCAGGTGCATGCTCCCGGCCCATGGCGGCCGCGGSAATTCGATTGGCGGGAT
tvatg8b    -----

clona      CCATGGAGTTGCAAAGTCATGACAGATCTAATAATATAATGACAATGCTCAATAAATACC
tvatg8b    --ATGGAGTTGCAAAGTCCTTGACAGATCTAATAATATAATGACAATGCTCAATAAATACC
*****

clona      CAGACCACATTCTGTCTCATCGTCGAACGCGATCCACACTGCACAACCTTACCAGATATCA
tvatg8b    CAGACCACATTCTGTCTCATCGTCGAACGCGATCCACACTGCACAACCTTACCAGATATCA
*****

clona      AAAATAAAAAATTTTTGTCAAAAAACTCTTTCAGTAGGAAAATTTGTTTATTGCGTAC
tvatg8b    AAAATAAAAAATTTTTGTCAAAAAACTCTTTCAGTAGGAAAATTTGTTTATTGCGTAC
*****

clona      GAAACAGACTTGATATCAACGAAAAGGATGCAATTTCTTGTGTTGTTGATAATACATTAC
tvatg8b    GAAACAGACTTGATATCAACGAAAAGGATGCAATTTCTTGTGTTGTTGATAATACATTAC
*****

clona      CAAATCCAAGCGATAACCTTGGAGCAATATACGAAAAGCATAAATCAGAAGATCAAATGC
tvatg8b    CAAATCCAAGCGATAACCTTGGAGCAATATACGAAAAGCATAAATCAGAAGATCAAATGC
*****

clona      TTCATTGACTTATAGTTCTGACTCTGCTTACGGATTTTGTGAAAGCTTCGCCAATCAC
tvatg8b    TTCATTGACTTATAGTTCTGACTCTGCTTACGGATTTTGTGAAAGCTTCGCCAATCAC
*****

clona      TAGTGAATTCGCGGCCGCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATG
tvatg8b    -----

```

B

```

aa clona      1 MELQSLDRSNNIMTMLNKYPDHIPVIVERDPHCTTLPDIKKNKFFVTKL    50
  |||
aa (TVAG_239800) 1 MELQSLDRSNNIMTMLNKYPDHIPVIVERDPHCTTLPDIKKNKFFVTKL    50
  |||

aa clona      51 SVGKFVYCVRNRLDINEKDAIFLVDNTLPNPSDNLGAIYEKHKSEDQML    100
  |||.|||
aa (TVAG_239800) 51 SVGNFVYCVRNRLDINEKDAIFLVDNTLPNPSDNLGAIYEKHKSEDQML    100
  |||.|||

aa clona      01 HCTYSSDSAYGFL    113
  |||
aa (TVAG_239800) 01 HCTYSSDSAYGFL    113
  |||

```

C

Secuencia	Triplete	Aminoácido correspondiente	Número de aminoácido
clona	AAA	K=Lisina	54
TVAG_239800	AAT	N=Asparagina	

El que se haya obtenido de la misma intensidad la banda que podría corresponder a la forma lipídica de TvAtg8b apoya los resultados obtenidos por ultraestructura en los cuales en ambas condiciones se observó la presencia de diversas vesículas autofágicas (Figs. 13 y 14).

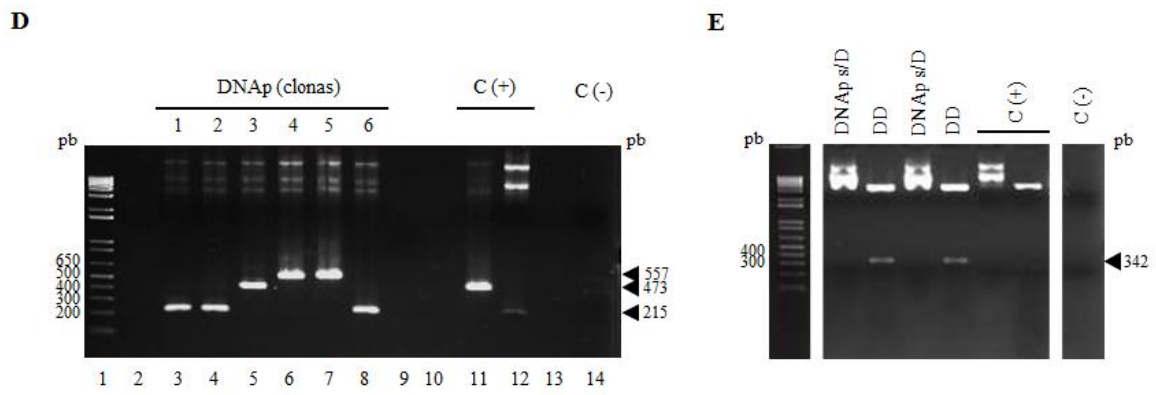
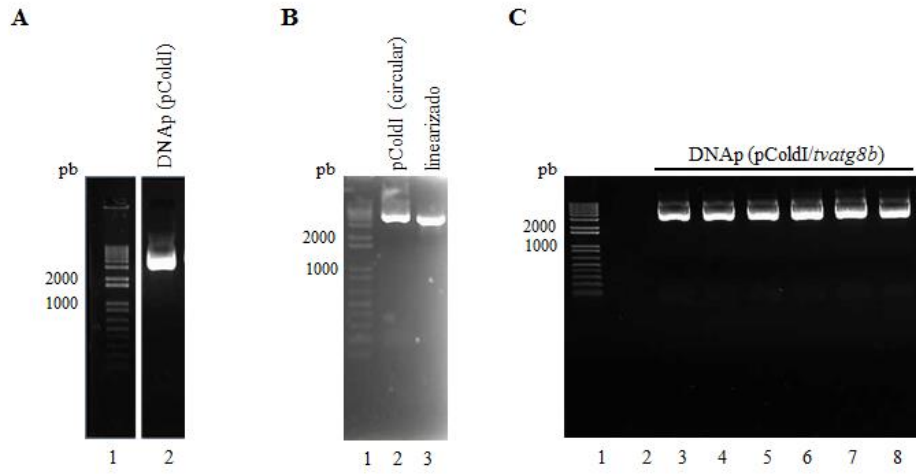
La siguiente condición analizada fue utilizando lisados de parásitos crecidos en ausencia y presencia del inductor de autofagia; Rapa (Rapamicina 500 nM durante 12 h), se realizó la electroforesis de los extractos obtenidos (Fig. 28A) y los ensayos de WB. Nuevamente se utilizaron los anticuerpos anti-TvCP2 y anti-PFO50 como controles, la detección de esta proteasa y adhesina en estas condiciones debía ser la misma, dado a que el inductor de autofagia no debía afectar la expresión de ninguna de ellas (Fig. 28B, C).

El efecto de este inductor de autofagia se observó reflejado en la detección de la proteína TvAtg8b que en ausencia del inhibidor tanto la forma soluble como la forma lipidada, las bandas de 18 y 9 kDa, respectivamente, se detectaron con la misma intensidad (Fig. 28E), sugiriendo la presencia de una autofagia basal en condiciones normales (dato demostrado en la maestría por ultraestructura; tesis de maestría). En presencia del inductor la detección de la forma lipidada (banda de 9 kDa) fue de manera más intensa que la soluble (banda de 18 kDa), lo cual sugeriría la presencia de vesículas-Atg8 positivas en este tiempo de inducción (Fig. 28E) y a su vez un proceso activo autofágico como se muestra en la Fig. 15.

Por último, el otro estímulo analizado fue en ausencia o presencia de hierro (RH y AH). El lisado de parásitos crecidos en RH y AH durante 24 h se analizaron por electroforesis y WB (Fig. 29A para corroborar que existía un efecto del hierro sobre el crecimiento de los parásitos que indicara la inducción de la autofagia en ambas condiciones de crecimiento.

Figura 22. Análisis de las clonas obtenidas con la construcción pColdI/tvatg8b.

A. Electroforesis del DNAP del vector pColdI (vacío). Carril 1, 7 μ l de marcadores de 1 kbp; carril 2, 4 μ l de DNAP (más 2 μ l de BC6x) del vector pColdI. Gel de agarosa al 1% en TBE 1x. **B. Linearización del vector pColdI.** Carril 1; 6 μ l de marcadores de 1 kbp, carril 2; 2 μ l de DNAP (más 2 μ l de BC6x) sin digerir con las enzimas de restricción, carril 3; 4 μ l de DNAP (más 2 μ l de BC6x) digerido con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III y tratado con la enzima alcalina (CIP). Gel de agarosa al 1.5% en TBE 1x. **C. DNAP del vector pColdI/tvatg8b.** Obtención del DNAP de las clonas obtenidas con la construcción pColdI/tvatg8b mediante lisis alcalina. Carril 1, 7 μ l de marcadores de 1 kbp, carriles 3-8, 2 μ l de DNAP (más 2 μ l de BC6x). Electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE 1x. **D. Caracterización de las clonas “positivas” mediante PCR.** El DNAP obtenido de 6 clonas se utilizó como DNA molde para ensayos de PCR con oligonucleótidos que se anclan en el vector pColdI. Carril 1, 7 μ l de marcadores de 1 kbp; carriles 3-8, 20 μ l del producto PCR (más 2 μ l de BC6x); carril 11, C(+) se utilizó DNAP con la construcción (pColdI/*preprotvcp4*), carril 12, C (+) se utilizó DNAP del vector pColdI vacío, carril 14, C(-) sin DNA molde, solo se usó la mezcla de reacción. La región amplificada en el vector vacío es de 215 pb. El tamaño amplificado en el C(+) es de 473 pb (215 p del vector más 258 pb del inserto *preprotvcp4*) y de las clonas con el vector (pColdI/tvatg8b) el tamaño del amplificado fue de 557 pb (215 pb del vector más 342 pb del inserto). Electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% en TBE 1x. **E. Caracterización de las clonas positivas mediante DD.** Se realizó doble digestión del DNAP de las clonas positivas (clona 4 y clona 5) con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III, liberando un inserto de 342 pb, el cual corresponde al tamaño reportado en el genoma de *T. vaginalis* para *atg8b* (TVAG_239800). Electroforesis gel de agarosa al 1.5% en TBE 1x.

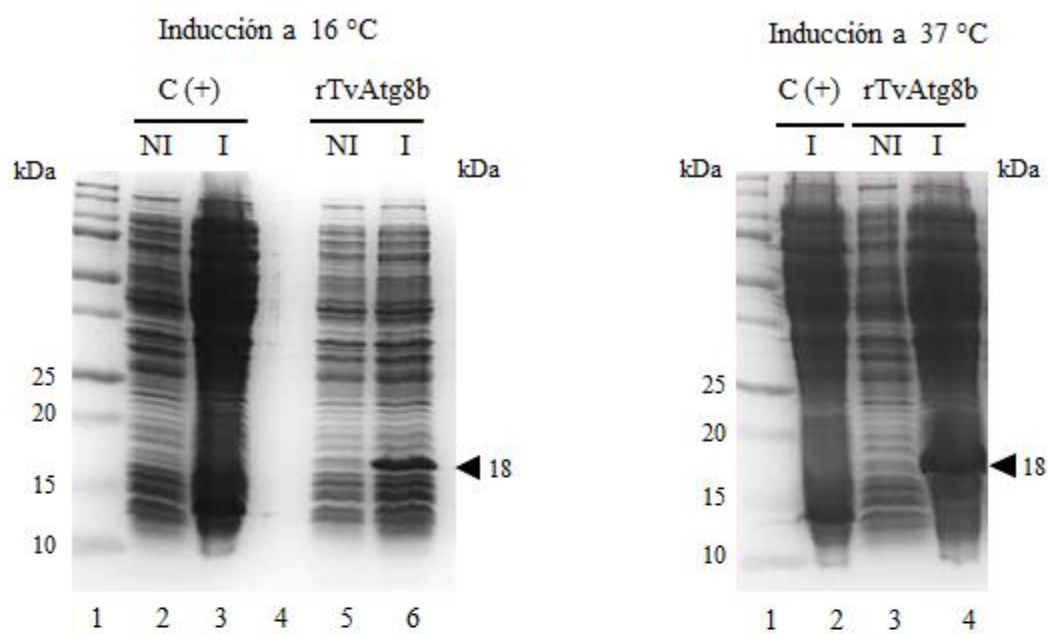
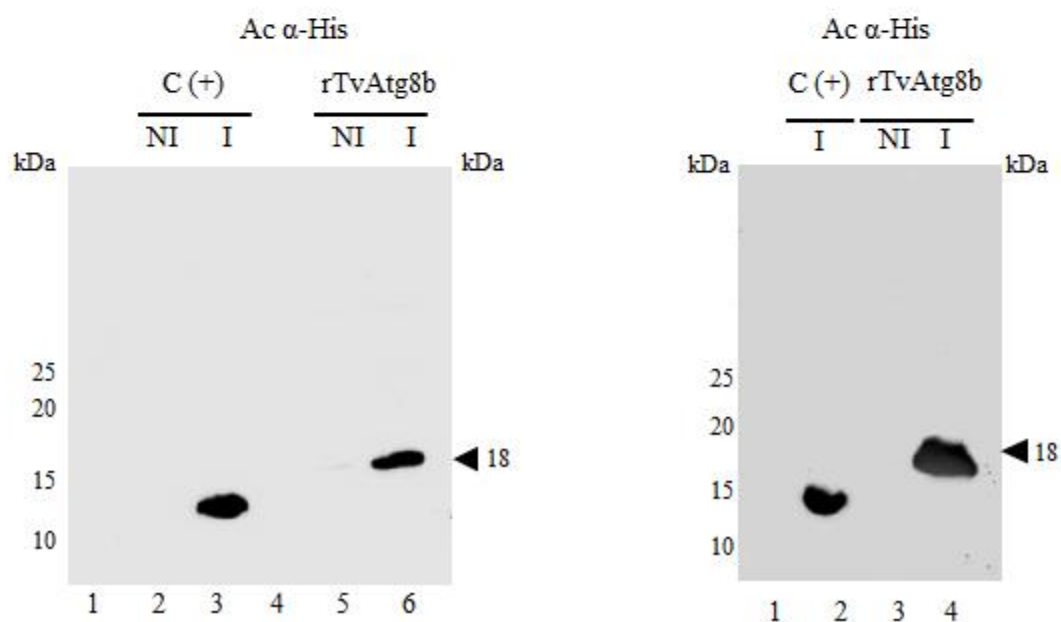


Los anticuerpos anti-TvCP2 detectaron la banda de la proteasa con mayor intensidad en RH que en AH, la cual se regula negativamente por hierro. Lo contrario se detectó con el anticuerpo anti-AP120, ya que la adhesina se regula positivamente por hierro (AH), observándose una mayor cantidad de AP120 en AH (Fig. 29C). Sin embargo, cuando se realizó la detección de la proteína TvAtg8b, de manera sorprendente observamos que en el caso de RH la detección de la forma soluble y lipidada (18 y 9 kDa, respectivamente) de esta proteína fue con la misma intensidad, a diferencia de AH donde se observó con mayor intensidad la forma lipidada (9 kDa) que la forma soluble (18 kDa) (Fig. 29E). El reconocimiento de la forma lipidada de una manera más intensa en AH, apoya el resultado obtenido en las Figs. 16 y 17, donde se observó mayor presencia de vesículas autofágicas en la condición de AH a 24 h.

Para corroborar que las bandas que sugerimos como la forma soluble y lipidada de la proteína TvAtg8b correspondan, se realizaron tres experimentos: 1) el lisado de parásitos crecidos en condiciones normales de cultivo durante 24 h, obteniendo por separado la fracción insoluble en la de la pastilla (P) y la fracción soluble (FS) como se menciona en Materiales y Métodos, por electroforesis y WB utilizando geles de tricina (TT-SDS) (Fig. 30A). . Un dato importante que se observó y que debemos mencionar es que; durante la electroforesis, ambas fracciones migraron diferente, llegando primero al fondo del gel la fracción proveniente de la pastilla (P), quedando un poco más arriba la fracción soluble (FS) (Fig. 30B).

Cuando se realizó el ensayo de WB con el Ac α -rTvAtg8b se puede observar la detección de manera intensa una banda de ~9 kDa (TvAtg8b-PE) en la fracción de la pastilla, la cual correspondería a la forma lipídica y de manera tenue el reconocimiento de una banda de ~18 kDa en la misma fracción (Fig. 30D). Y de igual intensidad se observó una banda de ~18 kDa (si se hubiera migrado igual que la fracción insoluble) en la fracción soluble (FS) (Fig. 30D).

Figura 23. Obtención de la proteína recombinante TvAtg8b (rTvAtg8b). A. Inducción a dos temperaturas de la proteína recombinante rTvAtg8b. En el panel de la izquierda, se observa la inducción con IPTG [1 mM] a 16 °C durante 3 h. Carril 1, 7 µl de marcadores precision plus protein™ standards, dual color (Cat. No. 161-0374, BIO-RAD). Carril 2, 25 µl de la fracción no inducida (NI) del C(+); carril 3, 25 µl de la fracción inducida (I) del C(+), carril 5, 25 µl de la fracción no inducida (NI) correspondiente a la proteína recombinante (rTvAtg8b); carril 6, 25 µl de la fracción inducida (I) de rTvAtg8b. Panel de la derecha. Inducción con IPTG [1 mM] a 37 °C durante 3 h. Carril 1, 7 µl de marcadores precision plus protein™ standards, dual color; carril 2, 25 µl de la fracción inducida (I) del C(+); carril 3, 25 µl de la fracción no inducida (NI) de rTvAtg8b; carril 4, 25 µl de la fracción inducida (I) de rTvAtg8b. Se observó la inducción de una banda de 13 kDa que corresponde al C(+); recombinante del prepro de la TvCP4 y la inducción de una banda de 18 kDa que corresponde a la proteína rTvAtg8b. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 12%. **B. Reconocimiento de la etiqueta de histidinas de la proteína recombinante (rTvAtg8b).** Se muestra membranas en las cuales se electro transfirió una réplica de los geles mostrados en la parte superior. Se observa el reconocimiento con el Ac anti-His tag (Dil 1:3 000) de una banda de 13 kDa en la fracción I del C(+) y de una banda de 18 kDa en la fracción I correspondiente a la proteína rTvAtg8b.

