Universidad ORT Uruguay

Facultad de Ingeniería

Evaluación de la localización y funcionalidad de un biosensor diseñado para detectar lipoperóxidos en distintas regiones sub-celulares

Entregado como requisito para la obtención del título de Licenciada en Biotecnología

Agustina Arrieta Rondán - 249876

Tutoras:
Natalia Oddone
Cecilia Ortiz

2023

Declaratoria de autoría

Yo, Agustina Arrieta, declaro que el trabajo que se presenta en esta obra es de mi propia mano. Puedo asegurar que:

• La obra fue producida en su totalidad mientras realizaba el trabajo final de carrera;

• Cuando he consultado el trabajo publicado por otros, lo he atribuido con claridad;

• Cuando he citado obras de otros, he indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente mía;

• En la obra, he acusado recibo de las ayudas recibidas;

• Cuando la obra se basa en trabajo realizado juntamente con otros, he explicado claramente qué fue contribuido por otros, y qué fue contribuido por mí;

• Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.

Agustina Arrieta

10 de Octubre de 2023

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis tutoras, las doctoras Cecilia Ortiz y Natalia Oddone. En esta primera aproximación a la investigación me han sabido acompañar y transmitir su conocimiento en todo momento, haciendo de la experiencia mucho más enriquecedora.

Me gustaría agradecer a mis correctoras, la MSc. Florencia Sardi y la Dra. Sofía Ibarburu. por tener la gentileza de aceptar mi trabajo.

A todos los docentes, compañeros y amigos que me han dado esta carrera, su apoyo ha sido fundamental en este proceso.

Al Laboratorio de Biotecnología de la ORT y al Laboratorio de Biología Redox de Tripanosomas del Institut Pasteur de Montevideo, por permitirme realizar mis tareas allí y siempre estar dispuestos a ayudar cuando lo precisé.

A mi familia y amigas, realmente este logro no hubiese sido posible sin cada uno de ustedes. Por festejar mis logros como si fueran suyos, por su apoyo constante, y, especialmente, por ser seres de luz. Por último, quisiera agradecer especialmente a mis viejos, por su cariño incondicional y su fe en mí. Esto es para ustedes.

Resumen

El estrés oxidativo está caracterizado por el aumento de especies reactivas del oxígeno (ROS), desencadenando la peroxidación lipídica que desempeña un papel central en el desarrollo de diversas enfermedades y en la regulación de procesos biológicos. Este estudio se enfocó en la evaluación de biosensores fluorescentes codificados genéticamente diseñados para detectar lipoperóxidos (LOOHs), productos de la peroxidación lipídica, en regiones y compartimentos celulares clave: membrana plasmática, mitocondrias y núcleo celular. Estos biosensores, basados en proteínas redox-sensibles, ofrecen la posibilidad de detectar LOOHs de manera sensible, específica y no destructiva en células.

Partiendo como base de la construcción plasmídica del biosensor de LOOHs no dirigida (de localización citosólica), se generaron construcciones del biosensor conteniendo secuencias que lo dirijan a las regiones y compartimentos anteriormente mencionados. La expresión de los biosensores en compartimentos celulares específicos y su respuesta a moléculas relacionadas con el estrés oxidativo fue evaluada en la línea celular de hepatocitos HepG2, a través de microscopía láser confocal.

Los resultados preliminares revelaron una respuesta positiva de los biosensores ante peróxidos en células HepG2, lo que sugiere su potencial aplicación en estudios que involucren conocer si se desencadena lipoperoxidación en determinados contextos celulares.

La creciente evidencia que vincula la lipoperoxidación con enfermedades crónicas como el cáncer y la diabetes subraya la necesidad de desarrollar métodos precisos de detección y cuantificación de las especies moleculares asociadas. Estas herramientas no solo permitirían la

detección temprana de procesos patológicos, sino también el seguimiento de su progresión y podrían conducir al desarrollo de enfoques terapéuticos y farmacológicos innovadores.

Este trabajo representa un avance significativo en la detección de lipoperóxidos. El potencial futuro de estos biosensores se extiende a aplicaciones clínicas, terapéuticas y farmacológicas, lo que podría tener un impacto considerable en la mejora de la salud humana. A medida que esta tecnología avance, se abrirán oportunidades para una medicina más precisa y personalizada, lo que podría revolucionar el diagnóstico y tratamiento de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo.

Palabras clave

Biosensor. Lipoperóxidos. Peroxidasa. roGFP2. Compartimentos celulares.

Abreviaturas

BODIPY: Borodipirrometeno

COOH: Peróxido de cumeno

C-PxIII-roGFP2: Biosensor sin péptido señal

DAPI: 4,6-diamidino-2-fenilindol

DMEM: Medio Eagle modificado de Dulbecco

GFP: Proteína fluorescente verde

GSH: Glutatión

GSSG: Glutatión disulfuro

H_2O_2: Peróxido de hidrógeno

HepG2: Células de carcinoma hepatocelular humano

kDa: kilo Dalton

LOOH: Lipoperóxidos

MDA: malondialdehído

MPM: Marcador de peso molecular

M-PxIII-roGFP2: Biosensor con localización mitocondrial

4-HNE: 4-hidroxinonenal

N-PxIII-roGFP2: Biosensor dirigido hacia el núcleo celular

pb: Pares de bases

PBS: Buffer fosfato salino

PM-PxIII-roGFP2: Biosensor dirigido hacia la membrana plasmática

PxIII: Peroxidasa de lipoperóxidos de *Trypanosoma brucei*

roGFP2: Proteína fluorescente verde redox sensible

ROS: del inglés, *reactive oxygen species*

SFB: Suero Fetal Bovino

Índice

1. Introducción 11
1. 1 Estrés oxidativo y su rol en procesos fisiológicos y de enfermedad 11
1.1.1 LOOHs como marcadores de estrés oxidativo 12
1. 1. 2 Importancia de la detección precisa de LOOHs en células y tejidos 14
1. 2. 1 Biosensores fluorescentes codificados genéticamente basados en proteínas redox sensibles 18
1. 2. 2 Detección de LOOHs mediante el uso de un biosensor basado en roGFP2 22
1. 2. 2. 1. Peroxidasas de lípidos de T. brucei 22
1. 2. 2. 2 Módulo reportero: roGFP2 25
1. 2. 2. 3 Biosensor PxIII-roGFP2 26
1. 3 Línea celular de hepatocitos humanos, HepG2, ferroptosis y detección sitio-específica de LOOHs 30
1. 3. 1 Transfección transitoria 33
2. Objetivos 36
2. 1 - Objetivo general 36
2. 2 - Objetivos específicos 36
3. Metodología 37
3. 1 - Materiales y reactivos generales 37
3. 1. 1 Medios de cultivo 37
3. 1. 2 Soluciones 38
3. 1. 3 Buffers 38
3. 2 Generación de la línea celular HepG2-plásmidos 39
3. 2. 1 Crecimiento de células DH5-α 39
3. 2. 2 Generación de células quimiocompetentes 39
3. 2. 3 Generación de células electrocompetentes 40
3. 2. 4 Transformación de DH5-α con diferentes construcciones 41
3. 2. 5 Obtención de los plásmidos de interés y almacenamiento de stock bacteriano 42
3. 2. 6 Cuantificación del ADNp 45
3. 2. 7 Ensayo de restricción enzimático 46
3. 2. 7. 1 Ensayo de enzimas de restricción del plásmido pcDNA3.1 Zeo (+)_dMTS_PxIII C76S-roGFP2 46
3. 2. 7. 2 Ensayo de enzimas de restricción del plásmido pcDNA3.1 Zeo (+)_PMLS_PxIII C76S-roGFP2 50
3. 2. 7. 3 Ensayo de enzimas de restricción del plásmido pcDNA3.1 Zeo (+)_PxIII C76S-roGFP2_GSlinker_NLS SV40 51
3. 2. 8 Electroforesis de ADN 54
3. 2. 9 Cultivo de las células HepG2 54
3. 2. 9. 1 Descongelado y subcultivo de las células HepG2 54
3. 2. 9. 2 Transfección transiente de la línea celular HepG2 con los plásmidos dirigidos hacia diferentes compartimentos celulares 56
3. 3 Ensayos de localización y co-localización de los biosensores en la línea celular HepG2 59

3. 4 Ensayos de funcionalidad de los biosensores en la línea celular HepG2 con diferentes peróxidos 60
3. 5 Microscopía 60
3. 5. 1 Microscopía de epifluorescencia....60
3. 5. 2 Microscopía confocal 61
3. 6 Programas computacionales....62
3. 6. 1 Procesamiento de datos e imágenes 62
4. Resultados y Discusión 64
4. 1. Obtención y caracterización de construcciones de plásmidos con biosensor de LOOHs dirigido a membrana plasmática, mitocondria y núcleo celular 64
4. 2 Transfecciones transientes de la línea celular HepG2 con construcciones en pcDNA3.1 del sensor sitio-específicas....70
4. 2. 1 Evaluación de la transfección y expresión de los biosensores 70
4. 3 Evaluación de la expresión del biosensor en distintas regiones sub-celulares en las células transfectadas 71
4. 4 Análisis de la respuesta de los biosensores de LOOHs en la línea celular HepG2 79
4. 4. 1 Puesta a punto de las condiciones del ensayo para analizar la respuesta de los biosensores frente a estímulos 79
4. 4. 2 Respuesta de los biosensores frente a moléculas oxidantes 82
5. Conclusiones 99
6. Perspectivas 101
7. Análisis Económico 103

1. Introducción

1. 1 Estrés oxidativo y su rol en procesos fisiológicos y de enfermedad

Las especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*) son moléculas altamente reactivas que contienen oxígeno, y se generan como subproductos metabólicos en sistemas biológicos. Estas moléculas, que incluyen radicales superóxidos, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilos, desempeñan un papel esencial en procesos fisiológicos, como la señalización celular y la función inmunológica. Sin embargo, cuando los niveles de ROS se elevan, pueden causar daño a nivel celular y tisular, lo que se asocia con el desarrollo y la progresión de diversas enfermedades. Específicamente, su vínculo con patologías cardiovasculares, varios tipos de cáncer, enfermedades neurodegenerativas y otras, resalta su importancia clínica (1).

Varios estudios han revelado que la interacción entre las ROS con diferentes biomoléculas, como lípidos y proteínas, desempeña un rol importante en diversos procesos fisiológicos como la señalización celular, participando en mecanismos de transducción de señales y en la regulación de rutas metabólicas (2-4). Sin embargo, un desequilibrio en la producción de las ROS, puede generar un desbalance en el estado oxidativo celular, denominado estrés oxidativo, dañando por consecuencia estructuras biológicas, como las membranas celulares (4), las cuales como resultado de este fenómeno aumentan su permeabilidad y fluidez (1, 2, 4). Además, el estrés oxidativo está implicado en un tipo de muerte celular programada dependiente de la presencia de lipoperóxidos (LOOHs), y hierro ferroso (Fe^{2+}), conocido como ferroptosis. La

ferroptosis está ganando atención en la investigación médica debido a su relación con enfermedades hepáticas y otras patologías (2, 5). Por esta razón, ha surgido la necesidad de identificar y caracterizar biomarcadores confiables que permitan la detección precisa de procesos de lipoperoxidación, siendo los LOOHs marcadores relevantes en la evaluación del estrés oxidativo (3).

1.1.1 LOOHs como marcadores de estrés oxidativo

Los LOOHs son productos de peroxidación ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) en lípidos de las membranas celulares, la cual ocurre debido a la acción de radicales hidroperóxidos como el radical hidroxilo (6). Este proceso comienza con la etapa de iniciación, dónde ocurre el ataque de un radical a un PUFAs, que extrae un protón en un grupo químico vecino a un doble enlace, generando un radical lipídico. Luego, en la etapa posterior denominada propagación, el radical libre lipídico generado, reacciona con otro PUFA cercano. Estas reacciones continúan mientras los radicales libres atacan a otros PUFAs, amplificando el proceso. Esto lleva a la formación de LOOHs y otros productos secundarios que surgen de su degradación, como el 4-hidroxinonenal (4-HNE) y el malondialdehído (MDA) (Figura 1).

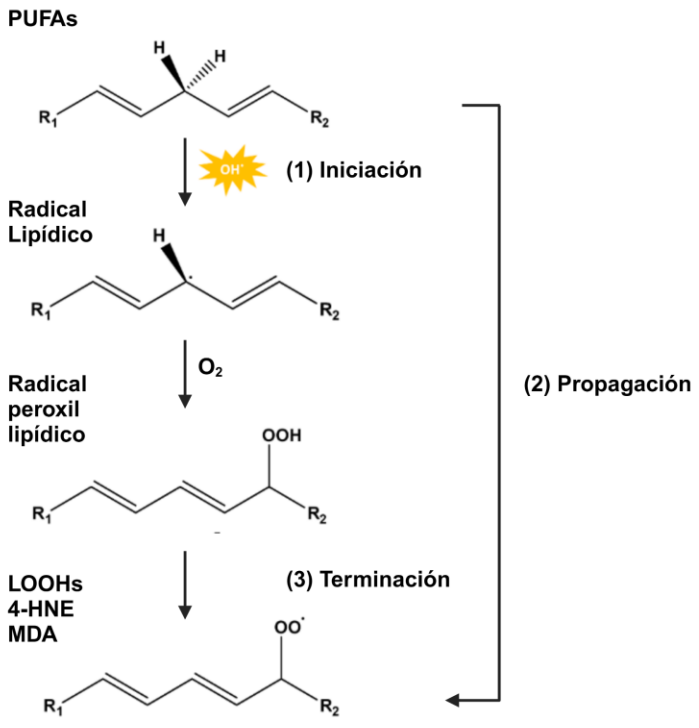

Figura 1. Diagrama esquemático de la formación de lipoperóxidos. En este se presentan las etapas de iniciación, propagación y terminación, resultando en la formación de LOOHs y otros productos de degradación: 4-HNE y MDA. Extraído y adaptado de Evans y colaboradores (7).

Los PUFAs, como el ácido linoleico y el ácido araquidónico, son particularmente sensibles a la peroxidación debido a su naturaleza altamente insaturada, lo que resulta en la producción de LOOHs, entre otros compuestos (1, 5, 8, 9). Los LOOHs presentan diversas funciones en el organismo, entre las que se destaca la señalización celular (1, 6). Sin embargo, altos niveles de LOOHs, producto del desbalance entre su producción y descomposición, pueden generar daño celular irreversible. Esto genera un impacto en la bicapa lipídica de las membranas plasmáticas, alterando la permeabilidad y fluidez de estas; asimismo, puede afectar la estructura y función de ácidos nucleicos y proteínas, generando daño adicional a través de sus productos de degradación (1, 5, 6). La acumulación de LOOHs puede tener un impacto significativo en las células, que pueden ser causantes de escenarios patológicos, es por esto por lo que han surgido

como marcadores potenciales de estrés oxidativo.

En comparación con otros productos de la peroxidación lipídica antes mencionados, los LOOHs exhiben una relativa estabilidad química, lo que los hace más idóneos para su detección. Adicionalmente, estas especies se forman en varios tejidos en respuesta al estrés oxidativo y pueden detectarse además de en células, en fluidos biológicos, lo que los convierte en valiosos indicadores del desbalance oxidativo en diferentes tipos de muestras biológicas (8, 9).

1. 1. 2 Importancia de la detección precisa de LOOHs en células y tejidos

La importancia de detectar de manera precisa los lipoperóxidos en muestras biológicas radica en su uso como biomarcadores de estrés oxidativo en estudios clínicos y epidemiológicos. Esto permite identificar a individuos que presentan riesgo de desarrollar diversas enfermedades como la diabetes y el cáncer, además de brindar información esencial sobre los mecanismos que las subyacen, fomentando el desarrollo de potenciales terapias innovadoras y estrategias preventivas (10, 11). Entre éstas, se incluyen enfoques dirigidos a restaurar el equilibrio redox celular, el cual hace referencia al equilibrio entre las reacciones de reducción (ganancia de electrones) y oxidación (pérdida de electrones) en un sistema biológico, la modulación de rutas metabólicas disfuncionales y la mejora de la respuesta antioxidante del organismo (10-12).

En la actualidad, la detección de lipoperóxidos está basada en técnicas analíticas convencionales, principalmente la cromatografía acoplada a espectrometría de masas. No obstante, dichas técnicas presentan la limitación de ser destructivas, ya que emplean homogenados celulares y tisulares, además de requerir equipamiento especializado (6, 13, 14).

Por otro lado, los LOOHs también pueden ser detectados mediante el uso de sondas químicas; estas tienen como ventaja que permiten estimar la lipoperoxidación de forma no destructiva. Dentro de éstas últimas, se destaca el uso de la sonda fluorescente Borodipirrometeno (BODIPY) conjugada a una molécula hidrofóbica (C11). Esta sonda es sensible a la peroxidación y emite fluorescencia roja en su forma reducida, mientras que los productos oxidados emiten fluorescencia verde. A pesar de ser una técnica sencilla, requiere precaución en cuanto a su interpretación, ya que su reacción con los radicales hidroxilos es más lenta que la de los antioxidantes captadores de radicales. A su vez, una vez que detecta el analito, la sonda no es capaz de revertir la reacción, lo que impide una medición dinámica del proceso de lipoperoxidación de la muestra. Por último, es relevante señalar que esta sonda no es específica para LOOHs, aunque su ubicación en membranas celulares sugiere que los detecta (15, 16).

En general, la detección de LOOHs es llevada a cabo mediante métodos indirectos como el ensayo del ácido tiobarbitúrico (TBA), dónde se detecta el MDA, entre otras moléculas que resultan de la peroxidación lipídica, marcadores indirectos de estrés oxidativo, como la actividad de enzimas antioxidantes, y la concentración de especies reactivas como las ROS, el uso de espectrofotometría, entre otros (8, 9, 13, 17). Estas técnicas permiten la detección rápida y económica de los productos resultantes de la lipoperoxidación, aspectos fundamentales a la hora de realizar estudios clínicos e investigaciones. Sin embargo, estas metodologías presentan limitaciones en términos de especificidad y sensibilidad (8, 9, 13, 17), identificando no solo los LOOHs sino también otros compuestos como aldehídos y otros peróxidos. En todos los casos, estas técnicas son incapaces de identificar los lipoperóxidos de manera sitio-específica, y no brindan información sobre los eventos moleculares relacionados a los mismos.

Para superar estas limitaciones y comprender mejor el papel de los LOOHs en el estrés oxidativo, se han realizado esfuerzos para desarrollar técnicas más sensibles y específicas que los detecten, y además conserven la integridad celular. En este contexto, los biosensores fluorescentes codificados genéticamente basados en una enzima peroxidasa, como el que se describe en este trabajo, han emergido como una alternativa prometedora. Estos biosensores proporcionan una herramienta de detección precisa de peróxidos, superando las limitaciones inherentes a las técnicas tradicionales y generando nuevas perspectivas en la investigación del estrés oxidativo.

1. 2 Uso de biosensores para detectar moléculas de forma específica

En la actualidad, la búsqueda de alternativas innovadoras para la detección específica y sensible de biomarcadores, es de gran importancia, y no solo en la detección de enfermedades y monitoreo de su progresión, sino que también para la detección de los posibles efectos secundarios de un medicamento, contribuyendo así al desarrollo de nuevos tratamientos y/o fármacos (9, 17, 18). Hoy en día, las técnicas más utilizadas para la determinación de biomarcadores consisten en métodos basados en inmunoensayos enzimáticos, como el ELISA (19, 20), métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (21, 22), fluorescencia (23, 24), entre otros (25). En cuanto a los dispositivos empleados para detectar biomarcadores, los más comunes son los biosensores, ver Tabla 1. Éstos, presentan dos componentes funcionales, uno denominado unidad sensora, la cual interacciona con la molécula blanco, y otro denominado unidad reportera, encargada de convertir dicha interacción en una señal medible (18).

Tipo de Biosensor	Aplicación
Biosensor de glucosa oxidasa	Estudio de glucosa en muestras biológicas
Biosensor de ácido úrico	Estudios para descubrir anormalidades clínicas o enfermedades
Biosensor de HbA1c	Medición de hemoglobina glucosilada
Biosensor basado en nanopartículas	Diagnóstico de enfermedades, entre otros
Biosensor de silício	Bioimagenología y detección biológica
Biosensor microfabricado	Monitoreo de demanda bioquímica de oxígeno
Biosensor microfabricado	Monitoreo de toxicidad ambiental y toxicidad por metales pesados y pesticidas
Biosensor basado en MXenes	Diagnóstico de cáncer colorrectal

Tabla 1. Uso de diferentes tipos de biosensores y sus aplicaciones. Extraído y adaptado de Kulkarni y colaboradores (26).

La eficiencia de un biosensor depende de la eficacia de las unidades que lo componen y de la selectividad de la unión entre la unidad sensora y la molécula blanco (de interés). El uso de estos dispositivos tiene grandes ventajas entre las cuales se encuentran la sencillez (en cuanto a su preparación y determinación), la portabilidad y rápida respuesta (18). Por otro lado, los biosensores presentan limitaciones relacionadas con la estabilidad frente a condiciones ambientales, la durabilidad de estos y la susceptibilidad a interferencias en muestras complejas. A pesar de estas desventajas, los biosensores continúan siendo herramientas de detección de

gran relevancia, y su utilidad depende de la consideración adecuada de estos factores en el diseño experimental y la aplicación práctica (27, 28).

1. 2. 1 Biosensores fluorescentes codificados genéticamente basados en proteínas redox sensibles

La detección precisa de moléculas biológicas y procesos intracelulares han hecho atractivo el uso de biosensores para ser aplicados en diversas áreas de la biología celular y molecular. Particularmente, debido a la naturaleza de las moléculas señalizadoras redox (Glutatión: GSH y Glutatión disulfuro: GSSG), las cuales son altamente difusibles, reactivas y presentan un tiempo de vida medio corto, el uso de biosensores diseñados para su detección ha sido una de las innovaciones más destacadas en esta área. En particular, el uso de biosensores fluorescentes codificados genéticamente dio lugar a una nueva era en la investigación de la biología redox. Estos presentan numerosas ventajas, siendo tecnologías no invasivas y capaces de ser dirigidas hacia diferentes compartimentos celulares. Además, los genes codificantes para las proteínas que componen los biosensores pueden ser controlados mediante el uso de promotores específicos, y, por ende, restringir la expresión de estas construcciones, únicamente en células de interés. Adicionalmente, mediante la aplicación de técnicas de ingeniería genética se pueden generar organismos transgénicos conteniendo estas construcciones, lo que proporciona no solo estabilidad de señal sino también reproducibilidad de resultados (28, 29).

Dentro de los biosensores codificados genéticamente se encuentran aquellos basados en proteínas fluorescentes (PF) con residuos de cisteína redox activas (Figura 2). Estos sirven para rastrear procesos celulares y moléculas de interés en organismos vivos con alta selectividad y

baja invasividad. Asimismo, estos sensores biológicos pueden dirigirse hacia compartimentos celulares específicos mediante la incorporación de secuencias de localización, proporcionando información sobre la dinámica espacial y temporal (30).

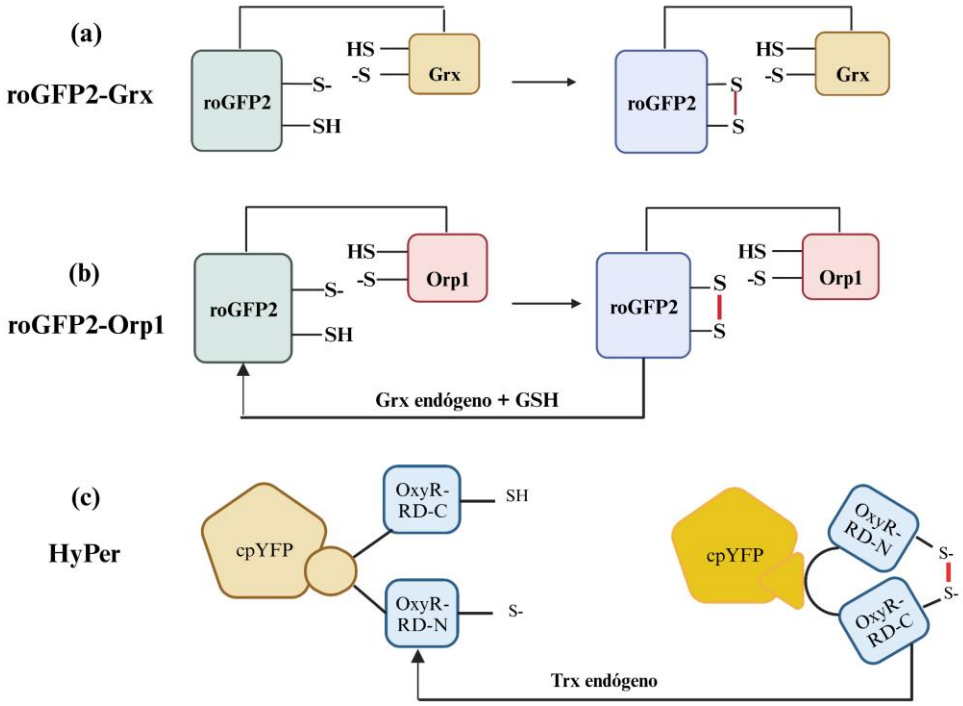

Figura 2. Esquemas de algunos de los principales tipos de biosensores redox basados en proteínas fluorescentes. Extraídos y modificados de J. Zimmermann y colaboradores (31).

Estos biosensores presentan como unidad sensora, una enzima oxidorreductasa que, al reconocer el analito de interés, forma un puente disulfuro, que luego se forma con la unidad reportera; este intercambio tiol-disulfuro, culmina con un puente disulfuro en la proteína fluorescente reportera. Este intercambio de puentes disulfuro entre enzima sensora y proteína reportera, provoca la modificación del espectro de fluorescencia de la última, reportando la presencia del biomarcador (Figura 3) (27, 29).

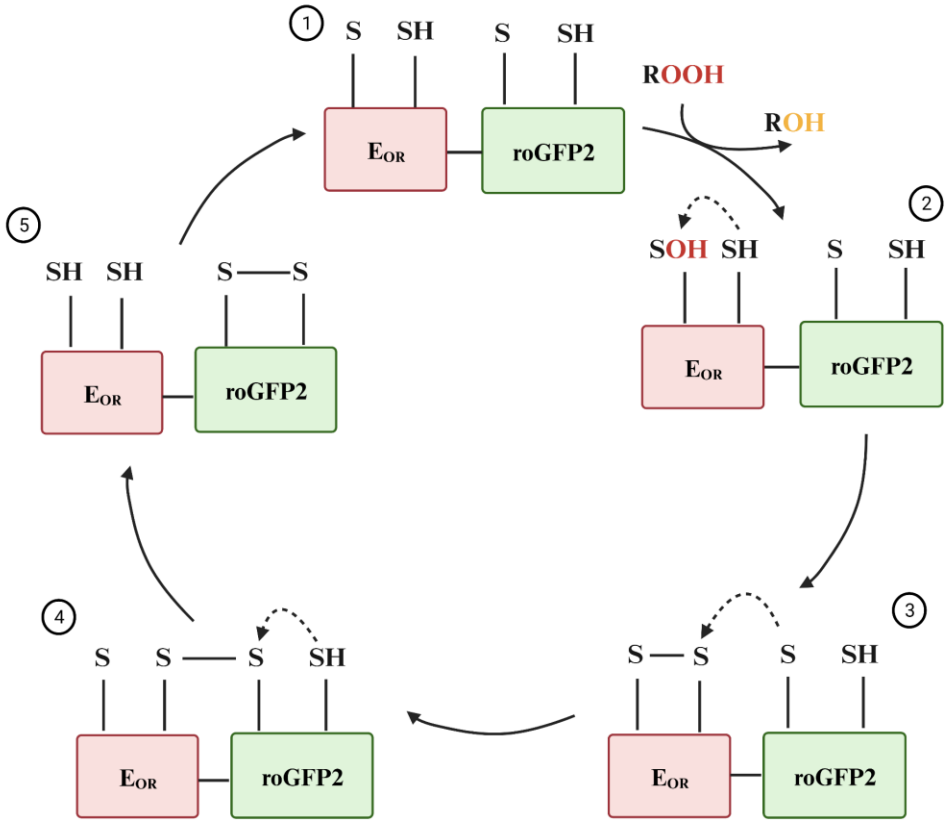

Figura 3. Mecanismo de acción de biosensores codificados genéticamente basados en proteínas fluorescentes (PF) con residuos de cisteína redox activas. E_{OR}: Enzima oxidorreductasa.

Desde su descubrimiento, se han desarrollado varias sondas basadas en proteínas fluorescentes para detectar el estado redox celular, así como también H_2O_2. Actualmente, los biosensores basados en proteínas redox sensibles más utilizados pertenecen a las familias roGFP (proteína fluorescente verde redox sensible) y HyPer (29).

La familia roGFP consiste en proteínas sensibles al estado redox que se desarrollaron fusionando roGFP con proteínas adaptadoras, y se originaron en 2004 al introducir residuos de cisteína cercanos al cromóforo de la proteína GFP (29, 32-34). Surgen variantes de esta primera versión, destacándose roGFP1 y roGFP2 en investigaciones posteriores (34-36).

Estas proteínas, que se basan en modificaciones de GFP, ofrecen mediciones ratiométricas de alta velocidad y reversibilidad en respuesta a cambios en el potencial redox del entorno tanto *in vivo* como *in vitro* (figura 4) (36). En cuanto al término ratiométrico, este se refiere a la capacidad del sensor para medir la respuesta en relación con la proporción de dos señales de emisión o excitación diferentes, en lugar de depender de una intensidad de fluorescencia absoluta. Este enfoque permite realizar mediciones cuantitativas precisas y comparativas, independientes de la concentración de la sonda, lo que simplifica las mediciones y mejora la precisión al compensar factores como el fotoblanqueamiento, las diferencias en los niveles de expresión y las influencias del pH en la intensidad de fluorescencia.