A**B**

2) El segundo experimento, fue ensayos de WB, en los cuales la muestra fue el lisado de parásitos después de cultivarlos en ausencia y presencia del inhibidor Wortmanina durante 60 min con el Ac α -rTvAtg8b, observando la detección de manera intensa de una banda de ~18 kDa (TvAtg8b-I) tanto en ausencia y en presencia del inhibidor (Fig. 31), no así la banda de ~9 kDa (TvAtg8b-II), la cual disminuyó en presencia del inhibidor (Fig. 31), Este resultado sugiere que la banda de 9 kDa corresponda a la formada lipídada TvAtg8b-II ya que coincide con lo reportado por Klionsky y col., 2007; Gómez-Sánchez y col., 2015. Donde se menciona que el uso de este tipo de inhibidores; los cuales interfieren con la formación del autofagosoma; mediante WB su efecto de inhibición se ve en la cantidad disminuida de la isoforma de LC3-II o Atg8-II a nivel de proteína. Y 3) ensayos de WB de lisado de parásitos crecidos en AH previamente tratados con formaldehído al 1.6%. Este método es utilizado para la preservación de complejos entre proteínas, Como se muestra en la Fig. 32, el Ac α -rTvAtg8b reconoció 3 bandas: una banda de ~9 kDa (forma lipídada), otra banda de ~10 kDa (posiblemente la nativa, soluble) y por último una banda de ~18 kDa en la fracción de la pastilla (P). En cambio, en la fracción soluble (S) solo se detecta el reconocimiento de las bandas de ~9 kDa y ~18 kDa.

Estos resultados de WB sugieren que el reconocimiento de ambas bandas (18 y 8/9 kDa) por el anticuerpo anti-rTvAtg8b son las dos isoformas (soluble y lipídica) de la proteína TvAtg8b de *T. vaginalis*.

Hasta el momento a nivel de ultraestructura en las diferentes condiciones inductoras de autofagia, se observó la presencia de vesículas tipo autofágicas (AVi o AVd), se detectaron autofagosomas típicos (doble membrana), así como diversos tipos de vesículas de diferentes tamaños que podrían o no estar involucradas con un proceso activo de autofagia, con diferente contenido citoplásmico, a excepción de la condición de AH, en la cual fue mayoritaria la autofagia de hidrogenosoma a un tiempo prolongado de cultivo.

En las mismas condiciones de cultivo analizadas por ultraestructura se detectó la expresión de la proteína nativa TvAtg8b como una banda de 18 kDa (posiblemente la forma soluble) y otra de 9 kDa (posiblemente la forma lipídada) en ensayos de WB. Sin embargo, la siguiente duda a responder era: ¿el anticuerpo verdaderamente está reconociendo a la proteína marcadora de autofagia?, si era así, la detección de esta proteína en ensayos de inmunofluorescencia debía ser de manera puntiforme, sugiriendo así la presencia de vesículas Atg8-positivas.

7.4 Localización de Atg8b en condiciones inductoras de autofagia en *T. vaginalis*.

Para este ensayo, se eligió sólo las condiciones que podrían inducir autofagia como una respuesta de sobrevivencia a la falta y exceso de nutrientes, como son: Rapa (inductor convencional), restricción de hierro (RH) así como restricción de glucosa (RG), alta glucosa (AG) y como condición control, condiciones normales de cultivo (N). Descartando AH, la cual se pretende estudiar a tiempos muy cortos de cultivo (cuestión de minutos) (objetivo 3 de este proyecto). En la Fig. 33A observamos la detección con el anticuerpo α -rTvAtg8b de manera puntiforme (paneles c, g, k, o y s) en comparación con el suero preinmune (PI) usado como control negativo (Fig. 33A, panel w), lo cual sugiere la presencia de estructuras-TvAtg8b positivas tipo autofagosomas en las diferentes condiciones inductoras de autofagia. El mayor porcentaje de células con estructuras TvAtg8b-positivas fue detectado en parásitos crecidos en RG (32%), comparado con 9% en la condición N, con 8% en la condición de Rapa, con 11% en la condición RH y con un 7% en la condición de AG (Fig. 33B). Adicional a este dato, el número de estructuras tipo vesículas TvAtg8b-positivas por célula fue mayor en la condición de RG (cercano a 4 estructuras por célula) en comparación con las otras condiciones inductoras de autofagia, en las cuales el número de estructuras tipo vesículas TvAtg8b-positivas fue de: 1 por célula en la condición N y ~2 por célula en las condiciones de Rapa, de RH y de AG (Fig. 33C).

Figura 24. Purificación de la proteína recombinante TvAtg8b (rTvAtg8b).

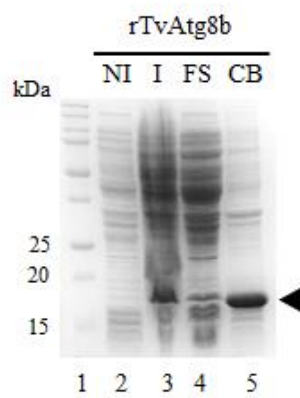
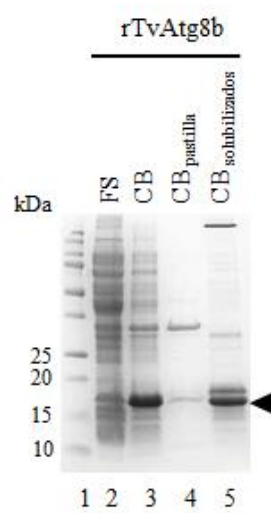
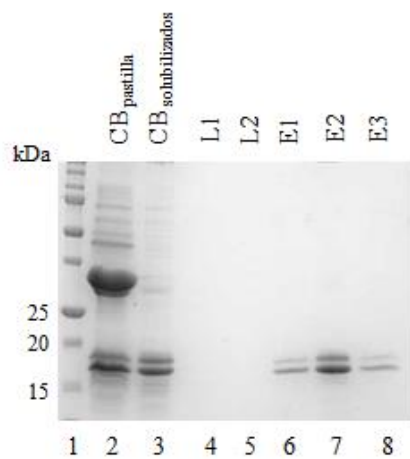
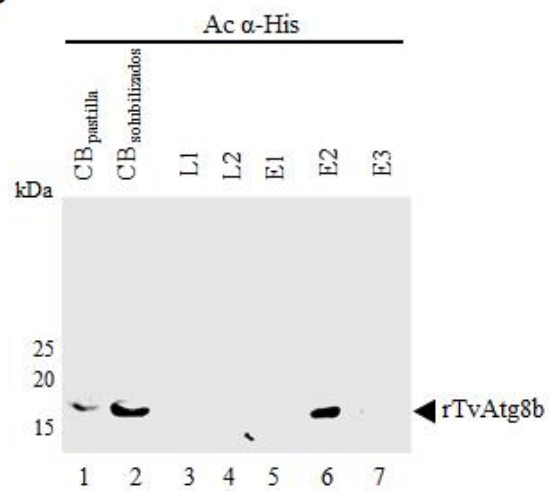
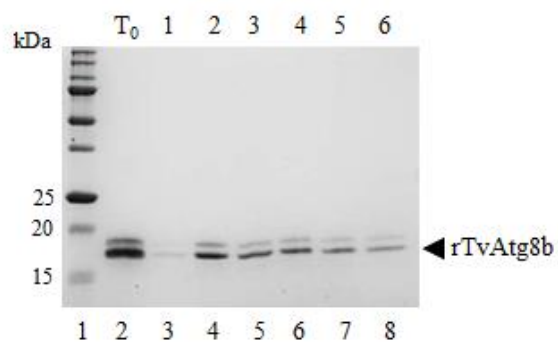
A. Fracción donde se encuentra la proteína rTvAtg8b. Carril 1, 7 μ l de marcadores precision plus protein standards, dual color; carril 2, 20 μ l de la fracción (NI); carril 3, 20 μ l de la fracción (I); carril 4, 20 μ l de la fracción soluble (FS) del lisado de bacterias; carril 5, 20 μ l de la fracción cuerpos de inclusión (CB) del lisado de bacterias. La proteína recombinante rTvAtg8b se observa en la fracción CB. Gel de poliacrilamida al 12%.

B. Solubilización de los cuerpos de inclusión (CB). Carril 1, 7 μ l de marcadores precision plus protein standards, dual color; carril 2, 20 μ l de la FS; carril 3, 20 μ l de la fracción CB; carril 4; 20 μ l de la pastilla obtenida de la solubilización de los CB (CB_{pastilla}), carril 5, 20 μ l de la solubilización de los CB ($CB_{\text{solubilizados}}$). Gel de poliacrilamida al 12%.

C. Purificación de la proteína recombinante (rTvAtg8b) por afinidad a níquel. Carril 1, 7 μ l de marcadores (antes mencionados); carril 2, μ l de la pastilla obtenida de la solubilización de los CB (CB_{pastilla}); carril 3, 20 μ l de la solubilización de los CB ($CB_{\text{solubilizados}}$), carriles 4-5, 20 μ l de la fracción de lavados (L1 y L2); carriles 6-8, 20 μ l de la fracción de eluidos (E1, E2 y E3). Gel de poliacrilamida al 12%.

C. Reconocimiento de la proteína recombinante (rTvAtg8b) con el anticuerpo α -His Tag. Una réplica del gel mostrado en **C**, se electro transfirió a una membrana de nitrocelulosa de 0.2 μ m. La cual se incubó con el Ab α -His Tag (dilución 1:3 000) el cual reconoce a la proteína recombinante (rTvAtg8b) en la fracción CB_{pastilla} , $CB_{\text{solubilizados}}$ y en E2.

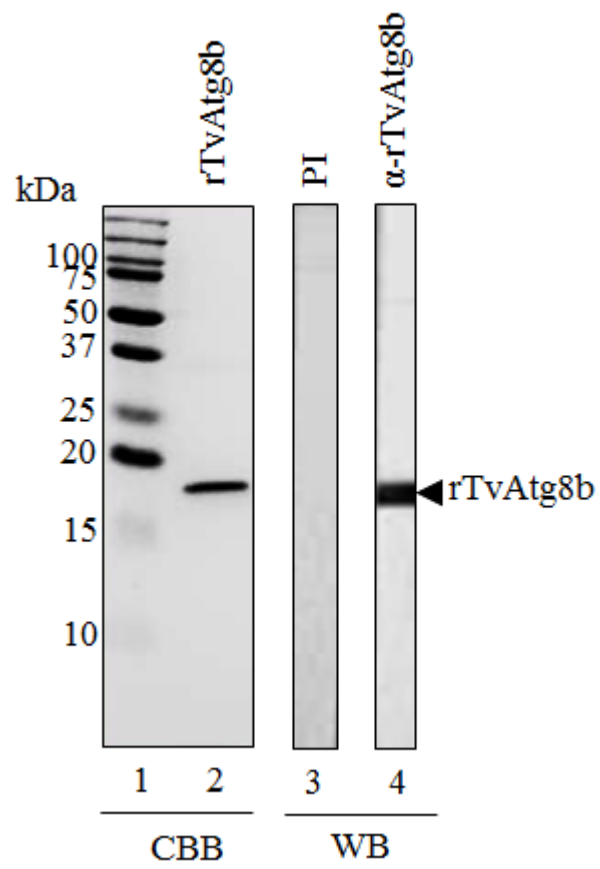
D. Eluidos obtenidos por pD10. Columna de intercambio iónico, eluidos en PBS pH7.0. Carril 1; 7 μ l de marcadores; carril 2, 20 μ l de la muestra sin pasar por la columna (t_0), carriles 3-8; eluidos de las fracciones E1 y E2 obtenidos en **C** con 3 ml de PBS pH7.0, los cuales fueron recolectados en alícuotas de 500 μ l, Gel de poliacrilamida al 12%.

A**B****C****D****E**

También se destacó la distribución en los tamaños encontrados de las vesículas TvAtg8b-positivas detectadas en las diferentes condiciones inductoras de autofagia. En la condición N, el 75% de las vesículas tenían un tamaño $\leq 1 \mu\text{m}$ (Fig. 33A, panel c; asterisco), mientras el otro 25% tenía un tamaño $\leq 2 \mu\text{m}$. En la condición de Rapa, el 76.2% de las vesículas tenía un tamaño $\leq 1 \mu\text{m}$ (Fig. 33A, panel g; flechas blancas) y el otro 23.8% tenía un tamaño $\leq 2 \mu\text{m}$. En la condición de RH, el 52.8% de las vesículas tenía un tamaño $\leq 1 \mu\text{m}$, mientras el otro 47.8% tenía un tamaño $\leq 2 \mu\text{m}$ (Fig. 33A, panel k; flechas blancas). En la condición de AG, el 95.4% de las vesículas tenía un tamaño $\leq 1 \mu\text{m}$, mientras el otro 4.6% tenía un tamaño $\leq 2 \mu\text{m}$ (Fig. 33A, panel s; asterisco). Por último, en la condición de RG, se detectaron vesículas de 3 tamaños: 1) el 29.1% fue de vesículas con un tamaño $\leq 1 \mu\text{m}$, 2) el 64.6% fue de vesículas con un tamaño $\leq 2 \mu\text{m}$ y 3) el 6.3% fue de vesículas con un tamaño $\leq 2.8 \mu\text{m}$ (Fig. 33A, panel o; flechas blancas) (Tabla 1). Estos resultados muestran que la condición de RG indujo más vesículas Atg8b-positivas por célula, así como vesículas de mayor tamaño en comparación con las otras condiciones. Por lo que surgió la siguiente pregunta: ¿Estas vesículas de gran tamaño provienen de la fusión de autofagosomas con lisosomas, dando origen a autolisosomas, y es lo que estamos detectando con el Ab anti-TvAtg8b en la condición de RG?

Para responder la pregunta anterior, realizamos ensayos de inmunofluorescencia utilizando dos maneras de detectar los autolisosomas (vesículas ácidas del flujo autofágico): La primera, fue con el kit Cyto-ID® Autophagy detection (el cual marcaría vesículas del flujo autofágico; vesículas pre y autofágicas) más lysotracker (marcador de lisosomas). Este ensayo a su vez nos sirvió de control con respecto al Ac producido contra la proteína recombinante rTvAtg8b, ¿el anticuerpo anti-TvAtg8b reconoce autofagosomas? La segunda manera fue utilizando el Ac α -TvAtg8b más lysotracker en RG.

Figura 25. Reconocimiento de la proteína recombinante (rTvAtg8b) por los anticuerpos producidos en conejo. Carril 1, 7 μ l de marcadores “precision plus protein standards dual color”, carril 2; electroforesis de la proteína recombinante rTvAtg8b. Gel de poliacrilamida al 15%, teñido con azul de coomassie (CBB). Carril 3, réplica del gel anterior electro transferido a una membrana de 0.2 μ m e incubada con el suero preinmune (PI) (dilución 1:200), carril 4, membrana incubada con el Ab α -rTvAtg8b (dilución 1:200) donde se reconoce la banda correspondiente a la proteína rTvAtg8b (peso aprox. de 18 kDa). Carriles 3 y 4 ensayos de WB.

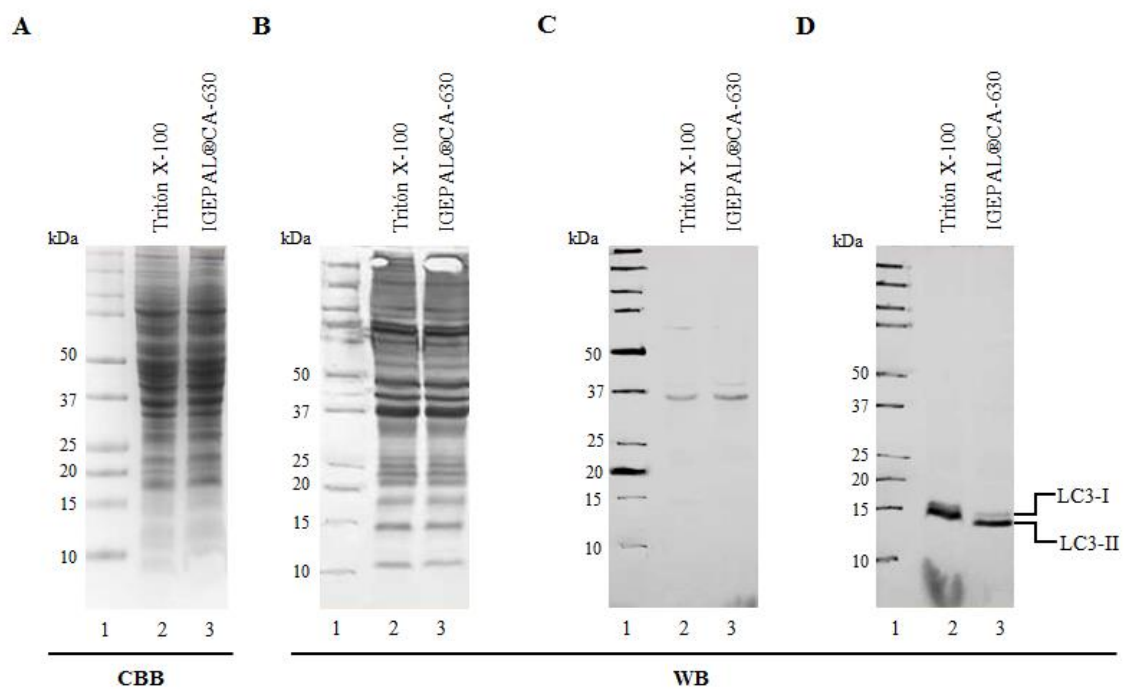


Cuando se usó el marcador Cyto-ID® de autofagia la mayoría de los autofagosomas detectados (Fig. 34D) también se marcaron con lysotracker (Fig. 34C), como se observa en el panel de traslape (Fig. 34E), así como en el zoom hecho en una región del traslape (Fig. 34F). Notablemente, el anticuerpo α -TvAtg8 b (Fig. 34J) funcionó de igual manera que el kit o incluso mejor, ya que permitió distinguir vesículas preautofágicas; como fagoforos o membranas de aislamiento y autofagosomas (Fig. 34L, se observan en color verde) de vesículas ácidas como son los autolisosomas (Fig. 34K) los cuales se originan a partir de la fusión de autofagosomas (cuyo marcador característico es Atg8) (Fig. 34J, verde) con vesículas ácidas (Fig. 34I, rojo) que en este ensayo observamos de color amarillo (Fig. 34K y L). Los autolisosomas son organelos que confirman el último paso del flujo autofágico, por lo que para corroborar la presencia de este tipo de organelos realizamos ensayos de inmunofluorescencia en ausencia y presencia del inhibidor E64d así como zimogramas para verificar la inhibición de la actividad proteolítica de proteasas (Fig. 35C). En la Fig. 35 observamos la acumulación de autolisosomas (Fig. 35A, panel I; B) en presencia del inhibidor.

La detección de Atg8 y su localización en vesículas tipo autolisosomas son indicativos de eventos finales del proceso autofágico en *T. vaginalis*. Sin embargo, surge otra pregunta: ¿la proteína TvAtg8b participa en la biogénesis del autofagosoma? Es decir ¿estará involucrada en los pasos iniciales del proceso autofágico?

Los pasos iniciales del proceso autofágico, como ya se mencionó en la introducción involucran lo siguiente: 1) membrana de aislamiento o fagóforo; etapa que consta de una membrana naciente alrededor del material citoplásmico a englobar. 2) Expansión, etapa del alargamiento de la membrana de aislamiento en la cual participa el complejo Atg7/Atg3/Atg8. 3) Maduración, la formación esférica de la vesícula autofágica, la cual cuando esté terminada dará lugar 4) al autofagosoma (AV), organelo esférico de doble membrana el

Figura 26. Reconocimiento de la proteína LC3 (ortólogo de Atg8) con el Ab α -LC3 en dos tipos de lisados de células HeLa. A. Carril 1, 7 μ l de marcadores; carril 2, 20 μ l del lisado de células HeLa con el amortiguador B (detergente Tritón X-100), 20 μ l del lisado de células HeLa con el amortiguador A (IGEPAL®CA-630). Electroforesis en gel de tricina teñido con azul de Coomassie (CBB). **B.** Réplica del gel mostrado en **A** electro-transferido a una membrana de nitrocelulosa para realizar el ensayo de WB con el Ab α -Total de células HeLa (1:1 000), como control positivo C(+). Revelado por color. **C.** Ensayo de WB con el Ac secundario α -IgG de conejo acoplado a HRP (1:10 000), como control negativo C (-). **D.** Ensayo de Wb con el Ab primario α -LC3 (1:10 000), después de los lavados incubado con el Ab secundario α -IgG de conejo acoplado a HRP (1: 3 000) para ser revelado por color. Se observa el reconocimiento tenue de una banda de 14 kDa que corresponde a LC3-I (forma soluble de LC3) e intenso de una banda de 12 kDa que corresponde a LC3-II (forma lipídica de LC3) en los dos tipos de extractos usados.



cual posteriormente se fusionará con el lisosoma originando un nuevo organelo denominado 5) autolisosoma, el cual degrada el material citoplásmico previamente secuestrado por el autofagosoma con ayuda de la actividad de las hidrolasas, así como también a la membrana externa del autofagosoma, quedando un organelo de una sola membrana y de mayor tamaño. En la Fig. 36 se muestra la detección de la proteína TvAtg8b en cada una de las etapas del flujo autofágico en RG. Este resultado sugiere la participación de la proteína TvAtg8b en la biogénesis del autofagosoma.

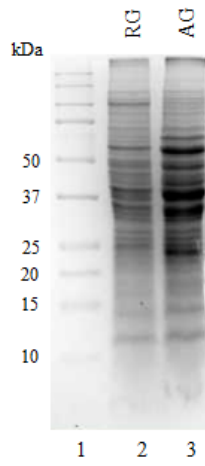
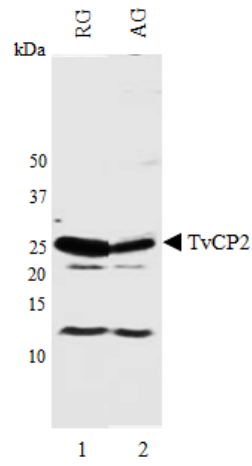
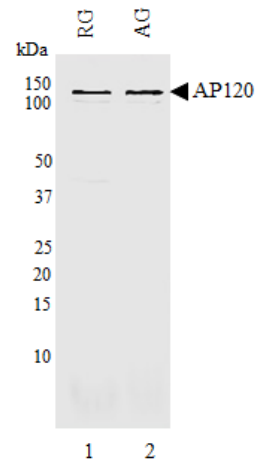
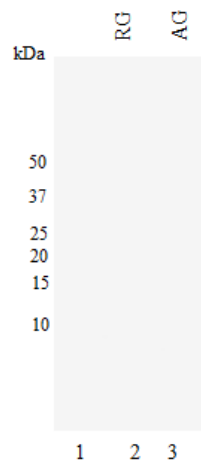
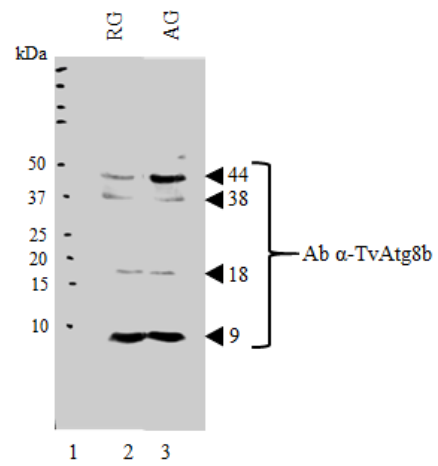
Hasta el momento, sabemos que las distintas condiciones analizadas en este trabajo indujeron autofagia en *T. vaginalis*, sólo la condición de alto hierro tiene efecto en la sobre-expresión de la proteína PFO-A/AP120, pero no RG, AG, RH o Rapa (Figs. 27, 28 y 29). Por lo que nos formulamos la siguiente pregunta: ¿Se requiere de una sobre expresión de PFO-A/AP120 para su relocalización en la superficie del parásito?

7.5. Localización de PFO-A/AP120 en la superficie del parásito en las distintas condiciones inductoras de autofagia.

Como observamos mediante ensayos de WB, la proteína PFO-A/AP120 solo se sobre-expresó en AH, ni siquiera en AG se observó una sobre-expresión de dicha proteína. Por lo que la siguiente hipótesis formulada fue: la sobre-expresión de PFO-A/AP120 favorece la relocalización de esta proteína hidrogenosomal hacia la superficie del parásito donde adquiere la función de adhesina mediante la autofagia del hidrogenosoma que se utiliza como una vía no convencional de transporte.

Por lo antes mencionado, realizamos ensayos de inmunofluorescencia indirecta con parásitos cultivados en las diferentes condiciones inductoras de autofagia, fijados pero no permeabilizados para detectar a la proteína PFO-A/AP120 en la superficie de los parásitos.

Figura 27. Expresión de la proteína TvAtg8b en las condiciones de RG y AG. A. Extractos obtenidos en RG y AG. Carril 1; 7 μ l de marcadores; carril 2, 15 μ l del extracto obtenido del lisado de parásitos en glucosa restringida (GR); carril 3; 15 μ l del extracto obtenido del lisado de parásitos en alta glucosa (AG). Gel de tricina teñido con azul de coomassie (CBB). **B. Ensayo de WB con el Ac α -TvCP2.** Réplicas del gel mostrado en **A**, se electro transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0.2 μ m para los ensayos de WB. Se incubó una de estas membranas con el Ac α -TvCP2 (dilución 1:2 000). **C. Ensayo de WB con el Ac α -PFO50.** Se incubó una membrana con el Ac α -PFO50 (dilución 1:7 000). **D. Ensayo de WB con el suero preimmune (PI).** Se incubó una membrana con el PI (dilución 1:5 000) como control negativo, C(-). **E. Ensayo de WB con el Ac α -TvAtg8b.** Se incubó una membrana con el Ac α -TvAtg8b (dilución 1:5 000). Los ensayos de WB se revelaron por quimioluminiscencia y por placa.

A**CBB****B****WB****C****D****E****WB**

En la Fig. 37 observamos que sólo AH indujo la relocalización de PFO-A/AP120 hacia la superficie de los parásitos. Este resultado sugiere que la sobre- expresión de PFO-A/AP120 promueve su relocalización y función como adhesina. Las siguientes preguntas a contestar: En las condiciones inductoras de autofagia; exceptuando AH; ¿la adherencia de los parásitos es menor? Si las principales adhesinas requieren de una sobre-expresión a nivel de proteína para después relocalizarse a la membrana plasmática, ¿Cuáles son las proteínas que participan en la adhesión en condiciones inductoras de autofagia diferentes a AH? Por último ¿Se requiere de la autofagia del hidrogenosoma inducida por alto hierro para relocalizar a PFO-A/AP120 del hidrogenosoma a la superficie del parásito?

7.6 Efecto de la Wortmanina (inhibidor de autofagia) en la relocalización de PFO-A/AP120 hacia la superficie del parásito en AH.

Para saber si la relocalización de PFO-A/AP120 hacia la superficie del parásito en AH requería de la autofagia del hidrogenosoma (Fig. 5), realizamos una cinética a tiempos cortos de cultivo en AH (0, 20, 30 y 40 min) en ausencia y presencia del inhibidor Wortmanina (concentración 50 μ M). Este fármaco es permeable y además es un potente inhibidor, selectivo e irreversible de la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K, siglas en inglés), la cual se requiere para el proceso autofágico. La inhibición de PI3K con wortmanina disminuye la formación de autofagosomas afectando de este modo la autofagia.

En la Fig. 38 observamos una cinética en ausencia y presencia de wortmanina (wort) donde no se detectó a PFO-A/AP120 en un tiempo cero (t_0 min) en la membrana al usar parásitos no permeabilizados (PNP), a los 20 min (t_{20} min) se detectó a la adhesina de 120 kDa (AP120) en la superficie de los parásitos (se observa en color amarillo). Sin embargo, en presencia de wortmanina, al mismo tiempo de cultivo se observa un exceso de PFO-A/AP120 acumulado en el citoplasma de los parásitos (se observa en color verde), lo que podría sugerir que al inhibir la formación de autofagosomas, no ocurrió el

secuestro del hidrogenosoma dentro de este tipo de vesículas y por ende no llegó la proteína hidrogenosomal (PFO-A) a la superficie del parásito.

A los tiempos de 30 y 40 min en ausencia del inhibidor no se observó nuevamente a la proteína PFO-A/AP120 en la superficie del parásito pero al compararlo con los mismos tiempos en presencia de wortmanina se observa con mayor intensidad la detección de la proteína PFO-A/AP120 en el citoplasma de los parásitos.

Para corroborar el efecto inhibidor de la autofagia inducida por altas concentraciones de hierro, realizamos a los mismos tiempos una cinética en ausencia y presencia de wortmanina pero ahora siguiendo a la proteína TvAtg8b.

Al inhibirse la autofagia por la wortmanina, la presencia de vesículas Atg8-positivas debió de reducirse en presencia del inhibidor como se observa en la Fig. 38. Este resultado sugiere fuertemente que la proteína PFO-A/AP120 llega a la superficie del parásito a través de un proceso inicial de autofagia del hidrogenosoma inducida únicamente por altas concentraciones de hierro.

Figura 28. Expresión de la proteína TvAtg8b en ausencia y presencia del inductor de autofagia (Rapamicina). **A.** Carril 1; 7 μ l de marcadores; carril 2, 15 μ l del extracto obtenido del lisado de parásitos en ausencia de Rapa; carril 3; 15 μ l del extracto obtenido del lisado de parásitos en presencia de Rapa. Gel de tricina teñido con azul de Coomassie (CBB). **B. Ensayo de WB con el Ac α -TvCP2.** Réplicas del gel mostrado en **A**, se electro transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0.2 μ m para los ensayos de WB. Se incubó una de estas membranas con el Ac α -TvCP2 (dilución 1:2 000). **C. Ensayo de WB con el Ac α -PFO50.** Se incubó una membrana con el Ac α -PFO50 (dilución 1:7 000). **D. Ensayo de WB con el suero preimmune (PI).** Una membrana se incubó con el suero PI (dilución 1:5 000) como control negativo, C(-). **E. Ensayo de WB con el Ac α -TvAtg8b.** Una membrana se incubó con el Ac α -TvAtg8b (dilución 1:5 000). Los ensayos de WB se revelaron por quimioluminiscencia y por placa.

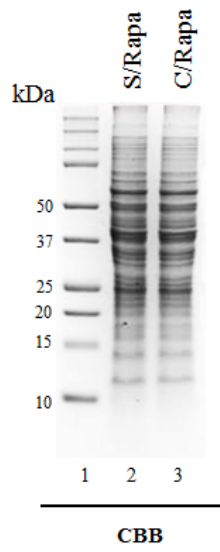
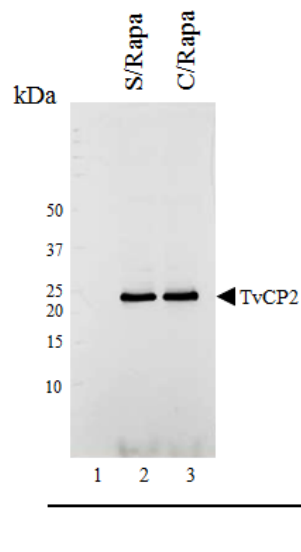
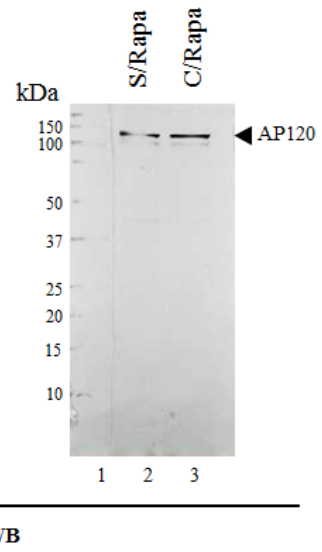
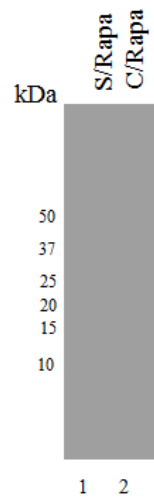
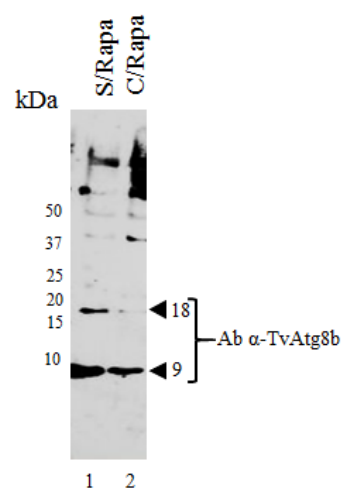
A**B****C****D****E****WB**

Figura 29. Expresión de la proteína TvAtg8b en restricción de hierro (RH) y alto hierro (AH). **A.** Carril 1; 7 μ l de marcadores; carril 2, 15 μ l del extracto obtenido del lisado de parásitos en RH; carril 3; 15 μ l del extracto obtenido del lisado de parásitos en AH. Gel de tricina teñido con azul de Coomassie (CBB). **B. Ensayo de WB con el Ac α -TvCP2.** Réplicas del gel mostrado en **A**, se electro-transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0.2 μ m para los ensayos de WB. Una de estas membranas se incubó con el Ac α -TvCP2 (dilución 1:2 000). **C. Ensayo de WB con el Ac α -PFO50.** Una membrana se incubó con el Ab α -PFO50 (dilución 1:7 000). **D. Ensayo de WB con el suero preinmune (PI).** Una membrana se incubó con el PI (dilución 1:5 000) como control negativo, C (-). **E. Ensayo de WB con el Ac α -TvAtg8b.** Una membrana se incubó con el Ac α -TvAtg8b (dilución 1:5 000). Los ensayos de WB se revelaron por quimioluminiscencia y por placa.

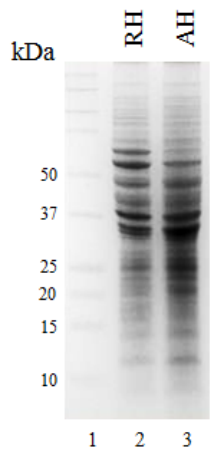
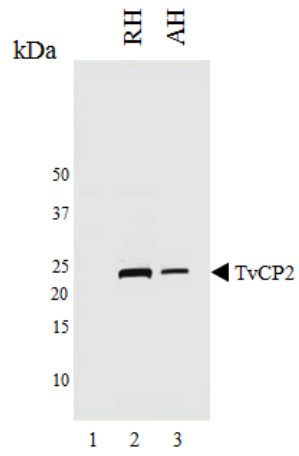
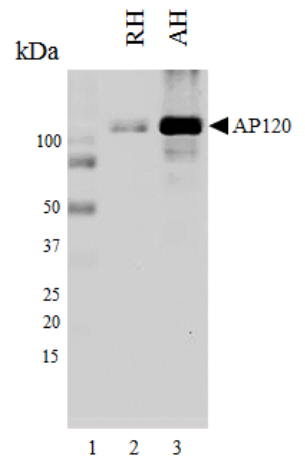
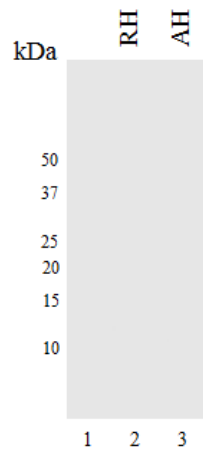
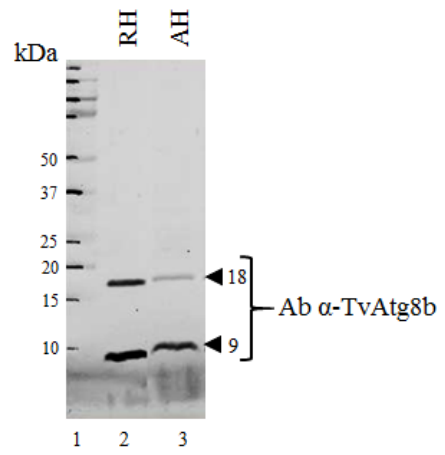
A**CBB****B****WB****C****D****E****WB**

Figura 30. Reconocimiento de la forma soluble y lipídica de TvAtg8b. A. Electroforesis de los extractos obtenidos a partir del lisado de parásitos en condiciones normales (N). Carril M; 7 μ l de marcadores; carril 1, 15 μ l del extracto proveniente de la pastilla (P) del lisado de parásitos en N; carril 2; 30 μ l del extracto proveniente de sobrenadante (FS) del lisado de parásitos en N. Gel de tricina teñido con azul de Coomassie (CBB). **B. Electro-transferencia de la pastilla (P) y sobrenadante (FS).** Réplicas del gel mostrado en A, se electro-transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0.2 μ m para los ensayos de WB. Se observa un corrimiento diferente entre ambas fracciones, migró más rápido la fracción P que la fracción FS. **C. Control (-) de WB con el suero preinmune (PI).** Una membrana se incubó con el suero preinmune (dilución 1:10 000). **D. Ensayo de WB con el Ac α -TvAtg8b.** Una membrana se incubó con el Ac α -TvAtg8b (dilución 1:10 000). Se observa la detección de la forma lipídica en la fracción de la pastilla (TvAtg8b-PE) y la forma soluble de la proteína (TvAatg8b) en la FS. Los ensayos de WB se revelaron por quimioluminiscencia y fotodocumentador.