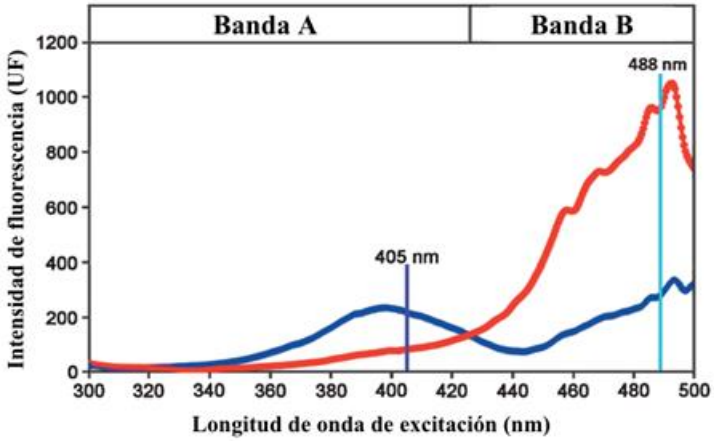

Figura 4. Espectro de excitación de roGFP2. Debido a las modificaciones en roGFP2, el cromóforo de roGFP2 en su estado reducido experimenta un proceso de desprotonación, lo que resulta en un pico máximo de excitación alrededor de 488 nm (curva roja). Cuando roGFP2 se oxida, el cromóforo tiende a protonarse preferentemente, lo que le otorga mayor excitabilidad a 405 nm mientras disminuye su excitabilidad a 488 nm (curva azul). Extraído y adaptado de Meyer y Dick (2010) (32).

Por otro lado, se optimizó roGFP2 mediante una fusión con la enzima glutaredoxina 1 humana (Grx1), dando lugar a la sonda Grx1-roGFP2, lo que permitió mediciones ratiométricas de pH independiente; además, debido a que la enzima hGrx1 cataliza la oxidación de glutatión, la

detección es más rápida en comparación con la dada por roGFP2 (37). También, con el fin de evaluar el potencial redox de diversas moléculas, se desarrollaron sondas basadas en roGFP, como el mycothiol de *Mycobacterium tuberculosis* y el bacillithiol de *Staphylococcus aureus* (38, 39). Se han diseñado además, sondas específicas para H_2O_2 que se basan en esta proteína redox sensible reportera, como por ejemplo, la roGFP2-Orp1 y roGFP2-Tsa2ΔCR, siendo Orp1 una tiorredoxina peroxidasas y Tsa2ΔCR una mutación de Tsa2, una típica 2-Cys peroxirredoxina de *S. cerevisiae* (33).

1. 2. 2 Detección de LOOHs mediante el uso de un biosensor basado en roGFP2

Haciendo referencia a la detección de LOOHs, cómo se mencionó en la sección 1. 1. 2, estos son detectados mediante técnicas que presentan baja selectividad, incapacidad de realizar medidas en tiempo real, y que carecen de resolución sitio-específica. A pesar de que el desarrollo de nuevas tecnologías como los biosensores redox codificados genéticamente es una de las posibles estrategias para superar estas limitaciones, actualmente no existen reportes de biosensores de este tipo que sean específicos de LOOHs. Sin embargo, en el marco del proyecto posdoctoral de la Dra. Natalia Oddone, diseñó y validó un biosensor de LOOHs basado en la fusión de una peroxidasa de lípidos de *T. brucei* (PxIII) con la roGFP2.

1. 2. 2. 1. Peroxidasas de lípidos de *T. brucei*

Los antecedentes de este biosensor se basan en la investigación de las peroxidasas de *Trypanosoma brucei*. Las peroxidasas son enzimas redox que participan en las reacciones de reducción y oxidación en las células para mantener el equilibrio del estado redox (40, 41). Dentro de éstas, se encuentran las glutatión peroxidasas (GPx), que desempeñan un papel crucial en la detoxificación en mamíferos (31, 40-44). Las GPx contienen cisteínas o selenocisteínas en su sitio activo y pueden clasificarse en varias isoformas, como GPx1, GPx2, GPx3 y GPx4. Estas enzimas tienen una alta especificidad para reducir peróxidos lipídicos, metabolitos tóxicos producidos durante procesos celulares normales o como resultado del estrés oxidativo (40, 41, 44). En particular, la GPx4 desempeña un rol fundamental en la protección de las células contra la detoxificación de este tipo de compuestos. Su importancia ha sido demostrada en estudios en ratones, donde la ausencia de esta enzima se ha relacionado con la muerte de embriones durante su gestación (41, 42). En el caso de *Trypanosoma brucei*, un protozoo unicelular responsable de la enfermedad del sueño africana en humanos, se han identificado tres genes que codifican para peroxidasas que contienen cisteína en lugar de selenocisteína (31, 40, 43, 44). Estas peroxidasas, conocidas como GPx-like (PxI-III), son homólogas, en cuanto a su función, a las GPx de mamíferos. Estas Pxs, que son virtualmente idénticas, se encuentran en el citosol (Px I y II) y la mitocondria (Px III), y al igual que en mamíferos, la ausencia de las Pxs resulta ser letal para el parásito (31, 40, 44). En este trabajo el biosensor en estudio presenta la peroxidasa GPxIII de *T. brucei* como unidad sensora.

Melchers y colaboradores en 2007 (40) realizaron investigaciones para caracterizar la GPxIII de *T.brucei*. Para ello, eliminaron el péptido de señalización de la GPxIII a la mitocondria y realizaron estudios de su estructura utilizando técnicas como la resonancia magnética nuclear

(NMR) y la difracción de rayos X. Los resultados obtenidos revelaron que la GPxIII es una proteína monomérica que opera independientemente del glutatión (GSH), a diferencia de las GPx de mamíferos. En lugar de tener una selenocisteína en su sitio catalítico como las GPx de mamíferos, la GPxIII de *T. brucei* posee dos cisteínas; a su vez, este estudio permitió dilucidar cómo funciona la enzima en cuestión (40). En estudios realizados en el año 2011 por Diechtierow y colaboradores (43) se exploró el papel in vivo de las proteínas Px en *T. brucei*. Se demostró que la PxIII recombinante presenta una alta eficiencia en la reducción de hidroperóxidos lipofílicos, como los derivados del ácido araquidónico, ácido linoleico y fosfatidilcolina. A partir de los datos cinéticos y los resultados *in vivo* obtenidos, se pudo confirmar que las enzimas de tipo Px desempeñan un rol fundamental en la reducción de los hidroperóxidos lipídicos libres o asociados a membranas en los tripanosomas africanos estudiados (*T. brucei*, *T. cruzi*, entre otros), lo que subraya su importancia en la protección contra el estrés oxidativo en estos organismos (43). Por otro lado, en un estudio llevado a cabo por Bogacz y Krauth-Siegel en 2018 (45), se investigó la presencia de ferroptosis en el parásito *Trypanosoma brucei*. Se descubrió que en tripomastigotes, la falta de peroxidasas lleva a la muerte de estos parásitos en pocas horas, sin embargo, cuando se les suministran moléculas que previenen la oxidación del hierro o se sobreexpresa la PxIII, los parásitos sobreviven (45). Este estudio sugiere que la ferroptosis es un mecanismo de muerte celular antiguo presente en *T. brucei*, y puede proporcionar información valiosa sobre la ferroptosis en otros organismos (45), de allí el uso de estas enzimas en estudios posteriores relacionados a este tipo de muerte celular, como lo es el caso del biosensor validado en este trabajo.

1. 2. 2. 2 Módulo reportero: roGFP2

En este proyecto, se utilizó la proteína fluorescente redox sensible roGFP2 como el módulo reportero del biosensor en estudio. Esta elección se basa en sus características únicas y su idoneidad para proporcionar mediciones precisas y estables, independientemente de factores que podrían influir en la señal, como la concentración del pH intracelular. Su principal ventaja radica en su capacidad para cambiar su fluorescencia en respuesta a las variaciones en el estado redox, específicamente a través de la oxidación y reducción de su centro activo; esto es debido, principalmente, a la incorporación mediante ingeniería genética de dos cisteínas reactivas, una en la posición 204 y otra en la posición 147. Esta capacidad permite obtener mediciones en tiempo real de las condiciones redox en compartimentos celulares específicos (32, 34, 39, 46).

Otra de las características de roGFP2 es su independencia de la concentración del pH, lo que simplifica significativamente la interpretación de los resultados. Esto significa que las mediciones realizadas con roGFP2 son robustas y precisas, incluso en entornos intracelulares donde las condiciones de pH pueden variar. Esta estabilidad es esencial para comprender los cambios en los niveles de lipoperóxidos y su impacto en la ferroptosis.

1. 2. 2. 3 Biosensor PxIII-roGFP2

El presente trabajo es la continuación del biosensor validado, PxIII-roGFP2, el cual está basado en la fusión de la peroxidasa de lípidos PxIII de *Trypanosoma brucei* (unidad sensora) con la enzima redox fluorescente roGFP2 (unidad reportera) (Figura 5A).

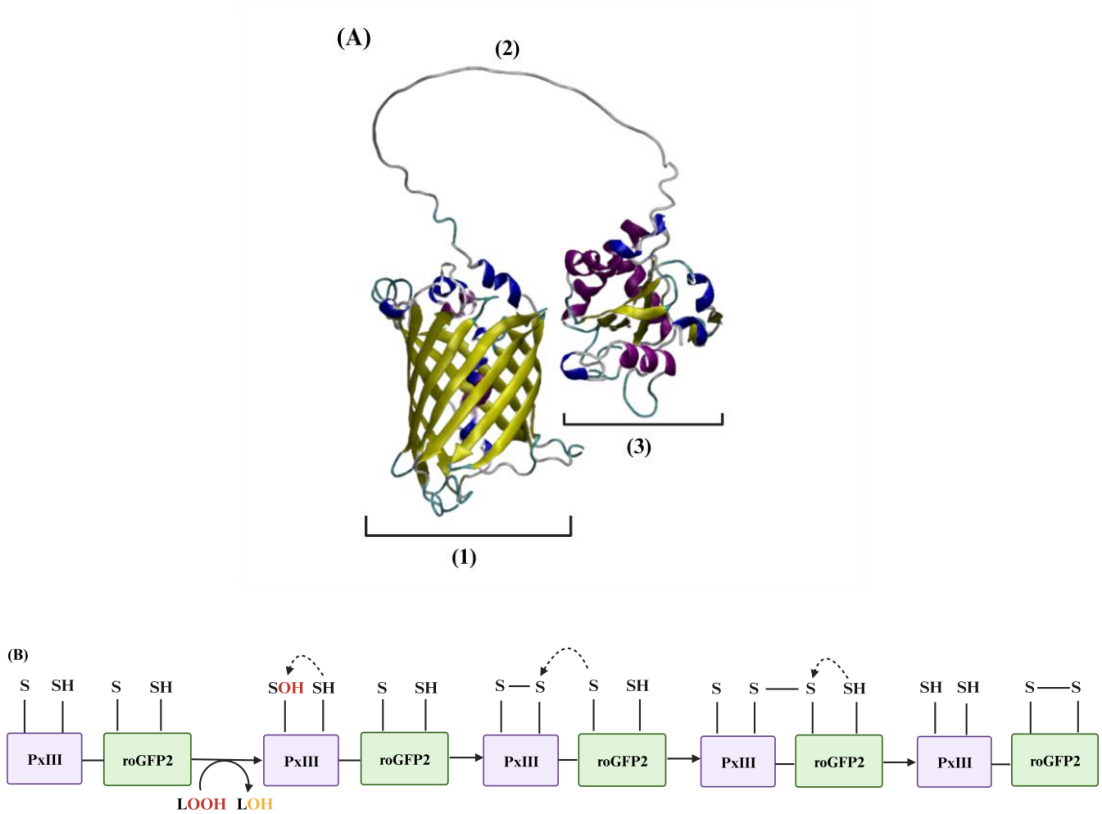

Figura 5. (A): Representación tridimensional del biosensor PxIII-roGFP2 presentando la estructura de cada módulo y el linker entre ambos. (1) Módulo reportero: roGFP2. (2): linker. (3) Módulo sensor: peroxidasa PxIII. Generado en VMD. **(B):** Diagrama del mecanismo de óxido-reducción del biosensor PxIII-roGFP2. Generado en BioRender.

El funcionamiento del biosensor se basa en la proximidad espacial y la complementación redox de estas dos unidades (40); Brevemente, en primer lugar, la cisteína peroxidática de la GPxIII se oxida cuando interacciona con un LOOH, formando así ácido sulfénico. Esta cisteína oxidada puede ser reducida por la cisteína resolutiva de la misma enzima, generando un disulfuro intramolecular. Posteriormente, el ácido sulfénico o el disulfuro de la GPxIII pueden ser reducidos por las cisteínas presentes en la roGFP2, lo que regenera la GPxIII en su forma reducida y, al mismo tiempo, oxida la roGFP2 (Figura 5B). Por último, la oxidoreducción de la roGFP2 afectan de manera ratiométrica su espectro de fluorescencia, lo que permite cuantificar los niveles de LOOH. Esto se logra midiendo la intensidad de fluorescencia en dos

longitudes de onda de excitación (405 nm y 488 nm) y una longitud de onda de emisión (510 nm) (40) (Figura 6).

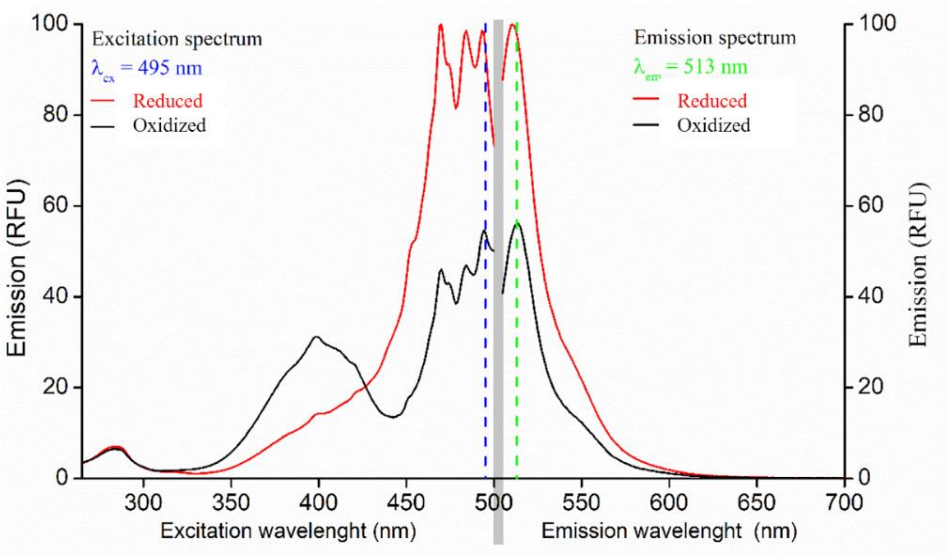

Figura 6. Espectro de excitación y emisión de PxIII-roGFP2 reducido y oxidado. Extraído de Oddone y colaboradores. (Resultados no publicados).

La validación del biosensor PxIII-roGFP2, fue llevada a cabo *in vitro* e *in cellulo* en organismos parásitos unicelulares (*Leishmania tarentolae*) y en hepatocitos humanos (línea celular HepG2). Durante estas investigaciones, el biosensor fue expresado, purificado y caracterizado en términos espectrales y cinéticos, mostrando una respuesta específica y rápida a los peróxidos derivados del ácido araquidónico (15(S)-HpETE) y linoleico (9(S)-HpODE), lo cual es concordante con lo obtenidos en estudios previos descritos más adelante (43). Esto se ilustra en la Tabla 2, dónde se pueden apreciar que las constantes cinéticas de 15(S)-HpETE y 9(S)-HpODE son más elevadas en comparación con peróxidos simples como el H_2O_2.