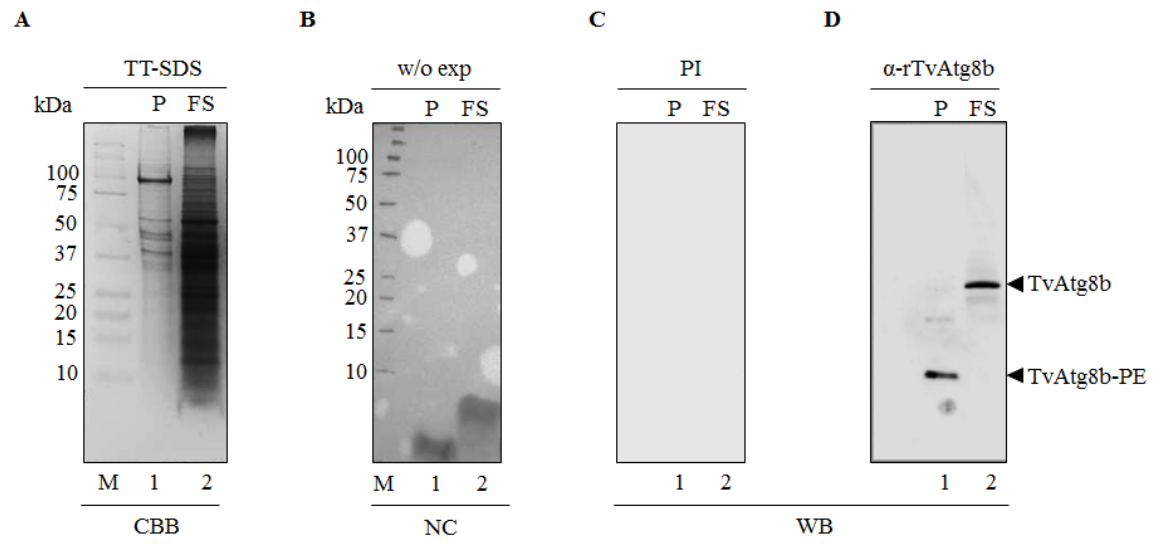


Figura 31. Reconocimiento de la forma soluble y lipidada de TvAtg8b en ausencia y presencia del inhibidor Wortmanina. Carril 1; 7 μ l de marcadores; carril 2, 15 μ l del lisado de parásitos en N durante 24 h; carril 3; 15 μ l del lisado de parásitos en N en ausencia de inhibidor (60 min), carril 4; 15 μ l del lisado de parásitos en N en presencia del inhibidor wortmanina (50 μ M) durante 60 min. Gel de tricina teñido con azul de Coomassie (CBB). Réplicas del gel mostrado, se electro-transferieron a membranas de nitrocelulosa de 0.2 μ m para los ensayos de WB. Una membrana se incubó con el Ac α -TvAtg8b (dilución 1:2 000). Se observa la detección de la forma soluble de la proteína (TvAatg8b-I) con la misma intensidad, no así la forma lipidada (TvAtg8b-II), la cual en presencia del inhibidor se detectó en menor intensidad.

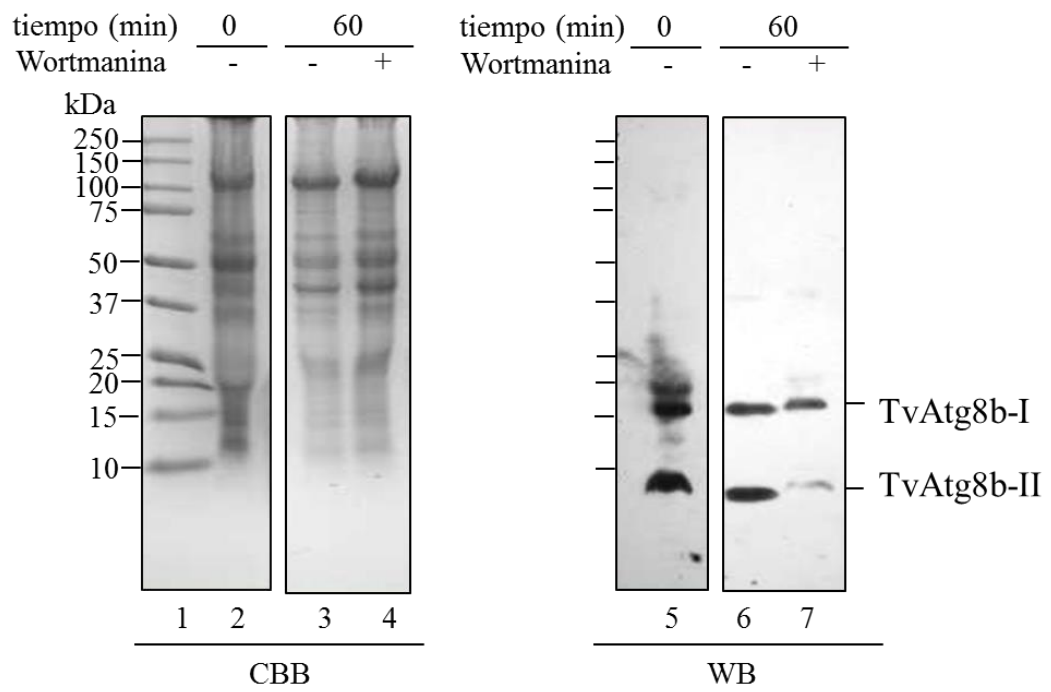


Figura 32. Reconocimiento de la forma soluble y lipídica de TvAtg8b en lisados de parásitos crecidos en AH, previamente tratados con formaldehído (detección de complejos entre proteínas). Electroforesis del lisado de parásitos previamente tratados con fijador (formaldehído al 1.6%). Carril 1; 7 μ l de marcadores, carriles 2, 5, 8, 11 y 14; 15 μ l de la fracción pastilla (P) de la lisis de número de parásitos de manera creciente ($2.5, 5, 10, 20$ y 40×10^6), carriles 3, 6, 9, 12 y 15; 15 μ l de la fracción soluble (S) de la lisis de parásitos de manera creciente. Gel de tricina teñido con azul de Coomassie (CBB). Se realizó la electro-transferencia del gel mostrado a membranas de nitrocelulosa de $0.2 \mu\text{m}$ para los ensayos de WB. Se incubó con el Ac α -TvAtg8b (dilución 1:1 000). Se observa la detección de tres bandas: $\sim 18, \sim 10$ kDa (de manera tenue) y una de ~ 8 kDa (reconocimiento fuerte).

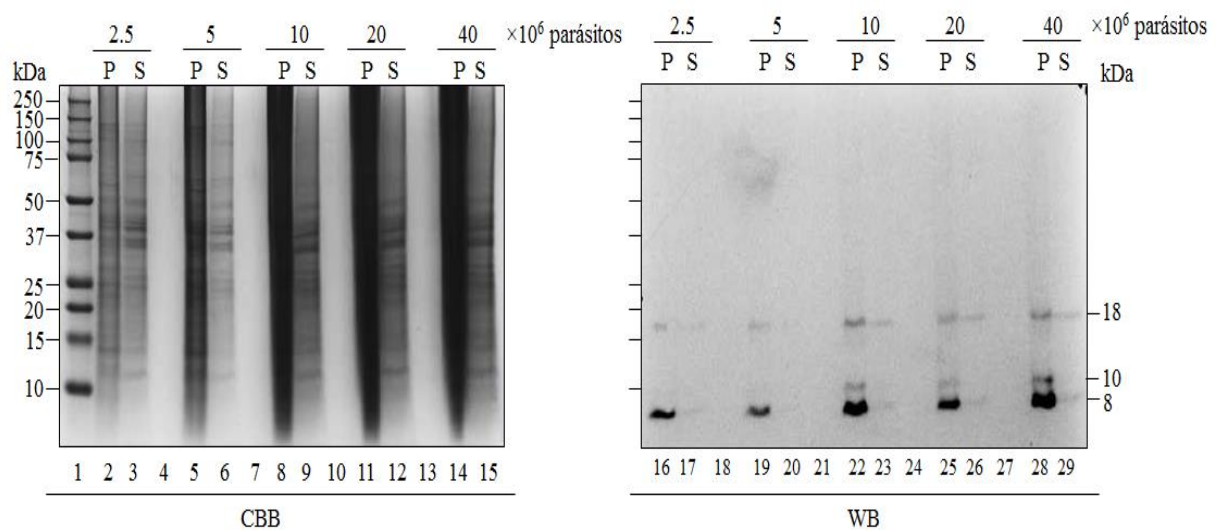
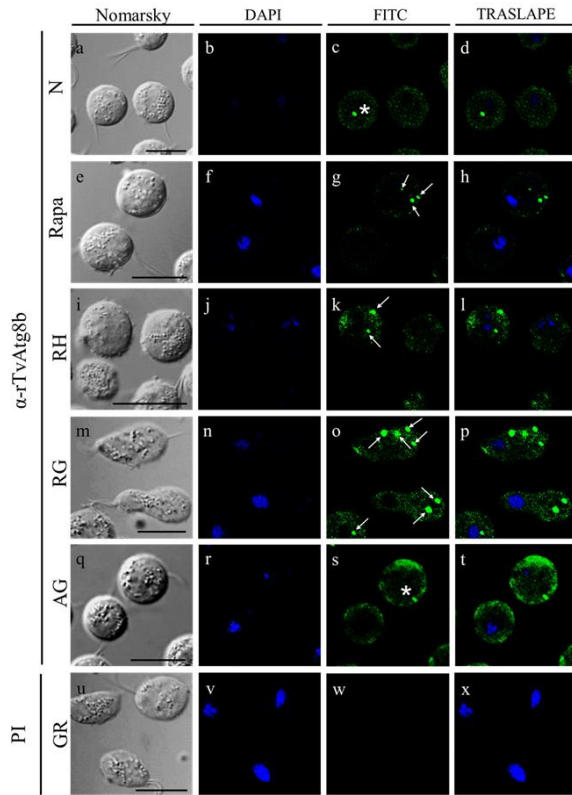
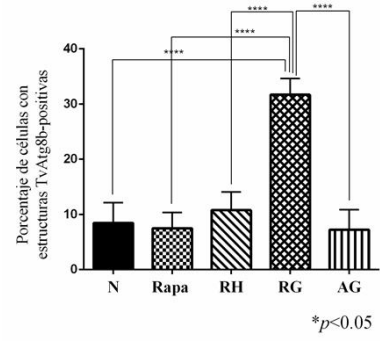


Figura 33. Localización de TvAtg8b en vesículas tipo autofagosomas en las diferentes condiciones inductoras de autofagia. **A.** Parásitos incubados en condiciones normales sin inductor (N, a-d), con 500 nM de Rapamicina (Rapa, e-h), en restricción de hierro (HR, i-l), en glucosa restringida (GR, m-o; u-x), y en alta glucosa (AG, q-t) las cuales fueron analizadas por ensayos de inmunofluorescencia y microscopía confocal, utilizando DAPI (azul) para la tinción de los núcleos, el anticuerpo α -rTvAtg8b o suero PI como anticuerpos primarios y como anticuerpo secundario α -IgG de conejo acoplado a FITC (verde). Asteriscos y flechas indican estructuras tipo vesículas TvAtg8-positivas. Barra = 10 μ m. **B.** Porcentaje de parásitos con estructuras TvAtg8-positivas en las diferentes condiciones mostradas en **A.** Aproximadamente 100 células fueron analizadas para cada condición de cultivo, la media y la desviación estándar se muestran con diferencia significativa. Comparación entre cada condición, con un valor (P value <0.05) indicada con (****). **C.** Promedio del número de estructuras TvAtg8-positivas por parásito positivo en cada condición de cultivo. Comparación entre las condiciones N vs GR, y AG vs GR con diferencia significativa (P value <0.05) indicada también con (**).

A



B



C

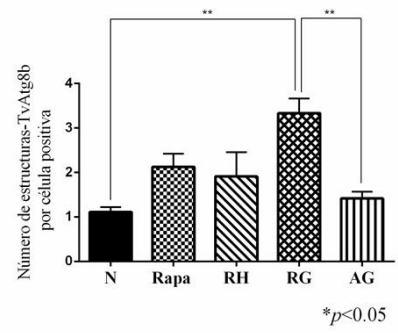


Tabla 1. Porcentaje de estructuras-TvAtg8b positivas con diversos tamaños inducidos en diferentes condiciones de cultivo

Condiciones de cultivo ^a	Tamaño de vesículas/vacuolas ^b (%)		
	0.1 - 1µm	1.1 - 2 µm	2.1 – 2.8 µm
N	75	25	0
Rapa	76.2	23.8	0
RH	52.8	47.2	0
RG	29.1	64.6	6.3
AG	95.4	4.6	0

^aCondiciones de cultivo; N: Normal; Rapa: [500] nM Rapamicina; RH: Restricción de hierro; RG: Restricción de glucosa; AG: Alta glucosa.

^bZEN 2009 light edition programa utilizado para medir el tamaño (diámetro) de las vesículas/vacuolas.

Figura 34. Detección de autofagosomas y autolisosomas con el Ab α -TvAtg8b en la condición de GR. A-F. Inmunofluorescencia indirecta mostrando la composición en 3D así como imágenes de parásitos obtenidos por Nomarsky de los cortes en Z, se muestra parásitos fijados con formaldehído y pretratados con lysotracker red y Cyto-ID™ para detección de vesículas autofágicas (señal verde fluorescente) durante 30 min a 37 °C. **G-L.** Parásitos fijados pretratados con lysotracker red, se incubaron con el anticuerpo primario α -rTvAtg8b (dilución 1:200), seguido de la incubación con el anticuerpo secundario α -IgG de conejo acoplado a FITC (dilución 1:200). **M-R.** Parásitos fijados pretratados con lysotracker red, fueron incubados con el suero preinmune (PI) de conejo (dilución 1:200), seguido de la incubación con el anticuerpo secundario α -IgG de conejo acoplado a FITC (dilución 1:200). Las imágenes de microscopia confocal (Zeiss) muestran vacuolas ácidas marcadas con Lysotracker (en rojo), vesículas autofágicas y/o vesículas TvAtg8b-positivas (en verde), y los núcleos marcados con DAPI (en azul). Las imágenes que corresponden al traslape muestran la colocalización entre Lysotracker Red y FITC (verde) en amarillo. Los paneles correspondientes al zoom, claramente muestran vesículas tipo autofagosomas (verde) de manera distinta de autolisosomas (amarillo). Barra = 10 μ m.

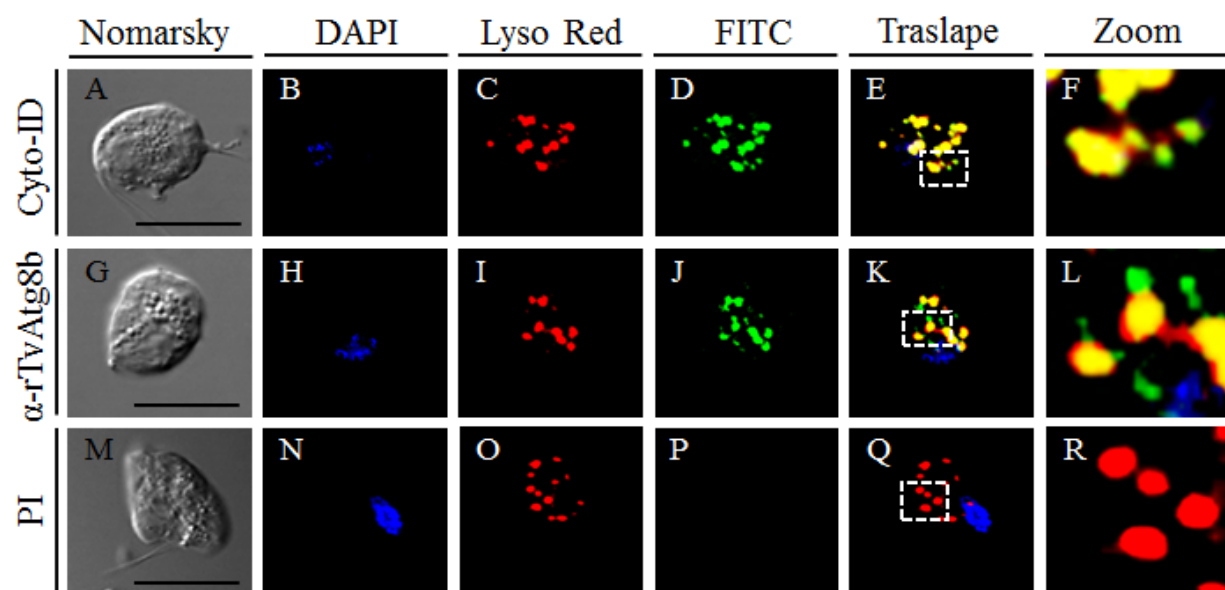


Figura 35. Detección de autofagosomas y autolisosomas con el Ab α -TvAtg8b en la condición de GR en ausencia y presencia del inhibidor E64d. **A.** Inmunofluorescencia indirecta mostrando la composición en 3D así como imágenes de parásitos obtenidos por Nomarsky de los cortes en Z, se muestra parásitos previamente cultivados sin y con E64d durante 30 min a 37 °C, posteriormente incubados con Lysotracker Red durante 30 min a 37 °C, posteriormente fijados con formaldehído. **a-l.** Parásitos incubados con el anticuerpo primario α -rTvAtg8b (dilución 1:200), seguido de la incubación con el anticuerpo secundario α -IgG de conejo acoplado a FITC (dilución 1:200). Las imágenes de microscopia confocal (Zeiss) muestran vacuolas ácidas marcadas con Lysotracker (en rojo), vesículas autofágicas y/o vesículas TvAtg8b-positivas (en verde), y los núcleos marcados con DAPI (en azul). Las imágenes que corresponden al traslape muestran la colocalización entre Lysotracker Red y FITC (verde) en amarillo. Los paneles correspondientes al zoom, claramente muestran vesículas tipo autolisosomas (amarillo). Barra = 10 μ m. **B.** Gráfica donde se muestra el porcentaje de células con acumulación de autolisosomas en ausencia y presencia del inhibidor E64d. Comparación entre cada condición, con un valor (P value <0.05) indicada con (*). **C.** Se muestra el gel de sustrato de las dos condiciones de cultivo en ausencia y presencia del inhibidor E64d, en cada carril (2-3) se cargó 15 μ l de muestra total.

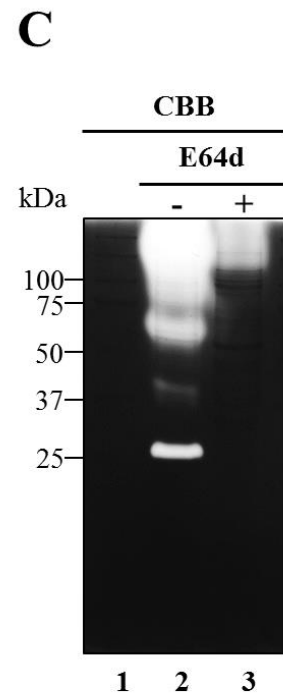
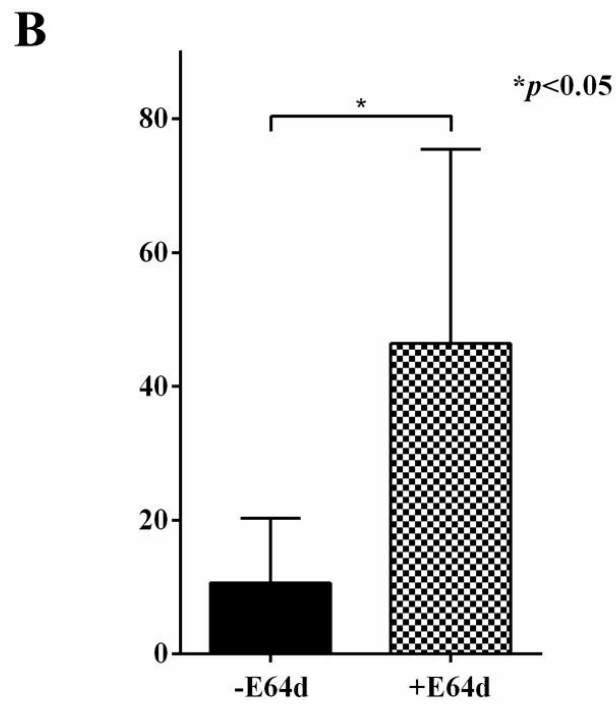
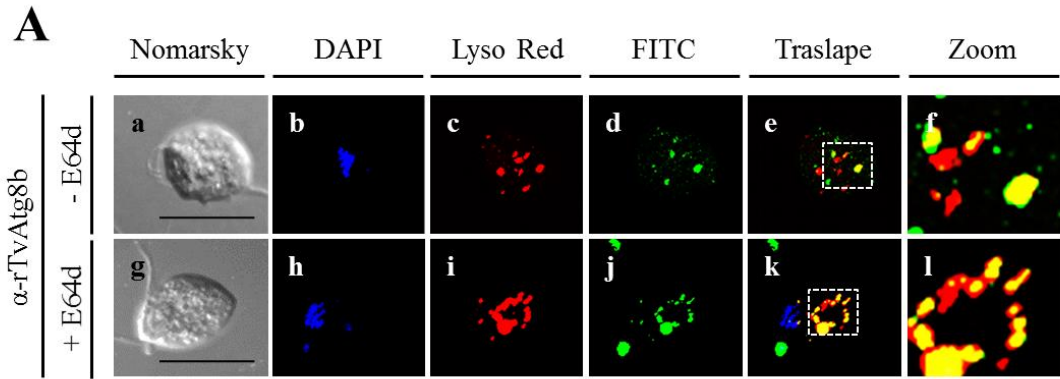


Figura 36. Participación de la proteína TvAtg8b en la biogénesis del autofagosoma durante el flujo autofágico en la condición de GR. A-D. Cortes finos de parásitos observados por MET e inmunomarcaje. TvAtg8b se detectó usando el anticuerpo α -TvAt8gb (cabezas de flecha). En las diferentes etapas que conforman la biogénesis del autofagosoma: **A.** 1) En la formación del fagóforo o membrana de aislamiento. **B.** 2) en la expansión o alargamiento de esta membrana en una región citoplásmica. **C.** 3) en la maduración y completa formación de la vesícula autofágica conocida como autofagosoma (AV). **D.** 4) en el último paso, en el cual se fusionó el lisosoma con el autofagosoma originando al autolisosoma, el cual se encarga de la degradación del material secuestrado por AV con ayuda de la actividad de las hidrolasas contenidas y también se detecta Atg8 en el interior del autolisosoma como parte del proceso de reciclaje de esta proteína. Barra = 200 nm.

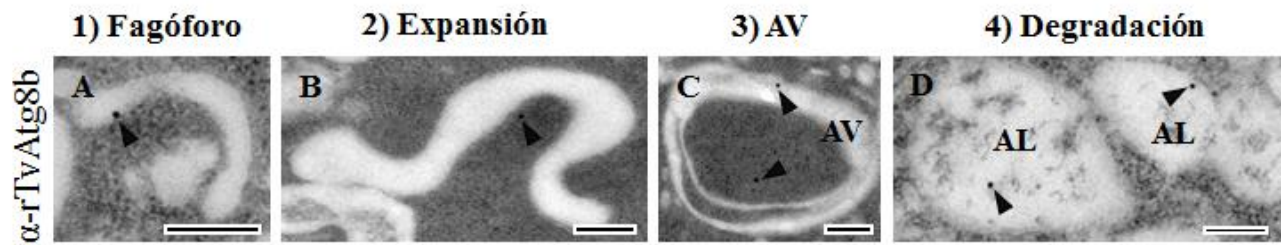


Figura 37. Localización de PFO-A/AP120 en la superficie de los parásitos en las diferentes condiciones inductoras de autofagia. Parásitos incubados en condiciones de restricción de glucosa (RG, A-F), en alta glucosa (AG, G-L), con 500 nM de Rapamicina (Rapa, M-R), en restricción de hierro (RH, S-X) y en alto hierro (AH, Y-4), las cuales fueron analizadas por ensayos de inmunofluorescencia y microscopía confocal, utilizando DAPI (azul) para la tinción de los núcleos, el anticuerpo α -PFOA como anticuerpo primario y como anticuerpo secundario α -IgG de conejo acoplado a FITC (verde), Dil (rojo) para la tinción de la membrana plasmática. La localización de PFOA en membrana se observa en el panel de traslape (amarillo), así como en el panel correspondiente al 3D, en el cual se muestra la proyección máxima de cada condición. Barra = 10 μ m.

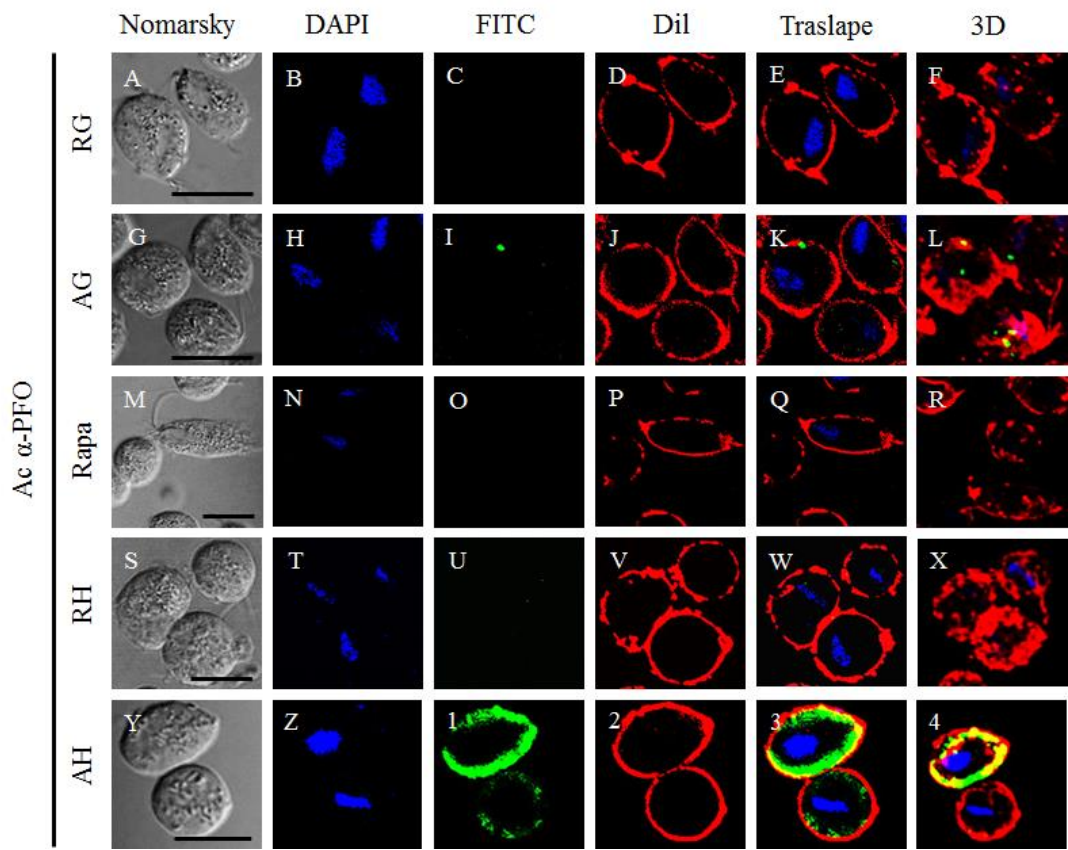
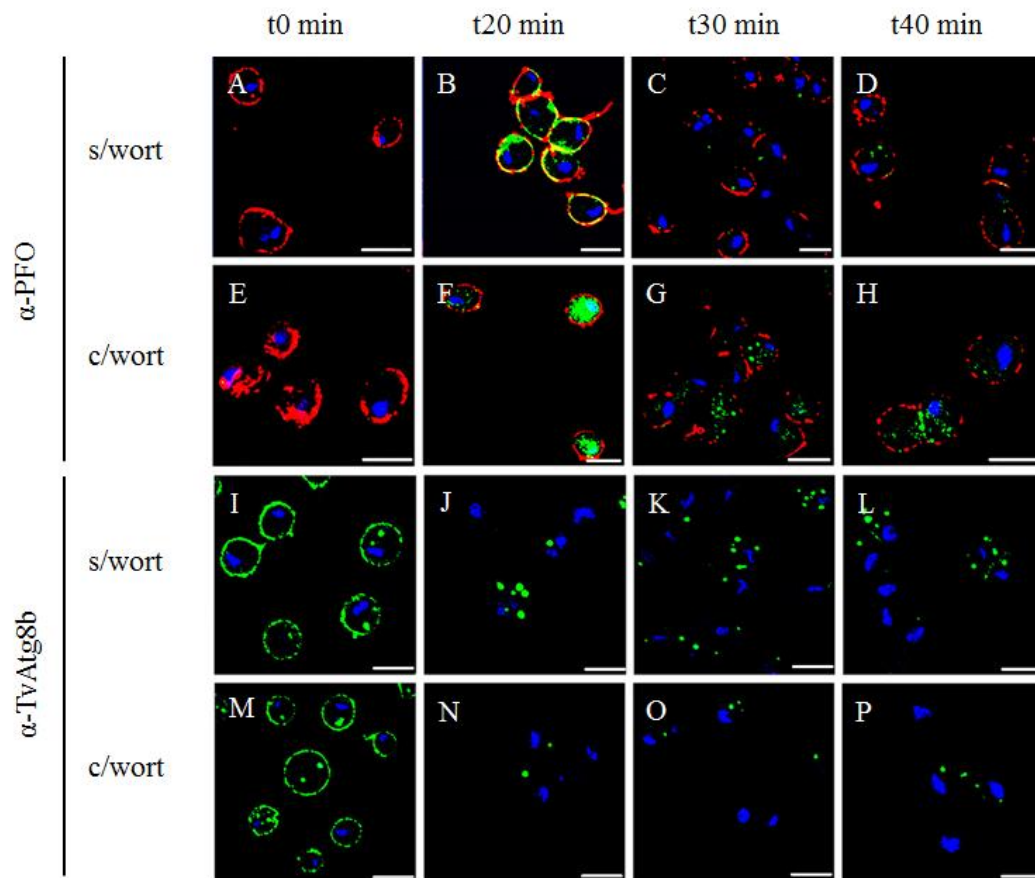


Figura 38. Relocalización de PFO-A/AP120 en la superficie de los parásitos en ausencia y presencia del inhibidor de autofagia en la condición de AH. Parásitos incubados en condiciones de alto hierro durante 0, 20, 30 y 40 min en ausencia del inhibidor de autofagia (s/wort, A-D, I-L), en AH con el inhibidor de autofagia (c/wort, E-H, M-P), los cuales fueron analizadas por ensayos de inmunofluorescencia y microscopía confocal, utilizando DAPI (azul) para la tinción de los núcleos, los anticuerpos α -PFOA o α -TvAtg8b como anticuerpo primario y como anticuerpo secundario α -IgG de conejo acoplado a FITC (verde), Dil (rojo) para la tinción de la membrana citoplasmática. La localización de PFOA en membrana se observa en amarillo. Barra = 10 μ m.



8. Discusión

La autofagia es un mecanismo que se activa para mantener la homeostasis y la sobrevivencia celular cuando hay escasez de nutrientes. Las proteínas que participan en dicho proceso han sido descritas como proteínas Atg por el acrónimo en inglés; AuTophagy-related (Kiel 2010). Estas proteínas están involucradas principalmente en el alargamiento y formación del autofagosoma a través de dos sistemas de tipo ubiquitinación. El primero de ellos conformado por las proteínas Atg12/Atg5/Atg16 y el segundo por las proteínas Atg7/Atg3/Atg8(LC3). La proteína Atg8 ha sido propuesta como marcador específico de autofagosomas así como de actividad autofágica (Kabeya et al., 2000, Kamada et al., 2000 & Ohsumi, 2001).

Sin embargo, *T. vaginalis* carece del complejo Atg12 y sólo posee el sistema tipo ubiquitinación de la proteína Atg8, para la cual se han reportado en el genoma dos genes que codifican para Atg8 (Carlton et al., 2007), los cuales se reportaron por Huang et al., 2014 con una expresión diferencial en las condiciones de restricción de glucosa. En dicho trabajo se demuestra que el gen que codifica para *tvatg8b* (TVAG_239800) se expresa menos que el gen que codifica para *tvatg8a* (TVAG_486080) en condiciones de RG. A nivel de aminoácidos, ambas proteínas conservan los dominios funcionales de Atg8 y muestran una identidad de secuencia menor al 50% entre ellas y con las demás Atg8 reportadas en otros protozoarios. Además, ambas proteínas Atg8 de *Trichomonas spp* aparentemente pertenecen a familias distintas de Atg8, una es tipo LC-3 (TvAtg8a) y la otra tipo GABARAP (TvAtg8b) (Huang et al., 2018). A pesar de ello ambas proteínas podrían participar en la formación del autofagosoma (Matthias y Eichinger 2016).

Pero ¿por qué decidimos trabajar con la proteína TvAtg8b? Originalmente nuestro grupo de trabajo la había nombrado como TvAtg8a, ya que tenía el TVAG con el menor dato numérico. Sin embargo, Huang et al., 2014 los reportó como TvAtg8b y a nivel de transcrito el gen que se expresaba 4 veces más era el que codificaba para la proteína *tvatg8a* (TVAG_486080) en la condición de

RG. Sorprendentemente, cuando realizamos ensayos de RT-PCR (Fig. 18) con nuestro aislado (CNCD 188), el cual es de tipo 2 diferente al aislado trabajado por Huang et al., 2014 (tipo 1); los resultados obtenidos a nivel de expresión de ambos genes mostraron que no es mayor la expresión del gen *tvatg8a*. Ambos genes se expresaron en abundancia en las distintas condiciones de inducción de autofagia, incluida la condición de RG. Razón por la cual era importante estudiar la participación de la proteína TvAtg8b en el proceso autofágico.

En extractos obtenidos a partir del lisado de parásitos, el anticuerpo anti-rTvAtb8b reconoció principalmente dos bandas, una de aproximadamente 18 kDa, la cual podría corresponder al precursor TvAtg8b (forma citosólica) y una banda aproximadamente de 9 kDa, la cual podría corresponder a la forma lipídada, aquella que está conjugada con fosfatidiletanolamina (PE) (TvAtg8b-PE) (Fig. 30). Esta isoforma se asocia preferentemente con estructuras autofágicas (membrana de aislamiento o fagóforo, autofagosomas o autolisosomas). En los extractos obtenidos de parásitos crecidos en las condiciones N y RH, ambas isoformas (TvAtg8b y TvAtg8b-PE) se detectaron con la misma intensidad (Figs. 28 y 29). Sin embargo, en RG, AG, Rapa y AH, la isoforma reconocida con mayor intensidad con el anticuerpo α -TvAtg8b en ensayos de WB fue la banda de la forma lipídada (TvAtg8b-PE) (Figs. 27-29).