Hidroperóxido	**k_{01} ($M^{-1}s^{-1}$)**
Tertbutílico (t-Bu-OOH)	$1,4 \times 10^4$
Vitamina K1-OOH	$1,7 \times 10^4$
H_2O_2	$1,36 \times 10^5$
Cumeno-OOH	$4,84 \times 10^5$
Ácido oleico-OOH	$1,93 \times 10^7$
9(S)-HpODE	**$3,2 \times 10^7$**
15(S)-HpETE	**$7,2 \times 10^7$**

Tabla 2. Constantes cinéticas de primer orden (k_{01}) de oxidación de PxIII por diferentes hidroperóxidos. En negrita se destacan los peróxidos derivados de los ácidos araquidónicos (15(S)-HpETE) y linoleico (9(S)-HpODE). (Resultados no publicados de Oddone y colaboradores).

A su vez, este sensor respondió de manera reversible tanto a la oxidación química como a la oxidación mediada por sistemas redox endógenos en los dos modelos de estudio (tripanosomátidos y hepatocitos humanos). También, se estudió la respuesta del biosensor de LOOHs expresado de manera estable en células de *L. Tarentolae* inmovilizadas mediante imagenología de células vivas. Se observó una respuesta más sensible y específica del sensor en cuestión frente al peróxido de cumeno (COOH) en comparación con H_2O_2 (figura 7).

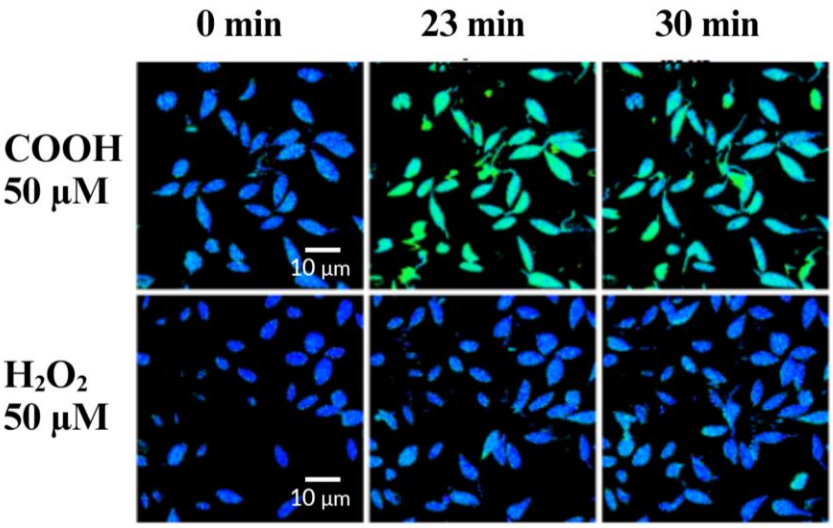

Figura 7. Respuesta del biosensor PxIII-roGFP2 expresado de forma estable en células *L. Tarentolae*, frente a COOH y H_2O_2. Biosensor reducido (azul) y Biosensor oxidado (verde/amarillo). Escala: 10 μm.

Por otro lado, se realizaron ensayos comparativos entre el biosensor PxIII-roGFP2 y HyPer en células de mamífero (línea celular HepG2) en presencia de H_2O_2 y COOH, un oxidante químico. Los resultados revelaron una sensibilidad mayor de PxIII-roGFP2 por COOH, mientras que HyPer no respondió frente a este peróxido (Figura 8). (Resultados no publicados de Oddone y colaboradores).

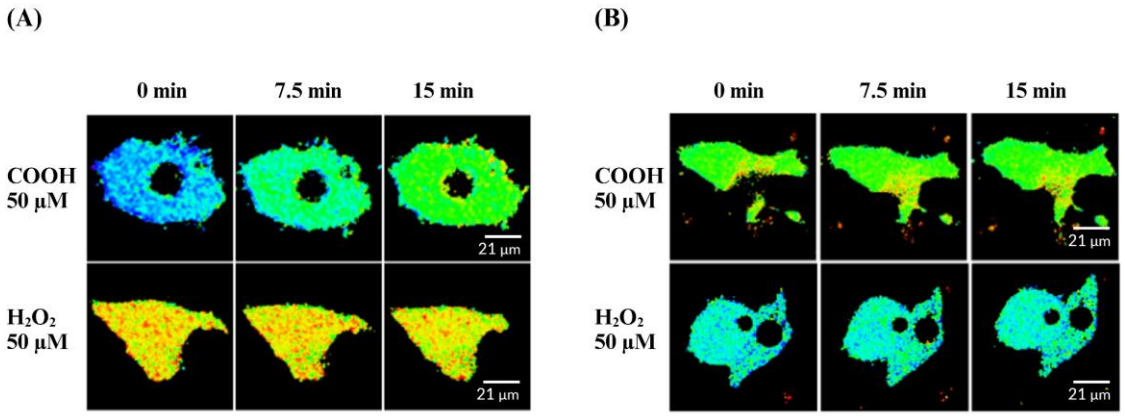

Figura 8. (A): Respuesta del biosensor PxIII-roGFP2 frente a COOH y H_2O_2. **(B):** Respuesta del sensor HyPer en presencia de COOH y H_2O_2. Biosensor reducido (azul) y Biosensor oxidado (verde/amarillo). Escala: 21 μm.

1. 3 Línea celular de hepatocitos humanos, HepG2, ferroptosis y detección sitio-específica de LOOHs

El hígado, un órgano con un alto contenido de hierro y propenso al estrés oxidativo, desempeña un papel central en una variedad de funciones metabólicas y fisiológicas vitales para el organismo. Además de su función principal en el procesamiento de nutrientes, el hígado juega un papel esencial en el metabolismo lipídico y la homeostasis. Sin embargo, su exposición constante a una variedad de factores, incluyendo el estrés oxidativo y el aumento de la carga de hierro, lo coloca en un escenario propenso al desarrollo de enfermedades hepáticas. Entre estas afecciones, la fibrosis y la cirrosis hepática han emergido como problemas de salud críticos a nivel mundial, afectando a millones de personas (2, 47-49).

La ferroptosis, es un proceso de muerte celular regulada relacionado con la acumulación de lipoperóxidos (LOOHs), ha ganado protagonismo como un mecanismo potencialmente crucial

en el desarrollo y progresión de enfermedades hepáticas. Debido a la estrecha relación entre la ferroptosis, la acumulación de hierro y el estrés oxidativo, la línea celular de hepatocitos humanos, HepG2, es ampliamente utilizada en investigaciones biomédicas en el estudio de diversos procesos celulares y patológicos (4, 50, 51). y por lo tanto representa un modelo ideal para aplicar el biosensor de LOOHs.

Una de las principales cualidades de las células HepG2 radica en su capacidad para mantener la función hepática, lo cual las transforma en un modelo importante para estudios relacionados con el hígado y sus funciones (50, 51). Esto es esencial dado que la peroxidación lipídica y la muerte por ferroptosis están estrechamente relacionadas con el metabolismo hepático y la homeostasis lipídica (52, 53). Además, las HepG2 son altamente sensibles a los desencadenantes de estrés oxidativo y tienen la capacidad de acumular hierro intracelular, lo que las convierte en un modelo relevante para estudios relacionados con la ferroptosis (51-53).

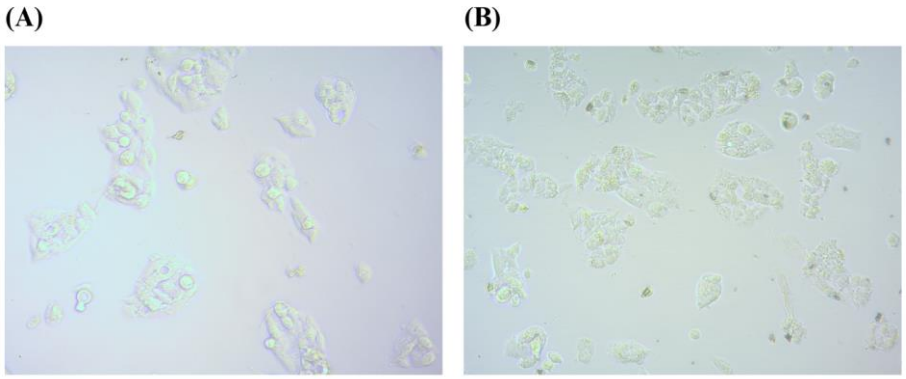

Figura 9. Imagen aumentada de la línea celular HepG2. **(A):** células HepG2 control, 100% viables. **(B):** células HepG2 en presencia de 5 µM de Erastina. Resultados no publicados de Oddone y colaboradores.

En la Figura 9, se ilustra el impacto de la ferroptosis en la línea celular hepática HepG2. En la Figura 9A, se muestran células HepG2 creciendo en un medio de cultivo correspondiente,

representando un entorno celular normal y saludable con un 100% de viabilidad. En contraste, en la Figura 9B, se presentan células HepG2 después de la adición de 5 µM de erastina, un conocido inductor de la ferroptosis (resultados no publicados de Oddone y colaboradores). La erastina, al aumentar la acumulación de hierro intracelular, desencadena la peroxidación lipídica y, finalmente, conduce a la ferroptosis. Como resultado, se observa una alteración significativa en la morfología celular y una reducción en la viabilidad celular (54, 55).

En este contexto, la detección precisa de lipoperóxidos en compartimentos celulares específicos es esencial para comprender cómo estos compuestos afectan a la célula en distintos niveles, particularmente en el contexto de la ferroptosis. Estos compartimentos incluyen la membrana plasmática, donde los lipoperóxidos pueden influir en la permeabilidad y fluidez de la misma; la mitocondria, donde impactan en la respiración celular y la producción de energía; y el núcleo, donde interfieren con la replicación del ADN y la transcripción génica (3, 6, 56). La utilización de biosensores redox fluorescentes, como el abordado en este trabajo, se presenta como una herramienta fundamental para llevar a cabo esta detección precisa y, de esta forma, profundizar en la comprensión de procesos celulares y patológicos relacionados con la peroxidación lipídica, la ferroptosis y la relevancia de ésta última en las enfermedades hepáticas.

1. 3. 1 Transfección transitoria

La transfección es una técnica moderna utilizada para insertar ácidos nucleicos foráneos dentro de células eucariotas, modificando así el contenido génico de las células huésped. Esta metodología puede ser empleada con el fin de estudiar procesos celulares, mecanismos de enfermedades a nivel molecular, e inclusive, analizar los efectos de una terapia génica, entre otros. Además, puede ser utilizado para descubrir biomarcadores específicos que puedan ser

utilizados para el diagnóstico y pronóstico de enfermedades. Existen diferentes metodologías para obtener los niveles de transfección deseados, presentando todos varias limitantes y ventajas; la elección del método de transfección a utilizar depende de diversos factores, como el tipo y el origen de la célula hospedera, el tipo de ácido nucleico a ser introducido, el nivel de expresión génica que se requiera y la eficiencia de transfección deseada, por mencionar algunos (57, 58).

La transfección puede clasificarse en dos tipos (Figura 10). Por un lado, se tiene la transfección estable, en la cual el ácido nucleico de interés es integrado al genoma nuclear de la célula huésped o se mantiene como un vector episomal en el núcleo de la célula hospedera, y por otro la transfección transitoria. Ésta última no requiere de la incorporación del ácido nucleico al genoma de la célula hospedera, por ende, la expresión del transgen se perderá eventualmente luego de algunos ciclos de replicación de la célula (57, 58). La elección para el uso de un tipo de transfección u otro depende en su mayoría de las células en estudio y el objetivo del experimento a realizar. La transfección estable es utilizada para la producción a gran escala de proteínas, la generación de líneas celulares estables y para terapia génica, mientras que la transfección transitoria puede ser empleada para estudiar el efecto de genes expresados en corto tiempo (58).

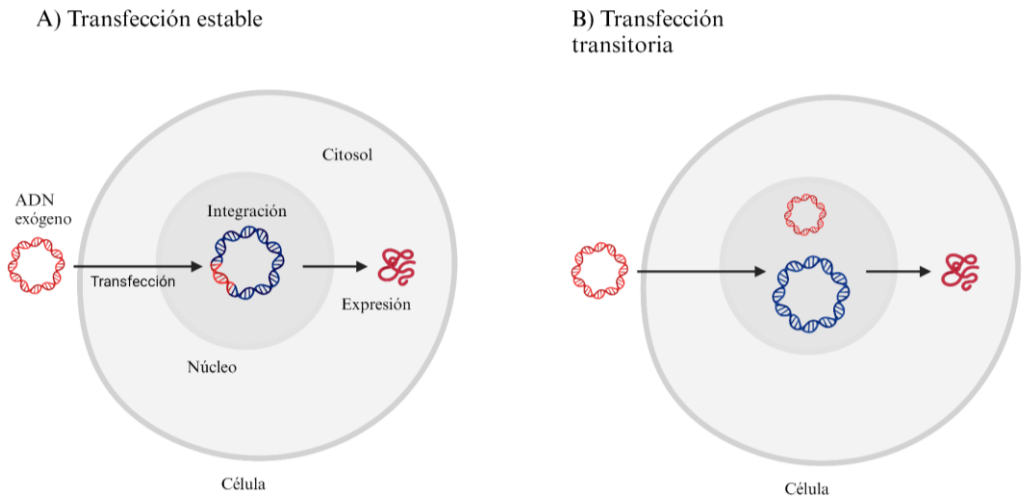

Figura 10. Diagramas esquemáticos de dos tipos diferentes de transfección. **(A)** Transfección estable: el ADN exógeno (rojo) se transporta al núcleo celular al atravesar las membranas celulares y nucleares. Este ADN se incorpora al genoma del huésped (azul) y se expresa de manera continua. **(B)** Transfección transitoria: el ADN exógeno se introduce en el núcleo, pero no se integra en el genoma. Las flechas negras indican la entrega de ácidos nucleicos exógenos. Extraído y modificado de Kim y Eberwine (44).

Dentro de las técnicas para llevar a cabo la transfección más utilizadas se encuentran la microinyección, el uso de vectores biológicos como el adenovirus, y la transfección química mediada, por ejemplo, por lípidos catiónicos (Figura 11). Ésta última, denominada lipofección, emplea un complejo lipídico para la incorporación del ADN a las células blanco. Esta tecnología utiliza liposomas, estructuras vesiculares que presentan la misma composición que la membrana celular, los cuales pueden ser endocitados o pueden fusionarse directamente con la membrana celular con el fin de liberar el ADN dentro de las células (17). Esta metodología puede utilizarse en una amplia variedad de células, presentando niveles de eficiencia de transfección elevados en la mayoría de los casos. A su vez, puede ser utilizada tanto para la transfección estable como para la transfección transiente de las células (58).