En otros tipos de célula, la diferencia de migración entre ambas isoformas de Atg8 no es tan grande en comparación con la TvAtg8b de *T. vaginalis*. La diferencia en la migración entre la forma citosólica (Atg8/LC3) y la forma lipídada (Atg8-PE/LC3-PE) de Atg8/LC3 es cercana a 2 kDa (Fig. 26) (Mizushima y Yoshimori 2007). Estas diferencias en la migración se pueden deber a los diferentes sistemas de electroforesis usados. El sistema de Urea-SDS-PAGE es parte de la metodología más comúnmente usada para el estudio de Atg8/LC3 (Nakatogawa and Ohsumi 2012). Sin embargo, esta metodología no funcionó para los extractos de tricomonas. En su lugar utilizamos el sistema de tricina-SDS-PAGE, el cual nos ayudó a optimizar la

separación de proteínas de bajo peso molecular (<30 kDa) y el bajo porcentaje de acrilamida usado facilita la transferencia de proteínas hidrofóbicas a la membrana de nitrocelulosa (Schägger, 2006). Estas dos son características de las proteínas Atg8: bajo peso molecular y alta hidrofobicidad.

La detección de la forma lipídica de la proteína Atg8 (Atg8-PE) es indicativo de la formación y presencia de autofagosomas en el citosol de las células. Este organelo es el principal marcador del flujo autofágico inducido en condiciones carentes de nutrientes (Klionsky et al., 2007). En el caso de *T. vaginalis*, la autofagia se indujo al cultivar al parásito en diferentes condiciones de estrés como restricción de glucosa, alta glucosa, la presencia de Rapa (inductor canónico utilizado para la inducción de autofagia en diversos tipos de células) y la ausencia o restricción de hierro (RH). Los análisis por inmunofluorescencia indirecta revelaron cambios drásticos en la señal positiva de TvAtg8b las cuales se pueden asociar con las vesículas/vacuolas de diferentes morfologías observadas por ultraestructura mediante MET. Las estructuras TvAtg8b-positivas se detectaron en forma de “punto” en la condición control (N), Rapa, RH y AG (Fig. 33A, paneles c, g, k y s). Sólo en la condición de RG las estructuras TvAtg8b-positivas fueron similares a la morfología de “vesículas/vacuolas” (Fig. 33A, panel o). Incluso en esta condición, el porcentaje de células (32%) con estructuras TvAtg8b-positivas fue mayor en comparación con las otras condiciones de cultivo (Fig. 33B) y el número de estructuras TvAtg8b-positivas por parásito positivo (cerca a 4 vesículas/vacuolas por célula) también fue mayor en RG (Fig. 33C) comparado con las otras condiciones de estrés.

Las estructuras TvAtg8b-positivas presentaron diversos tamaños dependiendo de la condición inductora de autofagia, permitiendo ser clasificadas de la siguiente manera: forma de “punto”, vesículas con un tamaño $\leq 1 \mu\text{m}$ y como vesículas/vacuolas con un tamaño de 1.1 a 2 μm o de 2.1 a 3 μm de diámetro. En el caso de las condiciones N, Rapa, RH y AG, las estructuras TvAtg8b-positivas más abundantes fueron las de forma de “punto” (75%, 76.2%, 55.8%

y 95.4% respectivamente). En la condición de RG, las vesículas/vacuolas más abundantes fueron las que tenían un tamaño entre 1.1 y 2 μm (64.6%) (Tabla 1).

Se ha reportado el rango del diámetro de los autofagosomas entre 0.3 μm y 0.9 μm , principalmente en levaduras (Wang y Klionsky 2003), mientras que en células de eucariontes superiores puede alcanzar un diámetro de 1.5 μm (Mizushima et al. 2002) y en el caso de protozoarios como *Entamoeba* y *Toxoplasma* (Andrade et al. 2006; Picazarri et al. 2008) presentan autofagosomas con un diámetro por arriba de 5 μm hasta 10 μm . En las condiciones de cultivo analizadas por inmunofluorescencia indirecta; exceptuando la condición de RG; se encontraron predominantemente estructuras TvAtg8b-positivas con un tamaño $\leq 1 \mu\text{m}$, sugiriendo que estas estructuras mantienen el tamaño estándar reportado para los autofagosomas, previamente en levaduras durante el cultivo en condiciones de autofagia inducida. En RG, las estructuras TvAtg8b-positivas tuvieron un tamaño entre 1.1 a 2 μm , similar al tamaño reportado en células de eucariontes superiores en donde la autofagia es activada como respuesta a un inductor específico.

En las diferentes condiciones inductoras de autofagia analizadas en este trabajo, el material englobado o secuestrado dentro de las vesículas tipo autofágicas morfológicamente no fue el mismo.

Aunque ya se había reportado en *T. vaginalis* la inducción de autofagia como respuesta de sobrevivencia en RG, lo que quedaba por saber era que material citoplásmico era secuestrado dentro de los autofagosomas y para nuestra sorpresa encontramos la presencia de diversos tipos de vesículas además que cabe mencionar que sólo en la condición de RG se observó al aparato de Golgi así como el ER (Fig. 13A) más prominentes en comparación con las otras condiciones inductoras de autofagia y al ser más grandes de lo habitual se haya inducido una autofagia “selectiva” de estos organelos; a pesar de que básicamente la autofagia es un proceso no selectivo; como se observa en la Fig. 13C, la cual muestra dos vesículas autofágicas con remanentes

membranosos similares a las cisternas que conforman el aparato de Golgi (G). Sugiriendo así la participación de la autofagia para remover organelos disfuncionales o en exceso como se reportó por Yokota et al., 1993. En RG también se detectó la presencia de vesículas autofágicas iniciales o tempranas (AVi) con doble membrana (Fig. 13B) como lo reportó Eskelinen 2008 y vesículas autofágicas degradativas o tardías (AVd) con remanentes de material electrón-denso y membranoso. Este tipo de vesícula es muy similar a la reportada por Benchimol 1999 en el estudio de la autofagia de hidrogenosoma en *T. foetus*. Tanto las AVi y como las AVd, forman parte del proceso autofágico.

Por primera vez, se detectó en *T. vaginalis* la presencia de vesículas tipo cuerpos multilamelares (MLB) en condiciones inductoras de autofagia como en RG (Fig. 13D), AG (Fig. 14D) y RH (Fig. 16E); sin embargo, no sabemos si este tipo de vesículas participan en la autofagia. En otro tipo de células (células alveolares), los MLB forman parte de los lisosomas y funcionan como sitios de almacenamiento de lípidos así como vesículas de secreción (Flacks y Flacks, 1972; Hariri et al., 2000).

En *T. vaginalis*, aparentemente la condición de RG favorece la presencia de un proceso autofágico activo. El cual es bien sabido que inicia con la formación de un organelo de doble membrana, conocido como autofagosoma el cuál secuestra partes citoplasmáticas (Fig. 13F-J) (Baba et al., 1994). La membrana del autofagosoma se deriva de una estructura (ya antes mencionada) denominada fagóforo y recientemente se ha visto asociada a la proteína Atg8 con el control del alargamiento o expansión del fagoforo durante la formación del autofagosoma (Xie et al. 2008) como lo observamos en este trabajo (Fig. 33).

La autofagia provee a las células de nutrientes y elimina organelos dañados mediante la degradación dentro del autolisosoma, organelo formado en la última etapa del proceso autofágico, en la cual se fusiona el autofagosoma con el lisosoma (Figs. 34, 35). El AL degrada el material secuestrado a través de

la actividad degradativa de las hidrolasas. Esta degradación mediada por los lisosomas tiene un papel muy importante en el reciclaje derivado de la autofagia inducida para mantener la homeostasis y la sobrevivencia celular.

El haber estudiado la condición RG nos permitió involucrar a la proteína TvAtg8b con las diferentes etapas del proceso autofágico, ya que fue la condición más favorable para detectar un proceso autofágico activo. En el caso de *T. vaginalis* la condición de oro para inducir autofagia fue RG, incluso más efectiva que Rapa; el inductor más utilizado en los diversos tipos celulares.

Lo que destacamos de las demás condiciones de cultivo, para el caso de AG es la presencia de abundantes depósitos de glucógeno (GS) (Fig. 14A) que, al haber en exceso, se favorece la degradación de este polisacárido en vesículas denominadas glucogenosomas (Fig. 14B), los cuales son autofagosomas de glucógeno similares a los reportados en células de mamífero (hígado, riñón, piel, en leucocitos polimorfonucleares (PMNs) y en células endoteliales) (Rikihis, 1984). Este tipo de vesícula fue predominante en AG ya que fue en la que se observó mayor cantidad de depósitos de glucógeno, los cuales se observaron en menor proporción en Rapa (Fig. 15C). En AH a tiempos cortos de cultivo (Fig. 17D y E) también se observó la presencia de vesículas similares a glucogenosomas.

En la condición de Rapa, se observaron abundantes vacuolas digestivas (dV), lo cual podría estar relacionado con un proceso de autofagia activo. Adicionalmente, las estructuras tipo autofagosomas que se muestran en esta condición, son similares a los autofagosomas típicos reportados en la literatura; es decir están constituidos de una doble membrana (Fig. 15B) y su tamaño promedio fue de 1300-1900 nm, y el cargo fue en la mayoría de veces material citosólico amorfo. Las vesículas tipo autofagosomas en esta condición se observaron cercanos a vacuolas, lo cual podría sugerir una futura fusión entre este tipo de vesículas, dando origen a lo que podría ser un AL. Al parecer el contenido citoplásmico de las vesículas autofágicas presentes en esta condición es de material heterogéneo (Fig. 15C). En otro tipo de estructura se

detectó la presencia de material membranoso dentro de una vesícula naciente que podría corresponder a RE dado a que se alcanzan a apreciar los ribosomas adosados a este organelo (Fig. 15D, zoom), así como vesículas no definidas (Fig. 15E, zoom) las cuales contienen estructuras circulares que aparentemente no están unidas a la membrana; similares a aquellas estructuras encontradas en células provenientes de *Dendrobium* (Van Doorn et al. 2015). Aunque aún no se ha demostrado la posible función de este tipo de vesículas en autofagia.

Otra de las condiciones estudiadas como posible inductora de autofagia fue la restricción de hierro ya que sabíamos el hierro es un elemento esencial para *T. vaginalis*. Por lo que el tipo de vesículas observadas en RH fueron vacuolas autofágicas iniciales o tempranas (AVi) las cuales, a diferencia de las inducidas en Rapa, se detectaron con una sola membrana; autofagosomas atípicos, con material citoplásmico intacto. Se detectó la presencia de vesículas tipo cuerpos multivesiculares, las cuales son vesículas de mayor tamaño con vesículas electrón-densas de menor tamaño en su interior. Anteriormente no se tenía evidencia a nivel de ultraestructura de este tipo de vesículas en *T. vaginalis*. Los MVB son importantes ya que participan en las vías de secreción, a partir de ellos se originan los exosomas; los cuales son vesículas de gran importancia en la virulencia y patogénesis de *T. vaginalis* (Twu et al., 2013). La participación de vesículas tipo MVB se ha sugerido en vías no convencionales de secreción para proteínas multifuncionales en *T. vaginalis*, como es en el caso de la proteína glucolítica TvTIM, la cual se encontró en la superficie del parásito en altas concentraciones de glucosa (Miranda-Ozuna et al., 2016). Adicionalmente, en esta condición se detectaron lisosomas secundarios (Fig. 16D), los cuales son conocidos como cuerpos de lipofuscina en células de mamífero, compuestos del 30-70% de proteínas, 20-50% de lípidos y del 4-7% de carbohidratos y metales, principalmente hierro (Merlo et al., 2015). Esta es la primera vez que este tipo de cuerpos ha sido encontrado en *Trichomonas*; sin embargo, su función en este parásito así como su asociación con la autofagia aún se desconocen. Aunque en otro tipo de

células, estas estructuras participan en el almacenamiento de lípidos y están relacionadas con el envejecimiento. Este tipo de lisosomas pueden fusionarse con la membrana plasmática para liberar su contenido al espacio extracelular (Katz y Robison Jr, 2002; Lüllmann-Rauch y Watermann, 1987). En *T. vaginalis*, los lisosomas secundarios podrían tener la misma función, participando en las vías no convencionales de secreción para ciertas moléculas. Sin embargo, se requiere de futuros estudios para confirmarlo.

En la condición de alto hierro (AH), el material que con mayor frecuencia se observó dentro de las vesículas autofágicas degradativas o tardías (Avd) fue semejante a hidrogenosoma (H) (Fig. 17-C). Tal vez en esta condición ocurra un proceso autofágico selectivo de hidrogenosoma, ya que se observan estos organelos de diversos tamaños, con diferentes formas y con las vesículas periféricas de gran tamaño. El tamaño reportado previamente para los hidrogenosomas es de aproximadamente 300 nm (Benchimol 2009).

La autofagia de hidrogenosoma detectada en *T. vaginalis* fue similar a lo reportado en *Tritrichomonas foetus* en condiciones de privación de suero así como el tratamiento con ciertos fármacos (Benchimol, 1999). Los hidrogenosomas presentaban una apariencia anormal, así como un tamaño mayor de lo habitual (hidrogenosomas “gigantes”, los cuales podrían medir 2 μm) dentro de los autofagosomas (Benchimol, 1999). En *T. vaginalis*, los hidrogenosomas detectados dentro de autofagosomas mostraban tamaños anormales entre los 800 y 1200 nm. Esto sugiere que la autofagia es parte del proceso natural de cualquier célula para remover organelos “viejos”, en exceso o anormales, como suele ocurrir con las mitocondrias o peroxisomas en células de mamífero (Anding y Baehrecke, 2017).

El que ocurriera la autofagia selectiva de hidrogenosoma, exclusivamente en AH nos hace relacionar tal fenómeno con la siguiente pregunta ¿es necesaria la autofagia de hidrogenosoma para que enzimas hidrogenosomales lleguen a la superficie de los parásitos? El resultado obtenido en la Fig. 38 sugiere que efectivamente se requiere de la autofagia de hidrogenosoma para que las

proteínas multifuncionales provenientes de hidrogenosoma como la proteína PFO-A/AP120 se relocalicen a la superficie de los parásitos.

Por lo que en este caso, la autofagia inducida por AH no tiene como fin la obtención de nutrientes a partir de la degradación del material secuestrado por el autofagosomas, sino más bien participa como una vía de secreción no convencional, en la cual puede existir una degradación parcial del material secuestrado por el autofagosoma (Fig. 17). Como se reportó para la citosina proinflamatoria IL-1 β que utiliza la autofagia como vía de secreción (Dupont et al., 2011; Ponpuak et al., 2015).

Curiosamente en la Fig. 38, se observó la localización de TvAtg8b en membrana plasmática de los parásitos al t0 min, el cual equivale a condiciones normales 24 h. Esta localización podría sugerir que el origen de las membranas de aislamiento o fagóforo proviene de la membrana plasmática del parásito.

9. Conclusiones

- 1) De las condiciones inductoras de autofagia (glucosa, rapamicina y/o hierro) sólo cuando se incrementaron las concentraciones de hierro (desde 20 μM hasta 250 μM) se indujo una autofagia “selectiva” de organelo, siendo principalmente de hidrogenosoma.
- 2) La detección de TvAtg8b en su forma lipídada y su localización en vesículas tipo autofagosomas son indicadores de eventos de autofagia.
- 3) Las vesículas TvAtg8b-positivas fueron de diversos tamaños desde $\leq 1\mu\text{m}$ hasta $\geq 3\mu\text{m}$, lo que podría estar relacionado con el estímulo inductor de autofagia.
- 4) La condición de RG es la condición más favorable para inducir autofagia en *T. vaginalis*, desde tiempos cortos (30 min) se observó la inducción de este proceso para mantener la homeostasis y sobrevivencia celular.
- 5) La localización de PFO en la membrana ocurre únicamente en altas concentraciones de hierro, condición donde se observó anteriormente la autofagia “selectiva” de hidrogenosoma.
- 6) La proteína AP120/PFO A llega a la superficie del parásito a través de un proceso de autofagia de hidrogenosoma (autofagia “organelo-específica”) inducida únicamente por altas concentraciones de hierro. La cuál se bloquea con wortmanina.

10. Perspectivas

- Confirmar que los pesos moleculares reconocidos por el anticuerpo anti-TvAtg8 corresponden a la forma soluble (18 kDa) y la forma lipídada (9 kDa).
- Demostrar que los reconocimientos de mayor peso molecular con el anticuerpo anti-rTvAtg8b son posibles complejos con otras Atgs o multímeros de la proteína.
- Demostrar si la autofagia del hidrogenosoma en alto hierro es una vía exclusiva para AP120/PFO-A o cualquier enzima hidrogenosomal lo utiliza para llegar a la superficie del parásito.
- Analizar si la autofagia es la vía no convencional para que proteínas no convencionales multifuncionales lleguen a la superficie celular o si se asocia con otros tipos de vías de tráfico vesicular.
- Utilizar otros inhibidores de autofagia para demostrar su participación como vía no convencional de tráfico vesicular, ¿es un proceso degradativo o de secreción?
- Después que llega la proteína PFO-A/AP120 a la membrana ¿se secreta?
- ¿Qué hace la TvAtg8b en la superficie de *T. vaginalis* antes de la inducción de autofagia, en condiciones normales de cultivo y en alta glucosa

11. Referencias

- Alderete, J. F., O'Brien, J. L., Arroyo, R., Engbring, J. A., Musatovova, O., López, O., Lauriano, C., Nguyen, J. 1995. Cloning and molecular characterization of two genes encoding adhesion proteins involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Mol. Microbiol.* 17(1):69-83.
- Almeida, J. C., Benchimol, M., de Souza, W. & Okorokov, L. A. 2003. Ca(2+) sequestering in the early-branching amitochondriate protozoan *Tritrichomonas foetus*: an important role of the Golgi complex and its Ca(2+)-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1615(1-2):60-68.
- Alvarez-Sánchez, M. E., Carvajal-Gámez, B. I., Solano-González, E., Martínez-Benítez, M., García, A. F., Alderete, J. F. & Arroyo, R. 2008. Polyamine depletion down-regulates expression of the *Trichomonas vaginalis* cytotoxic CP65, a 65-kDa cysteine proteinase involved in cellular damage. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40:2442-2451.
- Alvarez, V. E., Kosec, G., Sant'Anna, C., Turk, V., Cazzulo, J. J. & Turk, B. 2008. Blocking autophagy to prevent parasite differentiation. *Autophagy* 4(3):361-363.
- Anding, A. L. & Baehrecke, E. H. 2017. Cleaning house: Selective autophagy of organelles. *Dev. Cell.* 41(10):10-22.
- Andrade, R. M., Wessendarp, M., Gubbels, M. J., Striepen, B. & Subauste, C. S. 2006. CD40 induces macrophage anti-*Toxoplasma gondii* activity by triggering autophagy-dependent fusion of pathogen-containing vacuoles and lysosomes. *J. Clin. Invest.* 116(9):2366-2377.
- Arroyo, R., Engbring, J. & Alderete, J. F. 1992. Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*. *Mol. Microbiol.* 6(7):853-862.
- Arroyo, R., González-Robles, A., Martínez-Palomo, A., Alderete, J. F. 1993. Signalling of *Trichomonas vaginalis* for amoeboid transformation and adhesin synthesis follows cytoadherence. *Mol. Microbiol.* 7(2):299-309.

- Baba, M., Takeshige, K., Baba, N. & Ohsumi, Y. 1994. Ultrastructural analysis of the autophagic process in yeast: detection of autophagosomes and their characterization. *J. Cell Biol.* 124:903-913.
- Bain, J., Plater, L., Elliot, M., Shpiro, N., Hastie, C. J., McLauchlan, H., Klevvernic, I., Arthur, J. S., Alessi, D. R. & Cohen, P. 2007. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem. J.* 408:297-315.
- Ballou, L. M. & Lin, R. Z. 2008. Rapamycin and mTOR kinase inhibitors. *J. Chem. Biol.* 1:27-36.
- Benchimol, M. 1999. Hydrogenosome autophagy: an ultrastructural and cytochemical study. *Biol. Cell*, 91:165-174.
- Benchimol, M. (2004). Trichomonads under Microscopy. *Microsc. Microanal.* 10:528-550.
- Benchimol, M. 2009. Hydrogenosomes under microscopy. *Tissue Cell.* 41:151-168.
- Benchimol, M., Aquino Almeida, J. C. & De Souza, W. 1996. Further studies on the organization of the hydrogenosome in *Tritrichomonas foetus*. *Tissue Cell* 28(3):287-299.
- Benchimol, M. & De Souza, W. 1983. Fine structure and cytochemistry of the hydrogenosome of *Tritrichomas foetus*. *J. Protozool.* 30(2):422-425.
- Benchimol, M. & Engelke, F. 2003. Hydrogenosome behavior during the cell cycle in *Tritrichomonas foetus*. *Biol. Cell.* 95:283-293.
- Benchimol, M., Ribeiro, K. C., Mariante, R. M. & Alderete, J. F. 2001. Structure and division of the Golgi complex in *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *Eur. J. Cell. Biol.* 80:593-607.
- Brennand, A., Gualdrón-López, M., Coppens, I., Rigden, D. J., Ginger, M. L. & Michels, P. A.M. 2011. Autophagy in parasitic protists: Unique features and drug targets. *Mol. Biochem. Parasitol.* 177:83-99.
- Bui, E. T. N., Bradley, P. J. & Johnson, P. J. 1996. A common evolutionary origin for mitochondria and hydrogenosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:9651-9656.

- Carlton, J. M., Hirt, R. P.; Silva, J. C., Delcher, A. L., Schatz, M., Zhao, Q., Wortman, J. R., Bidwell, S. L., Alsmark, U. C. M., Besteiro, S., Sicheritz-Ponten, T., Noel, C. J., Dacks, J. B., Foster, P. G., Simillion, C., Van de Peer, Y., Miranda-Saavedra, D., Barton, G. J., Westrop, G. D., Müller, S., Dessi, D., Fiori, P. L., Ren, Q., Paulsen, I., Zhang, H., Bastida-Corcuera, F. D., Simoes-Barbosa, A., Brown, M. T., Hayes, R. D., Mukherjee, M., Okumura, C. Y., Schneider, R., Smith, A. J., Vanacova, S., Villalvazo, M., Haas, B. J., Perteua, M., Feldblyum, T. V., Utterback, T. R., Shu, C.L., Osoegawa, K., de Jong, P. J., Hrdy, I., Horvathova, L., Zubacova, Z., Dolezal, P., Malik, S. B., Logsdon Jr., J. M., Henze, K., Gupta, A., Wang, C. C., Dunne, R. L., Upcroft, J. A., Upcroft, P., White, O., Salzberg, S. L., Tang, P., Chiu, C. H., Lee, Y. S., Embley, T. M., Coombs, G. H., Mottram, J. C., Tachezy, J., Fraser-Liggett, C. M., & Johnson, P. J. 2007. Draft Genome Sequence of the Sexually Transmitted Pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science*, 315(5809):207-212.
- Cheong, H. & Klionsky, D. J. 2008. Biochemical methods to monitor autophagy-related processes in yeast. *Methods. Enzymol.* 451:1-26.
- Clemens, D. L. & Johnson, P. J. 2000. Failure to detect DNA in hydrogenosome of *Trichomonas vaginalis* by nick translation and immunomicroscopy. *Mol. Biochem. Parasitol.* 106(2):307-313.
- De Andrade Rosa, I., Einicker-Lamas, M., Bernardo, R. R., Previatto, L. M., Mohana-Borges, R., Morgado-Díaz, J. A. & Benchimol, M. 2006. Cardiolipin in Hydrogenosomes: Evidence of Symbiotic Origin. *Eukaryotic Cell* 5(4):784-787.
- Dolezal, P., Dancis, A., Lesuisse, E., Sutak, R., Hrdý, I., Embley, T. M. & Tachezy, J. 2007. Frataxin, a conserved mitochondrial protein, in the hydrogenosome of *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryotic Cell* 6(8):1431-1438.

- Dupont, N., Jiang, S., Pilli, M., Ornatowski, W., Bhattacharya, D. & Deretic V. 2011. Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1 β . *The EMBO Journal*, 30:4701-4711.
- Engbring, J. A. & Alderete, J. F. 1998. Characterization of *Trichomonas vaginalis* AP33 adhesin and cell surface interactive domains. *Microbiology* 144:3011-3018.
- Engbring, J. A. & Alderete, J. F. 1998. Three genes encode distinct AP33 proteins involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Mol. Microbiol.* 28(2):305-313.
- Eskelinen, E. L. 2008a. Fine structure of the autophagosome. *Methods Mol. Biol.*, 445:11-28.
- Fair, W. R., Couch, J. & Wehner, N. 1976. Prostatic antibacterial factor. Identity and significance. *Urology.* 7(2):169-177.
- Figueroa-Angulo, E. E., Rendón-Gandarilla, F. J., Puente-Rivera, J., Calla-Choque, J. S., Cárdenas-Guerra, R. E., Ortega-López, J., Quintas-Granados, L. I., Alvarez-Sánchez, M. E. & Arroyo, R. 2012. The effects of environmental factors on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. *Microbes Infect.* 14(15):1411-1427.
- Flaks, B. & Flaks, A. 1972. Electron microscope observations on the formation of the cytoplasmic lamellar inclusion bodies in murine pulmonary tumors induced *in vitro*. *J. Pathol.* 108:211-217.
- García, A. F., Benchimol, M. & Alderete, J. F. 2005. *Trichomonas vaginalis* polyamine metabolism is linked to host cell adherence and cytotoxicity. *Infect. Immun.* 73:2602-2610.
- García-Tamayo, J., Nuñez-Montiel, J. T. & de García, H. P. 1978. An electron microscopic investigation on the pathogenesis of human vaginal trichomoniasis. *Acta Cytol.* 22(6):447-455.
- Germot, A., Philippe, H. & Le Guyader, H. 1996. Presence of a mitochondrial-type 70-kDa heat shock protein in *Trichomonas vaginalis* suggests a very early mitochondrial endosymbiosis in eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:14614-14617.

- Gillooly, D. J., Simonsen, A. & Stenmark, H. 2001. Phosphoinositides and phagocytosis. *J. Cell Biol.* 155(1):15-17.
- Gómez-Conde, E., Mena-López, R., Hernández-Jaúregui, P., González-Camacho, M., Arroyo, R. 2000. *Trichomonas vaginalis*: Chromatin and Mitotic spindle during mitosis. *Exp. Parasitol.* 96:130-138.
- Gómez-Sánchez, R., Pizarro-Estrella, E., Yakhine-Diop, S. M. S., Rodríguez-Arribas, M., Bravo-San Pedro, J. M., Fuentes, J. M. & González-Polo R. A. 2015. Routine Western blot to check autophagic flux: Cautions and recommendations. *Anal Biochem*, 477:13-20.
- Gozuacik, D. & Kimchi, A. 2004. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene.* 23:2891-2906.
- Hariri, M., Millane, G., Guimond, M. P., Guay, G., Dennis, J. W. & Nabi, I. R. 2000. Biogenesis of multilamellar bodies via autophagy. *Mol. Biol. Cell.* 11:255-268.
- Hrdý, I. & Müller, M. 1995. Primary structure and eubacterial relationships of the pyruvate:ferredoxin oxidoreductase of the amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *J. Mol. Evol.* 41:388-396.
- Huang, K. Y., Chen, Y. Y. M., Fang, Y. K., Cheng, W. H., Cheng, C. C., Chen, Y. C., Wu, T. E., Ku, F. M., Chen, S. C., Lin, R. & Tang, P. 2014. Adaptative responses to glucose restriction enhance cell survival, antioxidant capability, and autophagy of the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1840(1): 53-64.
- Huang et al., 2018....Huang, W. P., Scott, S. V., Kim, J. & Klionsky, D. J. 2000. The itinerary of a vesicle component, Aut7p/Cvt5p, terminates in the yeast vacuole via the autophagy/cvt pathways. *J. Biol. Chem.* 275(8):5845-5851.
- Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., Noda,

- T. & Ohsumi, Y. 2000. An ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*. 408:488-491.
- Jayabalasingham, B., Bano, N. & Coppens, I. 2010. Metamorphosis of the malaria parasite in the liver is associated with organelle clearance. *Cell Res*. 20:1043-1059.
 - Jiang, S. et al. 2013. Secretory versus degradative autophagy: unconventional secretion of inflammatory mediators. *J. Innate. Immun.* 5:471-479.
 - Johansen, T. & Lamark, T. 2011. Selective autophagy mediated by autophagic adaptor proteins. *Autophagy*. 7:279-296.
 - Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y. & Yoshimori, T. 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *Eur. Mol. Biol. Org. J.* 19(21):5720-5728.
 - Kabeya, Y., Mizushima, N., Yamamoto, A., Oshitani-Okamoto, S., Ohsumi, Y. & Yoshimori, T. 2004. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J. Cell. Sci.* 117:2805-2812.
 - Kamada, Y., Funakoshi, T., Shintani, T., Nagano, K., Ohsumi, M. & Ohsumi, Y. 2000. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J. Cell Biol.* 150(6):1507-1513.
 - Katz, M. L. & Robison Jr, W. G. 2002. What is lipofuscin? Defining characteristics and differentiation from other autofluorescent lysosomal storage bodies. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 34:169-184.
 - Kiel, J. A. K. W. 2010. Autophagy in unicellular eukaryotes. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 365:819-830.
 - Kim, J., Huang, W. P., Strømhaug, P. E. & Klionsky, D. J. 2002. Convergence of multiple autophagy and cytoplasm to vacuole targeting components to a perivacuolar membrane compartment prior to de novo vesicle formation. *J. Biol. Chem.* 277(1):763-773.

- Kirisako, T., Baba, M., Ishihara, N., Miyazawa, K., Ohsumi, M., Yoshimori, T., Noda, T. & Ohsumi, Y. 1999. Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *J. Cell Biol.* 147(2):435-446.
- Kirisako, T., Ichimura, Y., Okada, H., Kabeya, Y., Mizushima, N., Yoshimori, T., Ohsumi, M., Takao, T., Noda, T. & Ohsumi, Y. 2000. The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J. Cell Biol.* 151(2):263-275.
- Klionsky, D. J., Abeliovich, H., Agostinis, P., Agrawal, D. K., Aliev, G., Askew, D. S., Baba, M., Baehrecke, E. H., Bahr, B. A., Ballabio, A. et al. 2008. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy.* 4:151-175.
- Klionsky, D. J., Cuervo, A. M. & Seglen, P. O. 2007. Methods for Monitoring Autophagy from Yeast to Human. *Autophagy*, 3(3):181-206.
- Kostara, I., Carageorgiou, H., Varonos, D. & Tzannetis S. 1998. Growth and survival of *Trichomonas vaginalis*. *J. Med. Microbiol.* 47:555-560.
- Krieger, J. N. & Rein, M. F. 1982. Zinc Sensitivity of *Trichomonas vaginalis*: In Vitro Studies and Clinical Implications. *J. Infect. Dis.* 146(3):341-345.
- Kuma, A., Mizushima, N., Ishihara, N. & Ohsumi, Y. 2002. Formation of the ~350-kDa Apg12-Apg5-Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast. *J. Biol. Chem.* 277(21):18619-18625.
- Lahti, C. J., D'Oliveira, C. E. & Johnson, P. J. 1992. β -Succinyl-Coenzyme A Synthetase from *Trichomonas vaginalis* is a soluble hydrogenosomal protein with an amino-terminal sequence that resembles mitochondrial presequences. *J. Bacteriol.* 174(21):6822-6830.

- Lehker, M. W. & Alderete, J. F. 1990. Properties of *Trichomonas vaginalis* grown under chemostat controlled growth conditions. *Genitourin. Med.* 66:193-199.
- Lehker, M. W. & Alderete, J. F. 1999. Resolution of six chromosomes of *Trichomonas vaginalis* and conservation of size and number among isolates. *J. Parasitol.* 85(5):976-979.
- Lehker, M. W. & Alderete, J. F. 2000. Biology of trichomoniasis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 13(1):37-45.
- Lehker, M. W., Arroyo, R. & Alderete, J. F. 1991. The Regulation by Iron of the Synthesis of Adhesins and Cytoadherence Levels in the Protozoan *Trichomonas vaginalis*. *J. Exp. Med.* 174:311-318.
- Lindmark, D. G. & Müller, M. 1973. Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate *Tritrichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. *J. Biol. Chem.* 248(22):7724-7728.
- Lüllmann-Rauch, R., & Watermann, D. 1987. Fusion of storage lysosomes in experimental lipidosis and glycogenosis. *Exp. Mol. Pathol.* 46:136-143.
- Manjithaya, R. & Subramani, S. 2011. Autophagy: A broad role in unconventional protein secretion? *Trends. Cell. Biol.* 21(2):67-73.
- Mann, J. R., McDermott, S., Barnes, T. L., Hardin, J., Bao, H., Zhou L. 2009. Trichomoniasis in pregnancy and mental retardation in children. *Ann. Epidemiol.* 19:891-899.
- Matthias, J., Meßling, S., & Eichinger, L. 2016. The two *Dictyostelium* autophagy eight proteins, Atg8a and Atg8b, associate with the autophagosome in succession. *Eur. J. Cell Biol.*, 95:15-25.
- McGrory, T. & Garber, G. E. 1992. Mouse Intravaginal Infection with *Trichomonas vaginalis* and Role of *Lactobacillus acidophilus* in Sustaining Infection. *Infect. Immun.* 60(6):2375-2379.
- McGrory, T., Meysick, K., Lemchuk-Favel, L. T. & Garber, G. E. 1994. The interaction of *Lactobacillus acidophilus* and *Trichomonas vaginalis* in vitro. *J. Parasitol.* 80(1):50-54.

- Merlo, S., Nakayama, A. B. S., Brusco, J., Rossi, M. A., Carlotti Jr., C. G. & Moreira, J. E. 2015. Lipofuscin granules in the epileptic human Temporal Neocortex with age. *Ultrastruct. Pathol.* 39(6):378-384.
- Meza-Cervantez, P., González-Robles, A., Cárdenas-Guerra, R. E., Ortega-López, J., Saavedra, E., Pineda, E. & Arroyo, R. 2011. Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase (PFO) is a surface-associated cell-binding protein in *Trichomonas vaginalis* and is involved in trichomonal adherence to host cells. *Microbiology.* 157:3469-3482.
- Midlej, V. & Benchimol, M. 2010. *Trichomonas vaginalis* kills and eats – evidence for phagocytic activity as a cytopathic effect. *Parasitology.* 137:65-76.
- Miranda-Ozuna, J. F. T., Hernández-García, M. S., Brieba, L.G., Benitez-Cardoza, C. G., Ortega-López, J., González-Robles, A. & Arroyo, R. 2016. The glycolytic enzyme triosephosphate isomerase of *Trichomonas vaginalis* is a surface-associated protein induced by glucose that functions as a laminin- and fibronectin-binding protein. *Infect. Immun.* 84(10):2878-2894.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhiya, T., Ohsumi, Y. & Yoshimori, T. 2001. Dissection of Autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J. Cell Biol.* 152(4):657-667.
- Mizushima, N., Ohsumi, Y. & Yoshimori, T. 2002. Autophagosome Formation in Mammalian Cells. *Cell Struct. Funct.* 27:421-429.
- Mizushima, N. & Yoshimori, T. 2007. How to Interpret LC3 Immunoblotting. *Autophagy*, 3(6):542-545.
- Moreno-Brito, V., Yáñez-Gómez, C., Meza-Cervantez, P., Ávila-González, L., Rodríguez, M. A., Ortega-López, J., González-Robles, A. & Arroyo, R. 2005. A *Trichomonas vaginalis* 120 kDa Protein with identity to hydrogenosome pyruvate:ferredoxin oxidoreductase is a surface adhesion induced by iron. *Cell. Microbiol.* 7(2):245-258.

- Müller, M. 1993. The hydrogenosome. *J. Gen. Microbiol.* 139:2879-2889.
- Nakatogawa, H. & Ohsumi, Y. 2012. SDS-PAGE Techniques to Study Ubiquitin-Like Conjugation Systems in Yeast Autophagy. Ubiquitin Family Modifiers and the Proteasome: Reviews and Protocols. *Methods Mol. Biol.*, 832:519-529.
- Ohsumi, Y. 2001. Molecular dissection of autophagy: Two ubiquitin-like systems. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2:211-216.
- Petrin, D., Delgaty, K., Bhatt, R. & Garber, G. 1998. Clinical and Microbiological Aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiol. Reviews.* 11(2):300-317.
- Picazarri, K., Nakada-Tsukui, K. & Nozaki, T. 2008. Autophagy during proliferation and encystation in the protozoan parasite *Entamoeba invadens*. *Infect. Immun.* 76(1):278-288.
- Ponpuak, M., Mandell, M., Kimura, T., Chauhan, S., Cleyrat, C. & Deretic, V. 2015. Secretory autophagy. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 35:106-116.