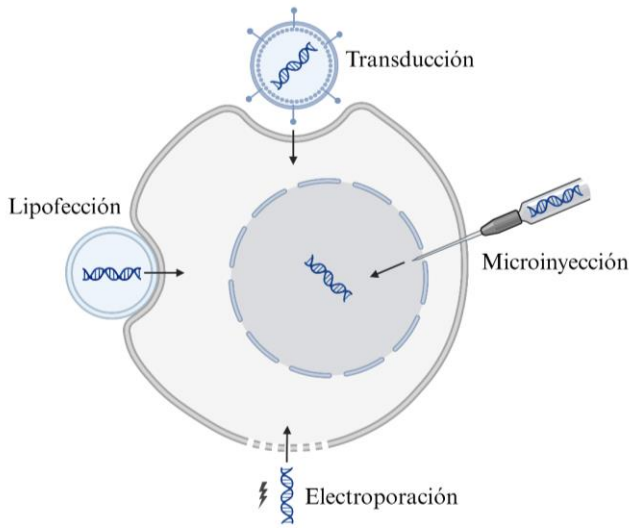

Figura 11. Esquema de las diferentes técnicas de transfección. Generado en BioRender.

Dado el papel crítico del estrés oxidativo en una amplia gama de enfermedades y procesos fisiológicos, y la necesidad de detectar con precisión compuestos producidos por la peroxidación lipídica en células y tejidos, se ha impulsado la creación de herramientas efectivas y altamente específicas para el monitoreo de estos marcadores. Entre estas herramientas, los biosensores fluorescentes han surgido como una prometedora solución, ofreciendo la capacidad de detectar lipoperóxidos (LOOHs) de manera altamente específica en compartimentos celulares clave. En este contexto, este estudio se enfoca en la evaluación de biosensores fluorescentes diseñados para detectar LOOHs en la membrana plasmática, mitocondria y núcleo celular de las células HepG2. La relevancia de esta investigación no se limita a la evaluación de estos biosensores, sino que se extiende hacia su potencial para servir como punto de partida en futuros estudios sobre la detección de LOOHs y el estrés oxidativo. Esto allana el camino hacia investigaciones posteriores y abre las puertas a posibles aplicaciones clínicas, terapéuticas y farmacológicas que podrían revolucionar el diagnóstico y tratamiento de enfermedades asociadas al estrés oxidativo.

2. Objetivos

2. 1 - Objetivo general

Evaluar la expresión y funcionalidad de un biosensor fluorescente de lipoperóxidos dirigido a membrana plasmática, mitocondria y núcleo celular, en células HepG2.

2. 2 - Objetivos específicos

- Obtención y caracterización de construcciones de plásmidos conteniendo las secuencias codificantes de los biosensores dirigidos a citosol, membrana plasmática, mitocondria y núcleo celular.
- Generación de líneas celulares HepG2 con las distintas construcciones plasmídicas caracterizadas, y evaluación de la transfección.
- Evaluación de la expresión del biosensor en los diferentes compartimentos celulares en las células HepG2 transfectadas.
- Análisis de la respuesta de los biosensores dirigidos a LOOHs en las células mencionadas.

Se espera evaluar la expresión y funcionalidad de biosensores fluorescentes para la detección de lipoperóxidos en diferentes compartimentos en células HepG2. Los biosensores estarán dirigidos al citosol, a la membrana plasmática, la mitocondria y el núcleo celular, permitiendo la detección sitio-específica de los LOOH.

3. Metodología

3. 1 - Materiales y reactivos generales

3. 1. 1 Medios de cultivo

Todos los medios utilizados en este trabajo fueron esterilizados mediante autoclave a 121°C durante 20 minutos. La composición detallada de los medios y el uso de estos se resume en la Tabla 3.

Tabla 3 - Medios de cultivo utilizados en el trabajo

Medio	Ingredientes	Uso
LB	10 g/L Triptona, 5 g/L Extracto de levadura y 5 g/L NaCl.	Cultivo general de bacterias en medio líquido
LB Agar (LAB)	10 g/L Triptona, 5 g/L Extracto de levadura, 5 g/L NaCl y 15 g/L de agar.	Cultivo general de bacterias en medio sólido
LB Agar con Ampicilina	10 g/L Triptona, 5 g/L Extracto de levadura, 5 g/L NaCl, 15 g/L de agar y Ampicilina 100 mg/mL.	Cultivo selectivo de bacterias en medio sólido
DMEM with GlutaMAX™ Supplement (Gibco™)	Indicados por el fabricante.	Medio basal para el crecimiento de células de mamífero

3. 1. 2 Soluciones

Las soluciones utilizadas para este trabajo se enumeran en la Tabla 4. Todos los antibióticos fueron esterilizados mediante filtración utilizando filtros de jeringa de 0.22 µm.

Tabla 4 - Soluciones utilizadas en este trabajo

Solución	Ingredientes/Concentraciones
Ampicilina 100 mg/mL	1 g de Ampicilina en 10 mL de agua ultrapura.

3. 1. 3 Buffers

Los buffers utilizados en este proyecto se presentan en la Tabla 5. La composición se detalla a continuación.

Tabla 5 - Buffers utilizados en este proyecto

Buffer	Ingredientes
Buffer de carga 6X ADN	Azul de bromofenol 0,25% (w/v), Xylene Cyanol 0,25% (w/v) y glicerol 30% concentración final.
Buffer TAE 50X	Tris Base 2M, Ácido acético glacial 1 M y EDTA 50 mM pH 8.0.
HBSS	KCl 5.33 M, KH2PO4 0.44 M, NaCl 138 M, NaHCO3 4 M, Na2HPO4 0,3 M y glucosa 5,6 M.
HEPES buffered imaging medium	NaCl 750 mM, HEPES 100 mM, CaCl2 5 mM, KCl 25 mM y MgCl2 5 mM.

3. 2 Generación de la línea celular HepG2-plásmidos

3. 2. 1 Crecimiento de células DH5-α

Se utilizó un stock de bacterias *Escherichia coli* células DH5-α brindadas por la Dra. Cecilia Ortiz; estas fueron sembradas en placas de Petri con medio LB en condiciones de esterilidad, y se crecieron a 37°C ON.

3. 2. 2 Generación de células quimiocompetentes

Se prepararon células DH5 alfa quimiocompetentes. Brevemente, se crecieron colonias DH5-α en medio LB y se incubaron a 37°C ON en agitación (250 rpm). Posteriormente, se inoculó 1 mL del cultivo anterior en 20 mL de medio LB y se midió el OD a 600 nm. Luego de realizada la medida, se incubó el cultivo a 37°C en agitación (250 rpm) y se midió el OD cada 30 minutos. Este paso se repitió hasta alcanzar un OD_{600nm} de 0.5 U. A. Luego, el cultivo fue retirado del agitador y se incubó en hielo. Se continuó con el protocolo, para ello, se centrifugaron 6 mL del cultivo durante 20 minutos a 4000 g, el sobrenadante fue descartado y se resuspendieron las bacterias en 3 mL de $CaCl_2$ 0,1 M frío. Se centrifugaron nuevamente las células a 4°C durante 20 minutos a 4000 g, se descartó el sobrenadante, y se repitieron estos dos últimos pasos. Por último, se resuspendieron las células en 600 μL de $CaCl_2$ 0,1 M frío y se mantuvieron a -80°C hasta la transformación.

3. 2. 3 Generación de células electrocompetentes

Se seleccionaron colonias aisladas de bacterias DH5-α crecidas en placa; estas fueron subcultivadas en medio LB y se incubaron a 37°C ON en agitación (250 rpm). Luego, se inocularon 5 mL de este cultivo en 250 mL de medio LB y se midió el OD a 600 nm. Después de realizada la medida, se incubó el cultivo a 37°C en agitación (250 rpm) y se midió el OD_{600nm} cada 20 minutos. Esta medida se repitió hasta alcanzar un OD_{600nm} entre 0,35 a 0,4. Una vez alcanzado este parámetro, se retiró el cultivo del agitador y se incubó en hielo por 30 minutos. Seguidamente, se transfirió el cultivo a tubos falcon de 50 mL para realizar una centrifugación a 4°C durante 15 minutos a 1000 g. El sobrenadante fue descartado, y el pellet celular se

resuspendió en 50 mL de agua estéril. Las células se centrifugaron a 4 °C durante 20 minutos a 1000 g, se descartó el sobrenadante. Se continuó el protocolo con la centrifugación de las células a 4°C por 15 minutos a 1000 g; el sobrenadante fue descartado y las células se resuspendieron en 10 mL de glicerol 10%. Por último, se centrifugaron las células a 4°C durante 20 minutos a 1000 g, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en 250 μL de glicerol 10%. Se alicuotaron 50 μL de las células competentes, se les añadió 15 μL de glicerol 70%, y se mantuvieron a -80°C hasta su transformación.

3. 2. 4 Transformación de DH5-α con diferentes construcciones

Se descongelaron 4 alícuotas conteniendo 600 μL de bacterias *E. coli* DH5-α quimiocompetentes cada una; 3 de estas alícuotas fueron destinadas a contener los diferentes plásmidos dirigidos a los compartimentos celulares correspondientes, por lo que se les adicionó 1 μL del ADN plasmídico correspondiente: pcDNA3.1 Zeo (+) con el inserto dirigido hacia la membrana plasmática PM-PxIII-roGFP2, pcDNA3.1 Zeo (+) con el inserto dirigido hacia mitocondria M-PxIII-roGFP2, y pcDNA3.1 Zeo (+) con el inserto dirigido hacia el núcleo celular N-PxIII-roGFP2. La alícuota restante fue utilizada como control negativo. Las células se incubaron en hielo durante 30 min, y luego, se procedió a realizar el choque de calor por 45 seg en un termobloque a 37°C, y se las colocó en hielo durante 2 min. Posteriormente, se adicionaron 900 µL de medio LB y se las incubó a 37°C por 1 h en agitación (250 rpm). Por último, se sembraron 100 μL de las suspensiones celulares en placas de Petri con LB-Ampicilina. Adicionalmente, se sembró una dilución al medio de las células en placas de Petri LB conteniendo ampicilina (100 μg/mL). Las placas mencionadas fueron incubadas a 37°C hasta el día siguiente.

Por otro lado, en referencia a las células electrocompetentes, estas fueron sometidas al protocolo de electroporación. Resumiendo, se descongelaron e incubaron 30 minutos en hielo tres alícuotas de 100 μL de bacterias *E. coli* DH5-α, y se les adicionó 1 μL de los plásmidos correspondientes. Seguidamente, se procedió a realizar la electroporación aplicando un pulso de 1,8 KV por 4.4 ms en electroporador (MicroPulserTM Electroporator, BIORAD). Una vez culminada la misma, se incubaron las células en 900 μL de medio LB a 37°C en agitación (2500 rpm) durante 40 minutos. Por último, se sembraron 100 μL de las células transformadas en placas de Petri con LB-Ampicilina; Además, se sembraron 100 μL de una dilución al medio de la suspensión bacteriana en placas de Petri con antibiótico. A diferencia de las células quimiocompetentes, se sembraron 100 μL de las células transformadas con los plásmidos dirigidos al núcleo y a la membrana plasmática concentrados. Para ello, previo a realizar la siembra, se centrifugaron las células conteniendo dichas construcciones durante 5 minutos a 5000 g. Todas las placas fueron incubadas a 37°C ON.

En ambas metodologías de transformación, las células se transformaron con 0.315 μg de ADN de la construcción N-PxIII-roGFP2, 0.288 μg de ADN de la construcción PM-PxIII-roGFP2 y 0.488 μg de ADN de la construcción M-PxIII-roGFP2, respectivamente.

Adicionalmente, se transformaron células DH5-α electrocompetentes con 0.476 μg de ADN de la construcción con expresión citosólica: C-PxIII-roGFP2 empleando el protocolo descrito anteriormente. Estas células fueron utilizadas como control.

3. 2. 5 Obtención de los plásmidos de interés y almacenamiento de stock bacteriano

Se partió de las bacterias *E.coli* DH5-α conteniendo los plásmidos correspondientes crecidas ON en las placas de Petri. Se picó 1 colonia de cada placa crecida en el medio de selección, y se incubaron en tubos falcon estériles conteniendo 6 mL de medio LB + 6 μL de ampicilina 100 μg/mL en agitación a 37°C ON, a 250 rpm.

A partir de los cultivos líquidos obtenidos, se tomó 570 μL del mismo y se lo colocó en un criovial, adicionando al mismo 430 µL de glicerol al 70%. Los crioviales fueron almacenados a -80°C.

Se emplearon 3 estrategías de extracción del ADN plasmídico dónde se realizaron Minipreps a partir de 4 mL del cultivo bacteriano crecido ON, utilizando diferentes kits comerciales: Zippy Plasmid Miniprep, ZR Plasmid Miniprep y NucleoSpin®Plasmid. Cada una de las extracciones se realizó por triplicado.

Haciendo uso del kit comercial **Zyppy Plasmid Miniprep (Zymoresearch)**, brevemente, las bacterias se centrifugaron y el pellet bacteriano se resuspendió en 200 µL de Buffer P1. Luego, se le agregó 200 µL de Buffer P2, se homogeneizó la solución invirtiendo el tubo varias veces y se incubó la reacción durante 1 a 2 minutos a temperatura ambiente. Finalizado el tiempo de incubación, se le adicionó 400 µL de Buffer P3, se mezcló y se incubó durante 1 a 2 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a 13000 g durante 2 minutos y el sobrenadante obtenido fue cargado en una columna Zymo-Spin™ IIN. La columna se centrifugó a 13000 g por 1 minuto, se descartó el eluido y se le agregó 200 µL de Endo-Wash Buffer. Se centrifugó nuevamente, se descartó el eluido y se agregó 400 µL de Plasmid Wash

Buffer. Por último, se colocó la columna en un tubo eppendorf de 1,5 mL y se adicionó sobre la matriz 30 µL de agua miliQ, se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto y se centrifugó a 13000 g por 1 minuto. Los plásmidos fueron almacenados a -20°C hasta su uso.

Utilizando el kit comercial **ZR Plasmid Miniprep (Zymoresearch)**, se centrifugaron 1.5 mL del cultivo bacteriano crecido previamente ON a 4000g durante 8 minutos, se descartó el sobrenadante, y se resuspendió el pellet en 200 µL de Buffer P1. A continuación, se agregó 200 µL de Buffer P2, se homogeneizó la solución invirtiendo el tubo varias veces y se incubó la reacción durante 1 a 2 minutos a temperatura ambiente. Finalizado el tiempo de incubación, se le adicionaron 400 µL de Buffer P3, se mezcló y se incubó nuevamente durante 1 a 2 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a máxima velocidad durante 2 minutos y el sobrenadante obtenido fue cargado en una columna Zymo-Spin™ IIN. La columna se centrifugó a 13500 g por 1 minuto, se descartó el eluido y se le agregó 200 µL de Endo-Wash Buffer. Se centrifugó nuevamente, se descartó el eluido y se agregó 400 µL de Plasmid Wash Buffer, seguido de un paso posterior de centrifugación a 13500 g por 1 minuto. Por último, se colocó la columna en un tubo eppendorf de 1,5 mL y se añadieron 30 µL de agua miliQ a la columna, se centrifugó a 13500 g durante 30 segundos. Los plásmidos fueron almacenados a -20°C hasta su uso.

A su vez, se utilizó el kit comercial **NucleoSpin®Plasmid (MACHEREY-NAGEL)** para realizar Minipreps a partir de los gliceroles realizados. Se siguieron las instrucciones indicadas por el fabricante con ciertas modificaciones; a continuación, se detalla el protocolo utilizado. Se partió de pellets celulares congelados transformados con las construcciones de interés. Los pellets se obtuvieron luego de centrifugar 1.5 mL del cultivo bacteriano crecido previamente ON a 4000g durante 8 minutos; el sobrenadante fue descartado y almacenado a -20°C hasta su

uso.

Se descongeló el pellet a temperatura ambiente y se resuspendió en 250 µL de Buffer A1. A continuación, se incubó el Buffer A2 a 40°C durante 5 minutos. Culminado este tiempo, se adicionaron 250 µL de dicho Buffer y la solución fue homogeneizada invirtiendo el tubo varias veces; se incubó la reacción durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalizado el tiempo de incubación, se adicionaron 400 µL de Buffer A3, se mezcló la solución invirtiendo el tubo varias veces, y se incubó nuevamente durante 6 a 8 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugaron las muestras a 11000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente y el sobrenadante obtenido fue cargado en una columna NucleoSpin® Plasmid/Plasmid (NoLid) Column. La columna se centrifugó a 11000 g por 1 minuto, se descartó el eluido y se agregaron 500 µL del Buffer AW para lavar la membrana de la columna. Se centrifugó nuevamente a 11000 g durante 1 minuto, se añadió 600 µL de Buffer A4, y se volvió a centrifugar. Se descartó el sobrenadante, y luego se centrifugó la columna a 11000 g durante 5 minutos con el fin de secar la membrana de esta. Por último, se colocó la columna en un tubo eppendorf de 1,5 mL y se añadió 50 µL de Buffer AE a la misma, se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 11000 g por 1 minuto. Los plásmidos fueron almacenados a -20°C hasta su uso.

3. 2. 6 Cuantificación del ADNp

La concentración de ADN presente en las minipreps realizadas en el punto 3. 2. 3, se determinó mediante absorbancia a 260 nm, y el grado de pureza del mismo se estimó a través del cociente 260 nm/280 nm. Para llevar a cabo estos procedimientos se utilizó el equipo de espectrofotometría Nanodrop (DeNovix).

3. 2. 7 Ensayo de restricción enzimático

3. 2. 7. 1 Ensayo de enzimas de restricción del plásmido pcDNA3.1 Zeo (+)_dMTS_PxIII C76S-roGFP2

A partir de los plásmidos extraídos en el punto 3. 2. 3, y con el fin de verificar la presencia del inserto, biosensor dirigido hacia la mitocondria, se realizó un ensayo de restricción con las enzimas NheI (Thermo Fisher) y BamHI (Thermo Fisher) (Figura 12).

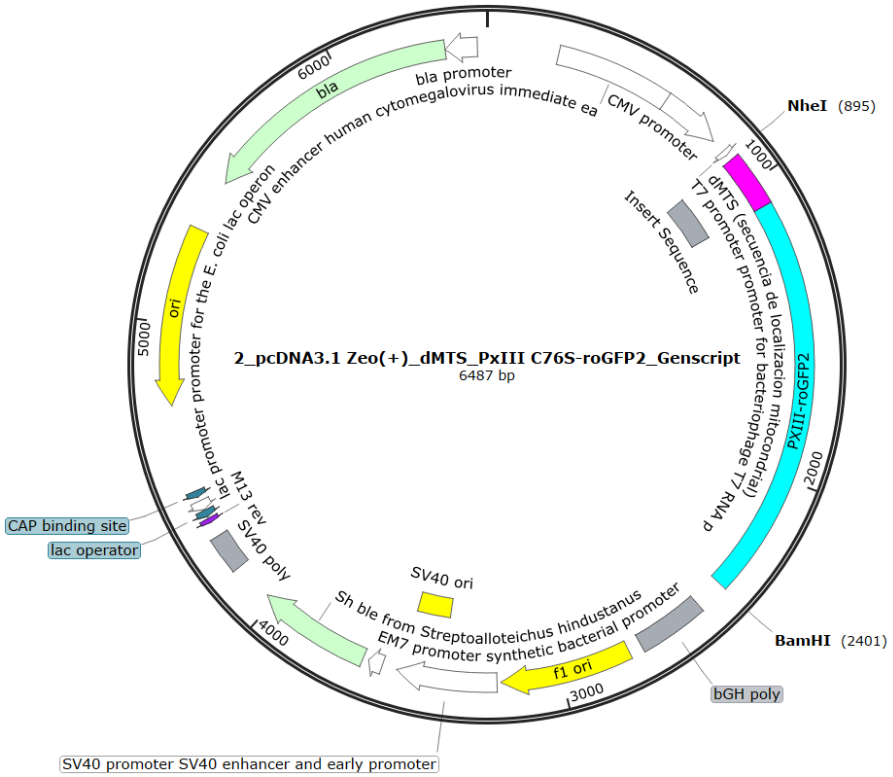

Figura 12. Plásmido pcDNA3.1 Zeo (+) con el biosensor dirigido hacia la mitocondria.

Mapa plasmídico en el cual se observan los sitios de corte de las enzimas de restricción seleccionadas, NheI(895) y BamHI(2401).

Utilizando la herramienta DoubleDigest Calculator de Thermo Fisher, se seleccionó el buffer a utilizarse y las condiciones de incubación. En la Tabla 6, se presenta el protocolo recomendado por el fabricante para realizar la digestión.

Tabla 6 - Protocolo de digestión enzimática

Buffer Tango 1 X	2 µL
NheI	1 µL
BamHI	1 µL
ADN*	2,8 µL
H_2O	c.s.p 16 µL

* El volumen de ADN agregado en la reacción corresponde a 1 μg de ADN plasmídico. El fabricante recomienda utilizar entre 0.5 a 1 μg de ADN.

Esta solución fue incubada durante 2 horas a 37°C.

Adicionalmente, se ensayaron 2 digestiones más de este plásmido, utilizando diferentes pares de enzimas: NheI (Thermo Fisher) y PstI (Thermo Fisher), y por otro lado, NheI (Thermo Fisher) y EcoRV (Thermo Fisher). En la figura 13 se presenta el mapa plasmídico conteniendo los sitios de corte de las enzimas de restricción mencionadas.

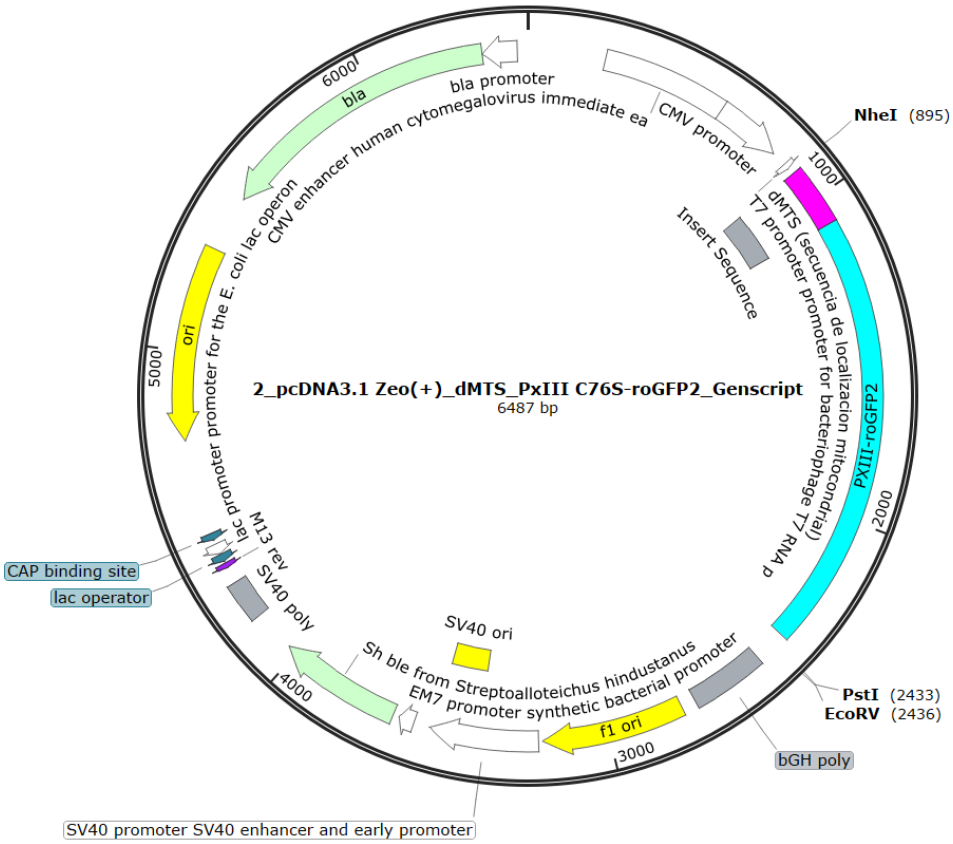

Figura 13. Plásmido pcDNA3.1 Zeo (+) con el biosensor dirigido hacia la mitocondria.

Mapa plasmídico en el cual se observan los sitios de corte de las enzimas de restricción seleccionadas, NheI(895), PstI(2433), y EcoRV(2436).

Como en el caso anterior, se utilizó la herramienta DoubleDigest Calculator para seleccionar el buffer a utilizarse y las condiciones de incubación. En la Tabla 7 y 8, se presentan los protocolos recomendados por el fabricante para realizar las digestiones.

Tabla 7 - Protocolo de digestión enzimática

Buffer Tango 1 X	2 µL
NheI	1 µL
PstI	2 µL
ADN*	2,8 µL
H_2O	c.s.p 22 µL

* El volumen de ADN agregado en la reacción corresponde a 1 μg de ADN plasmídico. El fabricante recomienda utilizar entre 0.5 a 1 μg de ADN.

Tabla 8 - Protocolo de digestión enzimática

Buffer Tango 1 X	2 µL
NheI	1 µL
EcoRV	4 µL
ADN*	2,8 µL
H_2O	c.s.p 30 µL

* El volumen de ADN agregado en la reacción corresponde a 1 μg de ADN plasmídico. El fabricante recomienda utilizar entre 0.5 a 1 μg de ADN.

Las soluciones fueron incubadas durante 2 horas a 37°C.

3. 2. 7. 2 Ensayo de enzimas de restricción del plásmido pcDNA3.1 Zeo (+) _PMLS_PxIII C76S-roGFP2

Partiendo de los plásmidos extraídos en el punto 3. 2. 3, y con el fin de verificar la presencia del inserto, biosensor dirigido hacia la membrana plasmática, se realizó un ensayo de restricción con las enzimas NheI (Thermo Fisher) y BamHI (Thermo Fisher) (Figura 14).

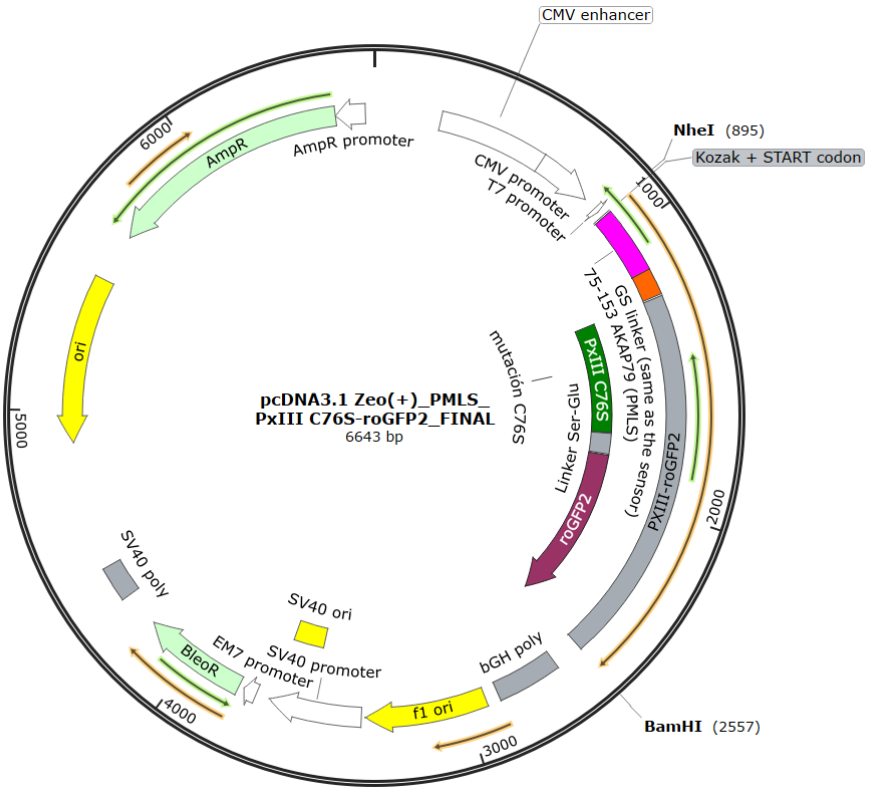

Figura 14. Plásmido pcDNA3.1 Zeo (+) con el biosensor dirigido hacia la membrana plasmática. Mapa plasmídico en el cual se observan los sitios de corte de las enzimas de restricción seleccionadas, NheI(895) y BamHI(2557).

Utilizando la herramienta "DoubleDigest" Calculator de Thermo Fisher, se seleccionó el buffer a utilizar y las condiciones de incubación. A continuación, en la Tabla 9, se presenta el

protocolo seguido para llevar a cabo la digestión de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

Tabla 9 - Protocolo de digestión enzimática

Buffer Tango 1 X	2 µL
NheI	1 µL
BamHI	1µL
ADN*	1,2 µL
H_2O	c.s.p 16 µL

* El volumen de ADN agregado en la reacción corresponde a 1 μg de ADN plasmídico. El fabricante recomienda utilizar entre 0.5 a 1 μg de ADN.

Esta solución fue incubada durante 2 horas a 37°C.

3. 2. 7. 3 Ensayo de enzimas de restricción del plásmido pcDNA3.1 Zeo (+)_PxIII C76S-roGFP2_GSlinker_NLS SV40

A partir de los plásmidos extraídos en el punto 3. 2. 3, y con el fin de verificar la presencia del inserto, biosensor dirigido hacia el núcleo celular, se realizó un ensayo de restricción con las enzimas HindIII (Thermo Fisher) y BamHI (Thermo Fisher) (Figura 15).

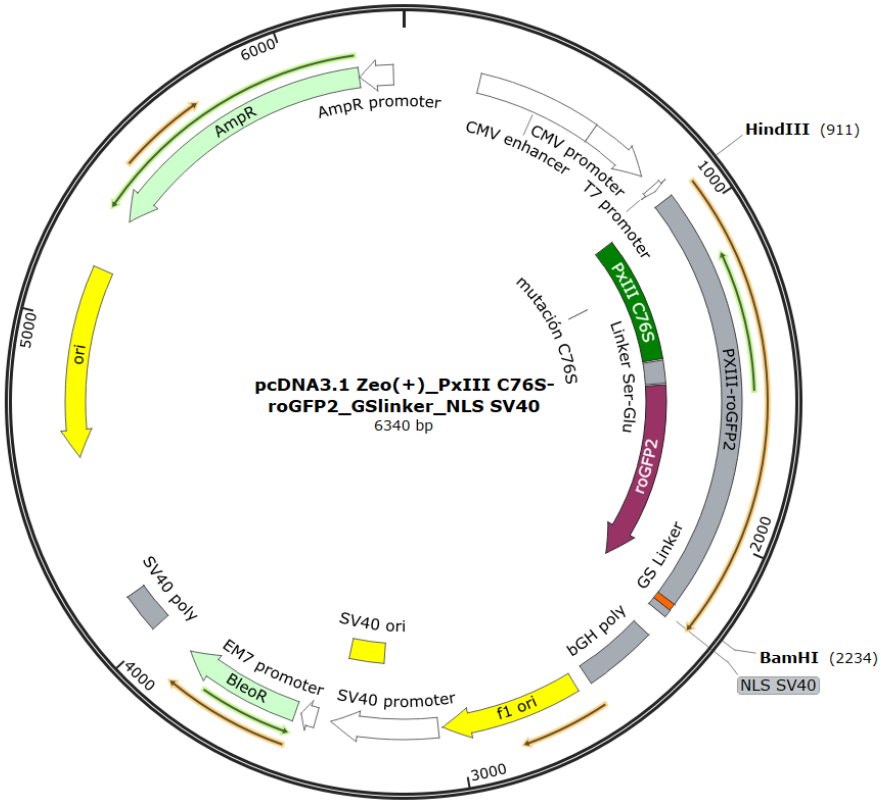

Figura 15. Plásmido pcDNA3.1 Zeo (+) con el biosensor dirigido hacia el núcleo celular

Mapa plasmídico en el cual se observan los sitios de corte de las enzimas de restricción seleccionadas, HindIII(911) y BamHI(2234).