- Queiroz, R. C. B., Santos, L. M. S., Benchimol, M. & De Souza, W. 1991. Cytochemical localization of enzyme markers in *Tritrichomonas foetus*. *Parasitol. Res.* 77:561-566.
- Rabouille, C. et al. 2012. Diversity in unconventional protein secretion. *J. Cell Sci.* 125:5251-5255.
- Raikhel, A. S. 1986. Lysosomes in the cessation of vitellogenin secretion by the mosquito fat body; selective degradation of Golgi complexes and secretory granules. *Tissue & Cell.* 18(1):125-142.
- Rikihisa, Y. 1984. Glycogen Autophagosomes in polymorphonuclear leukocytes induced by *Rickettsiae*. *Anat. Rec.* 208:319-327.
- Sagiv, Y., Legesse-Miller, A., Porat, A. & Elazar, Z. 2000. GATE-16, a membrane transport modulator, interacts with NSF and the Golgi v-SNARE GOS-28. *EMBO J.* 19:1494-1504.
- Schägger, H. 2006. Tricine-SDS-PAGE. *Nat. Protoc.*, 1(1):16-22.

- Schwebke, J. R. & Burgess, D. 2004. Trichomoniasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 17(4):794-803.
- Schweers, R. L. et al. 2007. NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104:19500-19505.
- Shpilka, T., Weidberg, H., Pietrokovski, S. & Elazar, Z. 2011. Atg8: an autophagy-related ubiquitin-like protein family. *Genome Biol.* 12:226.
- Slobodkin, M. R. & Elazar, Z. 2013. The Atg8 family: multifunctional ubiquitin-like key regulators of autophagy. *Essays Biochem.* 55:51-64.
- Smith, M. & Wilkinson. 2017. ER homeostasis and autophagy. *Essays Biochem.* 61:625-635.
- Soper, D. 2004. Trichomoniasis: Under control or undercontrolled? *Am. J. Obstet. and Gynecol.* 190:281-290.
- Stack, J. H., DeWald, D. B., Takegawa, K. & Emr, S. D. 1995. Vesicle-mediated protein transport: Regulatory interactions between the Vps15 protein kinase and the Vps34 PtdIns 3-Kinase essential for protein sorting to the vacuole in yeast. *J. Cell Biol.* 129(2):321-334.
- Street, D. A., Wells, C., Taylor-Robinson, D. & Packers, J. 1984. Interaction between *Trichomonas vaginalis* and other pathogenic microorganisms of the human genital tract. *Br. J. Vener. Dis.* 60:31-38.
- Sugawara, K., Suzuki, N. N., Fujioka, Y., Mizushima, N., Ohsumi, Y. & Inagaki, F. 2004. The crystal structure of microtubule-associated protein light chain 3, a mammalian homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Atg8. *Genes Cells.* 9:611-618.
- ter Kuile, B. H. & Bonilla, Y. 1999. Influence of growth conditions on RNA levels in relation to activity of core metabolic enzymes in the parasitic protists *Trypanosoma brucei* and *Trichomonas vaginalis*. *Microbiology.* 145:755-765.
- Tolkovsky, A. M. 2009. Mitophagy. *Biochim. Biophys. Acta.* 1793:1508-1515.

- Twu, O., de Miguel, N., Lusting, G., Stevens, G. C., Vashisht, A. A., Wohlschlegel, J. A. & Johnson, P. J. 2013. *Trichomonas vaginalis* exosomes deliver cargo to host cells and mediate host: parasite interactions. *PLOS Pathogens*. 9(7):1-14.
- Uchiyama, Y., Shibata, M., Koike, M., Yoshimura, K. & Sasaki, M. 2008. Autophagy-physiology and pathophysiology. *Histochem. Cell Biol.* 129(4):407-420.
- Van Doorn, W. G., Kirasak, K. & Ketsa, S. 2015. Macroautophagy and microautophagy in relation to vacuole formation in mesophyll cells of *Dendrobium tepals*. *J. Plant Physiol.* 177:67-73.
- Wang, C. W. & Klionsky, D. J. 2003. The Molecular Mechanism of Autophagy. *Mol. Med.* 9(3):65-76.
- Weidberg, H., Shvets, E., Shpilka, T., Shimron, F., Shinder, V. & Elazar, Z. 2010. LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *EMBO J.* 29:1792-1802.
- Xie, Z., Nair, U. & Klionsky, D. 2008. Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation. *Mol. Biol. Cell.* 19:3290-3298.
- Yang, Z. & Klionsky, D. J. 2009. An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 335:1-32.
- Yarlett, N., Martinez, M. P., Goldberg, B., Kramer, D. L. & Porter, C. W. 2000. Dependence of *Trichomonas vaginalis* upon polyamine backconversion. *Microbiology.* 146:2715-2722.
- Yokota, S., Himeno, M., Roth, J., Brada, D. & Kato, K. 1993. Formation of autophagosomes during degradation of excess peroxisomes induced by di-(2-ethylhexyl)phthalate treatment. II. Immunocytochemical analysis of early and late autophagosomes, *Eur. J. Cell. Biol.* 62:372-383.
- Yoshimori, T. 2004. Autophagy: a regulated bulk degradation process inside cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313:453-458.

12. Apéndice

Acrilamida al 30%/Bisacrilamida al 0.8%

- Acrilamida 30 g
- *N,N*metilbisacrilamida 0.80 g

Disolver en 40 ml de agua destilada. Una vez disuelto aforar hasta 100 ml. Filtrar a través de papel filtro "Whatman" no.1. Almacenar a 4 °C hasta 1 mes, previamente protegido de la luz.

Nota: Descartar después de 30 días, ya que gradualmente la acrilamida se hidroliza a ácido acrílico y amonio.

Amortiguador ánodo (geles de tricina)

- Trizma base (0.2 M C_f) 48.44 g en 1 litro de agua destilada

Se ajusta el pH 8.9 con HCl concentrado, se lleva a 2 l después del ajuste

Se almacena a 4 °C máx. 1 mes

Amortiguador cátodo (geles de tricina)

- Trizma base (0.1 M C_f) 12.11 g
- Tricina (0.1 M C_f) 17.92 g
- SDS 1 g

Diluir a 1 l con agua destilada, no se ajusta pH, se almacena a 4 °C hasta 1 mes

Amortiguador de carga 6x (BC6x)

- 100 µl mezcla azul de bromofenol y Xilene-xianol (está almacenado a 4 °C)
- 400 µl de formadida

Se almacena a 4 °C

Amortiguador de elución pH 7.4 (cromatografía afinidad a níquel)

- | | | |
|----------------------|--------|----------|
| • Trizma base | 25 mM | 0.303 g |
| • NaCl | 500 mM | 2.920 g |
| • Imidazol | 500 mM | 3.404 g |
| • Urea | 4 M | 24.024 g |
| • Agua destilada cbp | | 100 ml |

Se ajusta el pH 7.4, se filtra por 0.2 µm y se protege de la luz.

Amortiguador de muestra 1x (BM 1x)

- | | |
|--|--------|
| • SDS/amortiguador 2x | 500 µl |
| • β-mercaptoetanol 10% | 50 µl |
| • Azul de bromofenol
(stock 10 mg/ml) | 50 µl |
| • Agua desionizada | 400 µl |

Amortiguador de muestra 2x (BM 2x)

- | | |
|--|--------|
| • SDS/amortiguador 2x | 400 µl |
| • β-mercaptoetanol 10% | 50 µl |
| • Azul de bromofenol
(stock 10 mg/ml) | 50 µl |

Amortiguador de muestra 2x para geles de tricina

- 4 ml del stock de Tris-HCl/SDS pH 6.8
- 3 ml de glicerol = 30% glicerol
- 0.15 g de SDS = 1.5% SDS
- 1.6 ml DE agua bidestilada

Se pesa 0.004 g (4 mg) de Azul de Coomassie R250, al cual se le adiciona 1 ml de agua bidestilada, este ml se añade a la mezcla anterior. Se hacen alícuotas de 480 µl y a cada una se le añade 20 µl de β-mercaptoetanol.

Amortiguador de lavado 1 pH 7.4 (cromatografía afinidad a níquel)

- | | | |
|----------------------|--------|----------|
| • Trizma base | 25 mM | 0.303 g |
| • NaCl | 500 mM | 2.920 g |
| • Imidazol | 20 mM | 0.136 g |
| • Urea | 4 M | 24.024 g |
| • Agua destilada cbp | | 100 ml |

Se ajusta el pH 7.4, se filtra por 0.2 µm y se protege de la luz.

Amortiguador de lavado 2 pH 7.4 (cromatografía afinidad a níquel)

- | | | |
|----------------------|--------|----------|
| • Trizma base | 25 mM | 0.303 g |
| • NaCl | 500 mM | 2.920 g |
| • Imidazol | 50 mM | 0.340 g |
| • Urea | 4 M | 24.024 g |
| • Agua destilada cbp | | 100 ml |

Se ajusta el pH 7.4, se filtra por 0.2 µm y se protege de la luz.

Amortiguador de transferencia para membrana de nitrocelulosa

- Tris-base 25 mM 6.06 g
- Glicina 192 mM 28.83 g
- Metanol absoluto 400 ml
- Agua destilada cbp 2000 ml

Amortiguador de Unión pH 7.4 (cromatografía afinidad a níquel)

- Trizma base 25 mM 0.303 g
- NaCl 500 mM 2.920 g
- Imidazol 10 mM 0.068 g
- Urea 4 M 24.024 g
- Agua destilada cbp 100 ml

Se ajusta el pH 7.4, se filtra por 0.2 µm y se protege de la luz.

Amortiguador salino de fosfatos (PBS) pH 7.0

- NaCl (Merck) 137 mM 8.00 g
- KCl (Merck) 2.7 mM 0.20 g
- Na₂HPO₄ (Merck) 10 mM 1.42 g
- KH₂PO₄ (Merck) 2 mM 0.27 g
- Agua destilada cbp 1000 ml

Amortiguador TBE 10x

- Triz base (Sigma) 108 g
- Ácido Bórico (Merck) 55 g
- EDTA (Sigma) 9.3 g
- Agua destilada cbp 1 000 ml

Amortiguador TBS 1x pH 7.5 (Revelar por color)

- Tris 20 mM 2.42 g

- NaCl 500 mM 29.22 g
- Agua destilada cbp 1000 ml

Disolver en menor volumen de agua para ajustar el pH 7.5 y después se lleva al volumen final deseado. Se almacena a TA.

Amortiguador Tris-HCl/SDS pH 6.8 (para BM2x, geles de tricina)

- Trizma base 0.5 M pH 6.8
- 0.4% SDS

Amortiguador Tris-HCl/SDS pH 8.45 (geles de tricina)

- Trizma base 3 M 73 g

Se disuelven en 100 ml de agua bidestilada, se ajusta el pH 8.45 con 1 N HCl, se afora hasta 200 ml se filtra por 0.45 μ m

- Se añade SDS 0.6 g

Se almacena a 4 °C máx. 1 mes

Amortiguador 5x (SDS-PAGE electroforesis) (Amortiguador de corrida)

- Trizma base 30.2 g
- Glicina 144 g
- SDS 10 g
- Agua destilada cbp 2000 ml

Ampicilina (100 μ g/ml)

- Se filtra por 0.22 μ m, para esterilizarla y se protege de la luz.

Azul de Coomassie R250 al 2.5%

- 50% metanol
- 0.5 g de Azul de Coomassie R250

Se agregó el metanol y el azul de Coomassie a un recipiente tapado y se agita por 18 h a TA, después se agrega:

- 10% ácido acético glacial
- 40% agua destilada

Bromuro de etidio (0.5 mg/ml)

- Bromuro de etidio (Sigma) 0.5 mg
- Agua destilada 1 ml

Nota: guardar cubierto de la luz y tener cuidado a su manejo porque es cancerígeno. Al término de su uso es necesario depositarlo en contenedores especiales.

Cloruro de amonio (NH₄Cl) 20 mM

- NH₄Cl (A-4514, Sigma-Aldrich) 0.10 g
- PBS pH 7.0 cbp 100 ml

Se prepara en matraz volumétrico de 100 ml, se filtra por membrana de 0.2 µm.

cComplete tabletas de inhibidores de proteasas solución stock 25x

Se disuelve una tableta en 2 ml de agua inyectable (PISA). Se hicieron alícuotas de 200 μ l, se protegieron de la luz y se almacenan a -20 °C al menos por 12 semanas.

2,2 Dipiridilo (C₁₀H₈N₂) 15 mM

- 2,2 Dipiridilo (Cat. No. D-7505, Sigma Aldrich) 0.02 g
- Agua destilada 10 ml

Se mezcla bien, se afora en matraz volumétrico de 10 ml y se esteriliza por filtración (0.2 μ m). Se almacena a 4 °C cubierto de la luz (no debe utilizarse después de dos semanas).

Etanol 70%

Para 50 ml

- Etanol 100% 35 ml
- Agua destilada 15 ml

Glicina 0.5 M

- Glicina (G7126-1KG, Sigma-Aldrich) 9.38 g
- PBS pH 7.0 cbp 250 ml

Se aforó en matraz volumétrico de 250 ml y se filtró por membrana de 0.2 μ m.

Marcadores 1 kbp

Tienen una conc. 1 μ g/ μ l

- 5 μ l del stock de marcadores más 55 μ l BC6x

Medio Luria Bertani (LB)

- NaCl 10 g
- Triptona 10 g
- Extracto de levadura 10 g

Nota: Se ajusta el pH a 7.0 y se afora con agua destilada a 1 litro. Por último se esteriliza por autoclave.

Medio LB Agar (placas)

El LB se prepara como se describió en la parte superior, se agregan 20 g de agar bacteriológico, después de haberlo esterilizado por autoclave y a una temperatura de 45 °C se adicionó la ampicilina (100 µg/ml) y se transfirió a cajas Petri en esterilidad.

Medio TYM (Triptona-extracto de levadura-maltosa)

- Bacto triptona 20 g
- Extracto de levadura 10 g
- Maltosa 5 g
- Ácido ascórbico 0.2 g
- Cisteína 1 g
- K₂HPO₄ 0.8 g
- KH₂PO₄ 0.8 g
- Agua destilada cbp 1000 ml

Se ajusta el pH 6.2, se filtra por Watman No. 1, se esteriliza por autoclave.

Medio TY (Triptona-extracto de levadura)

- Bacto triptona 16 g

- Extracto de levadura 8 g
- Ácido ascórbico 0.16 g
- Cisteína 0.8 g
- K_2HPO_4 0.64 g
- KH_2PO_4 0.64 g
- Agua destilada cbp 800 ml

Se ajusta el pH 6.2, se filtra por Watman No. 1, se esteriliza por autoclave.

Paraformaldehído 2%

- Paraformaldehído 2 g
- PBS pH 7.0 100 ml

Nota: Se disuelve calentando a una temperatura constante 55 °C.

PhosSTOP solución stock 10x

Se disuelve una tableta de PhosSTOP en 1 ml de agua inyectable (PISA), se hicieron alícuotas de 200 μ l, las cuales se protegen de la luz y se almacenan a -20 °C. La solución stock es estable a esta temperatura al menos 6 meses.

Persulfato de amonio (PSA) al 10%

- 10 mg (0.01 g) en 1 ml de agua destilada.

Nota: Almacenar en alícuotas hasta 2 semanas a -20 °C.

SDS/amortiguador 2x

- Trizma-base 1.52 g
- SDS 2.00 g

Disolver en 50 ml de agua destilada y ajustar el pH a 6.8. Posteriormente adicionar:

- Glicerol 20 ml
- Agua destilada cbp 100 ml

Solución Decolorante

- Ácido acético 50 ml
- Metanol 165 ml
- Agua destilada cbp 1000 ml

Solución Glucosa stock 1 M

- Se utilizó D(+)-Glucosa anhidra (MERCK) 1 M 1.80 g
- PBS pH 7.0 cbp 10 ml

Se disuelve con vórtex y se prepara en matraz volumétrico de 10 ml. Se esteriliza por filtración con unidades de 0.2 μ m.

Solución I (extracción de DNA plasmídico)

- Glucosa 50 mM
- Tris-Cl 25 mM, pH 8.0
- EDTA 10 mM, pH 8.0

Nota: Esterilizar en autoclave. Se afora con agua destilada.

Solución II (extracción de DNA plasmídico)

- NaOH 0.2 N
- SDS 1%

Nota: Usar recién preparada y sin esterilizar. Se afora con agua destilada.

Solución III (extracción de DNA plasmídico)

- Acetato de sodio 5 M 60 ml
- Ácido acético glacial 11.5 ml para ajustar pH a 5.2
- Agua bidestilada 28.5 ml
- Volumen total 100 ml

Nota: Esterilizar en autoclave.

Sulfato ferroso amoniacal 25 mM (solución stock)

- Ácido sulfosalicílico (Sigma) 50 mM 0.1271 g
- Agua destilada 10 ml

En esta solución se disuelve el sulfato ferroso

- Sulfato ferroso (Sigma) 25 mM 0.098 g

Se mezcla bien, se afora en matraz volumétrico de 10 ml ambas soluciones, se esteriliza por autoclave y se almacena a 4 °C cubierto de la luz (no debe ser utilizado por más de una semana).

Tris-Cl/SDS pH 6.8 4x

- Trizma-base (Sigma) 5 mM 6.05 g
- SDS (Sigma) 0.13 mM 0.40 g
- Ajustar a pH 6.8
- Agua destilada cbp 100 ml

Se filtra por 0.45 µm, se almacena a 4 °C

Tris-Cl/SDS pH 8.8 4x

- Trizma-base (Sigma) 15 mM 18.16 g

- SDS (Sigma) 0.13 mM 0.40 g
- Ajustar el pH 8.8
- Agua destilada cbp 100 ml

Se filtra por 0.45 μ m, se almacena a 4 °C

X-Gal

- Disolver 100 mg (0.1 g) X-Gal (5-bromo-4 chloro-3 indolyl β -D-galactoside) en 2 ml de *N,N*-Dimethylformamida (filtrar por 0.2 μ m).

Nota: Se protege de la luz y se almacena a -20 °C.