Utilizando la herramienta DoubleDigest Calculator de Thermo Fisher, se seleccionó el buffer a utilizarse y las condiciones de incubación. Se presenta en la Tabla 10 el protocolo recomendado por el fabricante para realizar la digestión.

Tabla 10 - Protocolo de digestión enzimática

Buffer BamHI 10 X	2 µL
HindIII	2 µL
BamHI	1µL
ADN*	12,8 µL
H_2O	c.s.p 16 µL

* El volumen de ADN agregado en la reacción corresponde a 1 μg de ADN plasmídico. El fabricante recomienda utilizar entre 0.5 a 1 μg de ADN.

La solución fue incubada ON a 37°C. Finalizadas las reacciones de restricción, se inactivaron las enzimas mediante incubación a 65°C durante 20 minutos; los productos obtenidos en las diferentes digestiones se visualizaron mediante una electroforesis en un gel de agarosa 1% a 100 V. Se esperaba observar una banda de 1500 pb, otra de 1644 pb, y por último, una de 1314 pb aproximadamente, correspondientes a las secuencias genéticas de los biosensores dirigidos a mitocondria, membrana plasmática y núcleo celular respectivamente. La visualización del gel se realizó mediante la obtención de imágenes a partir del software E Gel® Imager System (Thermo Scientific).

Por último, cabe destacar que no se realizó la confirmación del biosensor que se expresa en citosol, C-PxIII-roGFP2, ya que este fue previamente caracterizado y validado en estudios previos realizados por Oddone y colaboradores (resultados no publicados).

3. 2. 8 Electroforesis de ADN

Se prepararon geles de agarosa en buffer TAE 0,5X al 1% en base al tamaño de los fragmentos de ADN a separar. Resumiendo, se disolvió la agarosa (BIO-41025, Bioline) en el buffer TAE 0,5X (20-6000-50, Thistle Scientific) calentando la solución en microondas. Posteriormente, la solución se enfrió y se le añadió el agente intercalante GoodView™ (SBS Genentech Co. Ltd, #HGV-2). La solución se vertió en un cassette de gel con un peine y se dejó solidificar. Las muestras de ADN provenientes de las minipreps, las digestiones con enzimas de restricción y los controles, fueron cargadas en el gel utilizando Buffer de carga 6X (NEB, #B7024S). En referencia a los controles, estos consistieron en las construcciones plasmídicas conteniendo los biosensores dirigidos hacia los compartimentos celulares en estudio. Se empleó el marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA LaddeMixTM (Thermo Scientific, #SM0331). La electroforesis se realizó utilizando buffer TAE 0,5X como buffer de corrida en una cuba electroforética Bioer Mini Run (GE-100) a 100 V. La duración de la corrida fue determinada según el tamaño de las muestras y el grado de resolución deseado en el gel. En este caso, el tiempo de corrida determinado fue de 40-45 minutos. La visualización del gel se realizó mediante la obtención de imágenes a partir del software E Gel® Imager System (Thermo Scientific).

3. 2. 9 Cultivo de las células HepG2

3. 2. 9. 1 Descongelado y subcultivo de las células HepG2

Las células HepG2 fueron cultivadas a 37°C y 5% CO_2 en medio DMEM with GlutaMAX™ Supplement (Gibco™) suplementado con 10% v/v de suero fetal bovino (SFB). Las células fueron previamente descongeladas. A continuación, se detalla el protocolo de descongelado para líneas celulares a partir de crioviales almacenados en tanques de nitrógeno líquido. Brevemente, se preparó un tubo falcon conteniendo 9 mL de medio de cultivo suplementado con 10% SFB; éste fue termostatizado a 37°C. El criovial fue retirado del tanque de nitrógeno líquido y se descongeló en un baño termostatizado a 37°C. Una vez que el contenido del criovial estaba en estado líquido, fue agregado al falcon conteniendo el medio completo preparado anteriormente, y se centrifugó a 125 g durante 7 minutos. Posteriormente, se realizó un recuento celular en cámara de Neubauer utilizando azul de tripán 0,4% (Gibco™) para estimar la viabilidad de las células. Finalmente, se transfirieron las células a una botella de cultivo celular T25 y se incubaron hasta su uso.

Posteriormente, se procedió a realizar subcultivos de las células. A modo de resumen, las células se observaron al microscopio para evaluar su confluencia; una vez que el cultivo alcanzó una confluencia de 85-90%, el medio de cultivo fue descartado, y se le agregó 1 mL de dPBS (Gibco™) con el fin de lavar la monocapa celular. Éste paso se realizó 2 veces. Se adicionó 1 mL de Tripsina-EDTA (Gibco™) previamente descongelada y termostatizada a 37°C; las células se incubaron durante 5 minutos a 37°C. Una vez transcurrido este tiempo, se observaron las células al microscopio para verificar que estas se habían despegado correctamente. Luego,

se neutralizó la tripsina al adicionar 2 mL de medio de cultivo completo. Seguidamente, se tomó una alícuota de 20 μL de la suspensión celular, se homogeneizó utilizando 20 μL de azul de tripán, se armó la cámara de Neubauer y se le agregó la muestra para realizar el conteo celular. Se calculó la concentración celular en el cultivo según la ecuación 1, presentada a continuación.

$$[células] = nro.\,de\ células\ promedio\ \times\ 10^4 (mL^{-1})\ \times\ Factor\ de\ Dilución\ (FD)$$

(Ecuación 1)

En este caso, el Factor de Dilución (FD) corresponde a 2, ya que, por el agregado de azul de tripán, la suspensión celular se encuentra diluída al medio.

En base a la concentración celular obtenida, se procedió a centrifugar y resuspender las células en el volumen requerido para alcanzar la concentración deseada en cada ensayo.

3. 2. 9. 2 Transfección transiente de la línea celular HepG2 con los plásmidos dirigidos hacia diferentes compartimentos celulares

Se realizó el protocolo de transfección de la línea celular HepG2 con plásmidos empleando el reactivo Lipofectamina 3000, tal como lo indica el fabricante, Thermo Scientific, de acuerdo a la superficie dónde se sembraron las células. Se procedió de dos formas diferentes según la superficie empleada: (A) la transfección fue realizada en una placa de 6 pocillos conteniendo cubreobjetos de vidrio que sirvieron como soporte para la adhesión de las células en crecimiento, y (B) en placas de vidrio compartimentalizadas “CellView cell culture dish”

(Figura 16). En ambos casos las células fueron analizadas mediante ensayos de microscopía confocal.

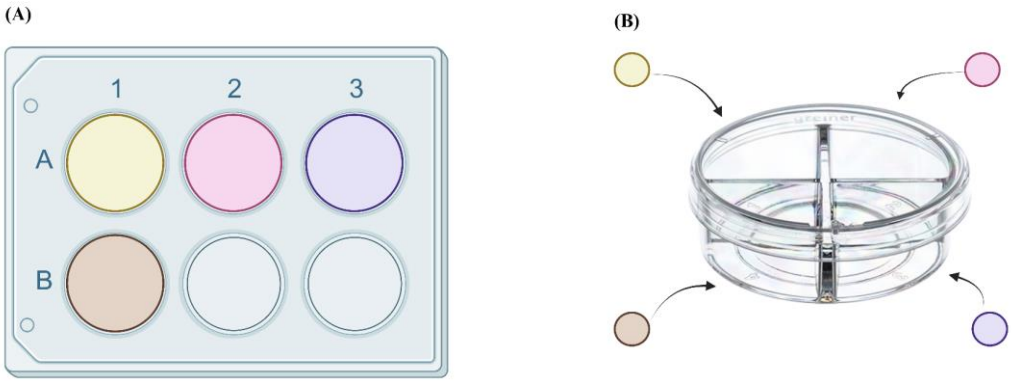

Figura 16. Ilustración correspondiente a las placas de cultivo celular utilizadas para realizar la transfección. **(A)** Placa de cultivo celular de 6 pocillos, sembrada con células HepG2 y las construcciones correspondientes en cada pocillo. **(B)** Placa de vidrio compartimentalizada "CellView cell culture dish". Amarillo: Células transfectadas con PM-PxIII-roGFP2. Rosado: Células transfectadas con M-PxIII-roGFP2. Violeta: Células transfectadas N-PxIII-roGFP2. Marrón: Células transfectadas con C-PxIII-roGFP2.

Con respecto al protocolo seguido para realizar la transfección en la placa de 6 pocillos (A) (Figura 16A), las células a transfectar fueron sembradas en pocillos el día -1 (día previo a la transfección). Para ello, se sumergieron 6 cubreobjetos en un vaso de bohemia conteniendo alcohol 70% y se dejó dentro de la cabina de flujo con la luz UV durante 15 minutos. Luego de transcurrido este tiempo, el exceso de alcohol de los cubreobjetos fue retirado con papel, y con una pinza se transfirieron a los pocillos de la placa; ésta fue dejada sin tapar en la cámara de flujo con la luz UV encendida durante 20 minutos. Una vez culminado este tiempo, se procedió a sembrar el número de células calculado previamente en el recuento celular sobre los cubreobjetos dentro de los pocillos de la placa; en el ensayo realizado se sembraron $1.5x10^5$

células en 4 pocillos. Cada uno de estos pocillos fue utilizado para transfectar una de las construcciones dirigidas a los compartimentos celulares: mitocondria, núcleo, membrana plasmática y citosol.

En cuanto a la transfección realizada en placas de vidrio compartimentalizadas "CellView cell culture dish" (B) (Figura 16B), un día previo a realizar la transfección, las células fueron crecidas. Luego, se procedió a realizar el sembrado de $1.5x10^5$ células en cada uno de los 4 compartimentos presentes en la placa; cada uno de estos contenía una de las construcciones dirigidas hacia las regiones subcelulares de interés.

Al día siguiente de plaquear las células, éstas fueron observadas al microscopio para evaluar si las mismas se encontraban entre 75-80% de confluencia al momento de ser transfectadas. Se prepararon 2 tubos eppendorf conteniendo el tubo 1: 3.75 µL del reactivo Lipofectamina 3000 y 125 µL de medio Opti-MEM, y 5 µL del reactivo P3000, 125 µL de Opti-MEM, y ADN en el tubo 2. Se agregó el contenido del tubo 2 en el tubo 1, se mezcló y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente se agregó el contenido total del tubo resultante en las células dentro de los pocillos o compartimentos correspondientes. Ésto se realizó con cada uno de los plásmidos conteniendo los biosensores; 4 horas luego de realizada la transfección se retiró la solución de transfección de las células y se añadieron 500 µL de medio de cultivo completo. A las 24 h post-transfección se les hizo un cambio de medio, y finalmente, transcurridas las 48 horas, las células fueron analizadas mediante microscopía confocal.

3. 3 Ensayos de localización y co-localización de los biosensores en la línea celular HepG2

Se realizaron dos ensayos, uno con células fijadas y otro con células vivas. En cuanto al experimento con células fijadas, como se detalla en la sección 3. 2. 9. 2, primero se prepararon las células HepG2. Luego se procedió a sembrar 1.5 x 10^5 células/pocillo en una placa de 6 pocillos conteniendo cubreobjetos de vidrio, y a las 24 h se realizó el procedimiento de transfección celular. Al cabo de las 48 horas post-transfección, se agregaron los marcadores específicos para las regiones en estudio: membrana plasmática y mitocondria. Para ello, se siguió el protocolo de montaje de preparados presentado a continuación. En primer lugar, se retiró el medio de cultivo de las placas y se lavó 3 veces con 1mL de PBS 1X. Luego, se fijaron las células con paraformaldehído 4% durante 15 minutos. Se realizaron posteriormente 3 lavados con PBS 1X y con una pinza se colocó un cubreobjetos sobre un portaobjetos; este último ya poseía medio de montaje con DAPI incorporado. Se secó el exceso de medio de montaje, se presionó con papel absorbente sobre el cubreobjetos y al día siguiente, se sellaron los preparados con esmalte de uñas. Una vez culminado este procedimiento, se procedió a visualizar las muestras mediante microscopía.

En cuanto al protocolo realizado con células vivas, se realizaron adquisiciones sobre habitáculo termostatizado a 37°C. Previo a realizar los experimentos, las células fueron mantenidas en incubadora a 37°C y 5% CO_2. Para realizar las adquisiciones, se retiró y descartó el medio de cultivo presente en las placas, y se agregó buffer HEPES. Luego, se procedió a visualizar las células utilizando el microscopio confocal, como se detalla más adelante en la sección 3. 5.

3. 4 Ensayos de funcionalidad de los biosensores en la línea celular HepG2 con diferentes peróxidos

Se realizaron adquisiciones sobre habitáculo termostatizado a 37°C y 5% CO_2 y agregando COOH y H_2O_2 como estímulos de la oxidación celular. Previo a realizar los experimentos, las células fueron mantenidas en incubadora a 37°C y 5% CO_2. Para realizar las adquisiciones, se retiró y descartó el medio de cultivo presente en las placas, y se lavaron las placas con PBS. Luego del lavado, el PBS fue retirado y se agregó el buffer correspondiente para realizar el ensayo. Se emplearon 2 buffers para estos experimentos: HBSS y HEPES. En ambos casos, luego de agregar el buffer, se procedió a visualizar las células utilizando el microscopio confocal. Posteriormente, se procedió a estudiar el efecto de los peróxidos seleccionados en las células. Para ello se incubaron las muestras, conteniendo 1.5 x 10^5 células/pocillo, con 50 uM de H_2O_2, y 50 uM de COOH durante 15 minutos;

Cabe destacar que cuando se utilizó el buffer HEPES no se inyectó CO_2.

3. 5 Microscopía

3. 5. 1 Microscopía de epifluorescencia

Las células transfectadas se visualizaron 24 horas post transfección mediante un microscopio invertido Olympus IX81 conteniendo una cámara monocromática (Hamamatsu ORCA ER) con lente objetivo de inmersión en aceite. Para obtener información sobre la morfología general de

las células se utilizó campo claro. Además, para corroborar la marca del sensor se utilizó el filtro FITC.

3. 5. 2 Microscopía confocal

Se observaron las células transfectadas mediante un microscopio de epifluorescencia invertido Axio Observer 7 acoplado a módulo confocal LSM 880, con lente objetivo de inmersión en aceite 63X.

En el ensayo realizado para evaluar la localización y co-localización de los sensores en la línea celular se utilizaron dos metodologías; Por un lado, las células se incubaron con marcadores específicos para las regiones en estudio, siendo las mismas fijadas previamente; estos marcadores presentan espectros de emisión corridos al rojo. Se utilizaron los marcadores MitoTracker™ Red FM (Invitrogen) y CellMask™ Deep Red Plasma Membrane Stain (Invitrogen) para evaluar la co-localización 48 horas post transfección. La dilución de trabajo utilizada para ambos marcadores fue de 1/300. Para visualizar los marcadores mencionados se utilizaron las siguientes longitudes de onda, $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ de 561 nm/597 para MitoTracker, y $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ de 663 nm/665 nm para CellMask. En la sección 3.3, se detalla el procedimiento realizado para llevar a cabo esta metodología.

Por otro lado, se realizaron ensayos de imagenología con células vivas para evaluar la localización y co-localización de los biosensores. En este caso también se utilizaron los marcadores MitoTracker™ Red FM (Invitrogen) y CellMask™ Deep Red Plasma Membrane Stain (Invitrogen), 48 horas post transfección. Además, se utilizó el marcador Wheat Germ

Agglutinin, WGA-1 (Invitrogen™) para membranas plasmáticas. La dilución de trabajo utilizada para ambos marcadores fue de 1/300. En ambas metodologías se configuraron los settings para determinar la señal de los marcadores utilizados; cabe destacar que el marcador dirigido a núcleo, DAPI, estaba incluido en el medio de montaje *Fluoroshield*™. Para visualizar los marcadores se utilizaron las siguientes longitudes de onda, $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ de 561 nm/630 para WGA-1, y $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ de 405 nm/460 nm para DAPI.

En cuanto al ensayo realizado para evaluar la funcionalidad de los biosensores, las adquisiciones se realizaron sobre habitáculo termostatizado a 37°C y 5% CO_2, agregando 50 μM de COOH y H_2O_2 como estímulo de la oxidación. Adicionalmente se realizaron imágenes de las muestras sin estímulo. En estos ensayos se empleó una relación $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ de 405 nm/510 nm para detectar la forma oxidada del biosensor, y una relación $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ de 488 nm/510 nm para detectar la forma reducida del mismo.
Con el propósito de optimizar la obtención de imágenes se realizaron adquisiciones en ausencia de CO_2, además de variar otras condiciones en el ensayo detalladas en la sección 3.2.5.

Las imágenes se capturaron a diferentes tiempos en el segundo ensayo, y distintos niveles de profundidad (planos Z) en el ensayo de co-localización. A su vez, se registraron imágenes de campo claro con el objetivo de adquirir información sobre la morfología general de las células en estudio. Las imágenes obtenidas se analizaron con el software Zen 2.3 SP1 (ZEISS ZEN Microscopy Software).

3. 6 Programas computacionales

3. 6. 1 Procesamiento de datos e imágenes

Las imágenes obtenidas por microscopía confocal para los ensayos de funcionalidad de los biosensores en la línea celular de trabajo se analizaron mediante el programa Image J. Además, para procesar las imágenes obtenidas se utilizó el programa denominado Macro GP. Éste automatizó el cálculo de polarización generalizada (GP) de las imágenes tomadas durante el tiempo del experimento. Se calculó este parámetro según la ecuación 2, descrita a continuación.

$$GP = \frac{I\ 488_{nm} - I\ 405_{nm}}{(I\ 488_{nm} + I\ 405_{nm})}$$

(Ecuación 2)

4. Resultados y Discusión

4. 1. Obtención y caracterización de construcciones de plásmidos con biosensor de LOOHs dirigido a membrana plasmática, mitocondria y núcleo celular

Con el objetivo de amplificar el plásmido de interés, se transforman bacterias *E.coli* DH5-α quimio y electrocompetentes, tal como se describe en la sección 3. 2. 4 de Metodología. La transformación comprende el proceso por el cual se introduce ADN exógeno dentro de una célula bacteriana. La elección de la cepa DH5-α, está relacionada con su capacidad de almacenamiento y replicación, ambas características esenciales para realizar una transformación eficiente de nuestros plásmidos (59).

A modo de resumen, las bacterias *E.coli* DH5-α son transformadas con 0.288 μg de ADNp de la construcción dirigida hacia la membrana plasmática, 0.315 μg de ADNp de la construcción dirigida a núcleo, y 0.488 μg de ADNp dirigido hacia mitocondrias, por electroporación, en caso de las células electrocompetentes, y mediante shock térmico, para las células quimiocompetentes. Se seleccionan mediante resistencia colonias aisladas resultado de la transformación; se espera que las colonias supervivientes y, por ende, resistentes a ampicilina, contengan adicionalmente los plásmidos de interés. Para ello, las bacterias transformadas se crecieron en medio LB, se plaquearon y se realizó la purificación plasmídica de las mismas con el fin de confirmar la presencia del plásmido. Posteriormente, se procede a la amplificación de los plásmidos para obtener cantidades suficientes del ADN para su posterior uso. Cabe destacar que, con el objetivo de obtener la cantidad de ADN de cada construcción requerida para continuar con el proyecto, se ensayaron diferentes protocolos de extracción de ADN a partir de

3 kits comerciales distintos. Los resultados presentes en la Tabla 11 corresponden a la concentración de los plásmidos obtenidos en cada triplicado utilizando el kit comercial ZR Plasmid Miniprep. Mediante este kit se obtuvieron los mejores resultados en cuanto a la concentración de ADNp, además de presentar los valores de relaciones 260 nm/230 nm y 260 nm/280 nm más elevados.

Tabla 11 - Cuantificación del ADNp extraído mediante ZR Plasmid Miniprep

Muestras	**Concentración [ng/µL]**	**260/280**	**260/230**
M-PxIII-ro-GFP2 (quimiocompetentes)	827.9	1.830	2.243
	352.6	1.786	2.184
	437.8	1.788	2.206
PM-PxIII-roGFP2 (electrocompetentes)	895.0	1.839	2.245
	31.6*	1.819	1.845
	37.5*	1.780	1.696
N-PxIII-roGFP2 (quimiocompetentes)	81.3*	1.774	1.731
	78.3*	1.835	1.619
	123.1*	1.748	2.063

* Estas muestras no fueron utilizadas en ensayos posteriores debido a la baja concentración de ADN obtenida; adicionalmente, los valores obtenidos en las relaciones 260 nm/230 nm y 260 nm/280 nm fueron bajos.

Es importante destacar que, a pesar de que se realizaron las transformaciones de C-PxIII-roGFP2, biosensor con expresión citosólica, en las células DH5-α, la extracción de ADNp realizada posteriormente presentó niveles de concentración de ADN muy por debajo de lo esperado; lo mismo sucedió con respecto a la construcción dirigida hacia el núcleo, N-PxIII-roGFP2, por lo que en ambos casos se decidió utilizar el stock de ADNp de estos sensores para continuar con el trabajo. Por otro lado, debido a que el biosensor C-PxIII-roGFP2 fue validado en estudios previos realizados por Oddone y colaboradores (resultados no publicados), no se realizó el ensayo de restricción para esta construcción.

A partir de las concentraciones obtenidas, se calcula la cantidad de ADNp presente en cada caso. Para cada construcción se obtienen más de 6 μg de ADN para ser utilizados posteriormente en los experimentos de transfección.

Por otro lado, con el fin de confirmar la presencia de los insertos de interés en cada una de las construcciones amplificadas, se procede a realizar un ensayo de restricción, tal como se detalla en la sección 3. 2. 7 de Metodología. Con respecto a esto, se esperaban obtener bandas de alrededor de 1.3 a 1.6 kb para cada caso, es decir, para M-PxIII-roGFP2, PM-PxIII-roGFP2 y N-PxIII-roGFP2. A continuación se presentan las Figuras 17 y 18, dónde se observan los plásmidos y las digestiones.

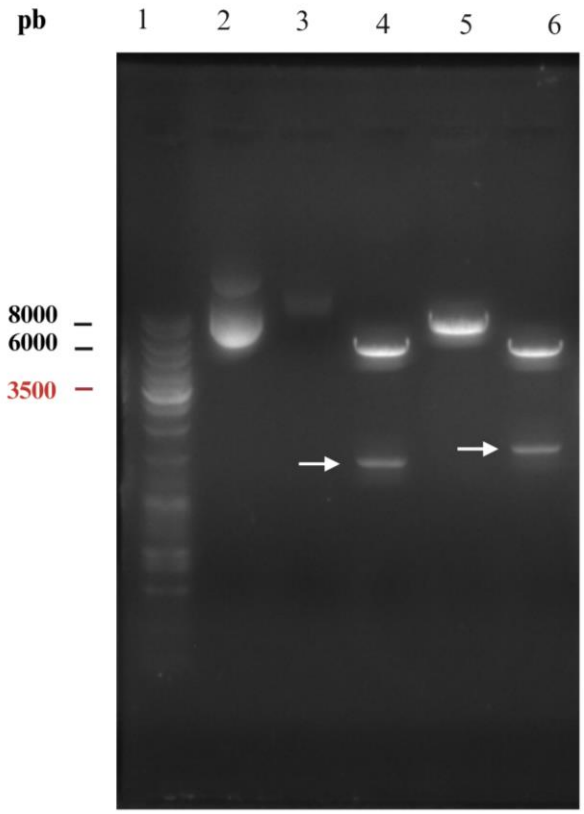

Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa de los plásmidos sin digerir y digeridos. La digestión se realiza con las enzimas NheI (Thermo Fisher) y BamHI (Thermo Fisher) para el caso de los plásmidos dirigidos hacia mitocondria y la membrana plasmática, y las enzimas NheI (Thermo Fisher) y XbaI (BioLabs) para el plásmido dirigido hacia el núcleo. Carril 1: Marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder Mix™ (Thermo Scientific, #SM0331). Carriles 2: plásmido pcDNA3.1 Zeo (+) con el biosensor M-PxIII-roGFP2 sin digerir. Carril 3: control de Membrana Plasmática. Carriles 4-6: plásmidos digeridos correspondientes a N-PxIII-roGFP2, M-PxIII-roGFP2 y PM-PxIII-roGFP2 respectivamente.

Analizando el gel se puede observar en el carril 2 la presencia de un patrón de bandas entre las 6000 y 8000 pb (Figura 17). Este corresponde al producto de purificación, plásmido dirigido hacia la mitocondria, y en el carril 3, una banda posicionada alrededor de la misma posición la cual pertenece al control de Mitocondria. Esto es consistente con lo esperado ya que, el vector presenta unos 4987 pares de bases, que, junto con el inserto, de aproximadamente 1500 pb,

suman unas 6487 pb totales. En los carriles 4, 5 y 6, se presentan los productos de la digestión enzimática. En los carriles 4 y 6 se observan dos fragmentos, una banda correspondiente al tamaño de los insertos (alrededor de 1300 a 1700 pb) y otro correspondiente con el tamaño de los plásmidos vacíos pcDNA3.1 Zeo (+) (4800 a 5200 pb aproximadamente). Esto confirma la presencia de los insertos en el ADN plasmídico obtenido a partir de las minipreps realizadas.

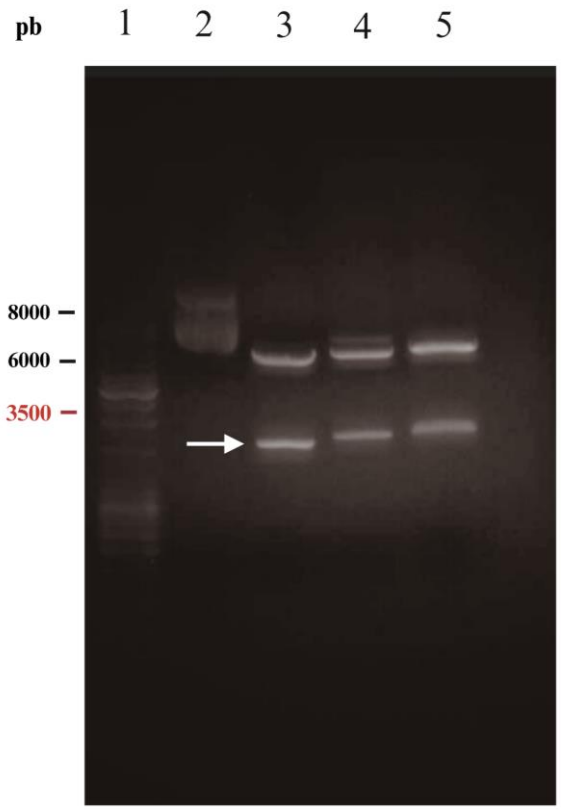

Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa del plásmido conteniendo el biosensor M-PxIII-roGFP2 sin digerir y digerido. La digestión se realiza con las enzimas NheI (Thermo Fisher) y PstI (Thermo Fisher), NheI (Thermo Fisher) y EcoRV (Thermo Fisher), y NheI (Thermo Fisher) y BamHI (Thermo Fisher). Carril 1: Marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder Mix™ (Thermo Scientific, #SM0331). Carril 2: control de Membrana Plasmática. Carriles 3-5: plásmido conteniendo el biosensor M-PxIII-roGFP2 digerido con diferentes pares enzimáticos.

En cuanto a la construcción M-PxIII-roGFP2, dirigida hacia la mitocondria, inicialmente se probó realizar la digestión con un único par de enzimas de restricción, en particular HindIII y BamHI. Dado que el plásmido conteniendo la secuencia del biosensor M-PxIII-roGFP2 carece del sitio de restricción para la enzima HindIII, se probó realizar 3 digestiones adicionales con los pares NheI-BamHI, NheI-PstI y NheI-EcoRV. Con respecto al gel correspondiente a estas digestiones, en el carril 2 se visualiza la presencia de un tenue patrón de bandas entre los 8000 a 6000 pares de base (Figura 18). El mismo corresponde al control de membrana plasmática. Esto es consistente con lo esperado, ya que el vector presenta unos 4999 pares de bases, que junto con el inserto, de aproximadamente 1500 pb, suman unas 6643 pb totales. En los carriles 3, 4 y 5, se presentan los productos de la digestión enzimática realizada con las enzimas NheI (Thermo Fisher) y BamHI (Thermo Fisher), NheI (Thermo Fisher) y PstI (Thermo Fisher), y NheI (Thermo Fisher) y EcoRV (Thermo Fisher), respectivamente. En los carriles 3, 4 y 5 se observan dos fragmentos, una banda correspondiente al tamaño de los insertos (alrededor de 1300 a 1700 pb) y otro correspondiente con el tamaño de los plásmidos vacíos pcDNA3.1 Zeo (+) (4800 a 5200 pb aproximadamente). Esto confirma la presencia del inserto en el ADN plasmídico obtenido a partir de las minipreps realizadas.

Estos resultados permiten confirmar que la transformación de la cepa DH5-α con los plásmidos conteniendo las variantes de biosensor PxIII-roGFP2 en estudio se realizó de forma exitosa mediante shock térmico y electroporación.

4. 2 Transfecciones transientes de la línea celular HepG2 con construcciones en pcDNA3.1 del sensor sitio-específicas.

4. 2. 1 Evaluación de la transfección y expresión de los biosensores

Con el propósito de evaluar la transfección y expresión de las distintas formas biosensor PxIII-roGFP2 en la línea celular HepG2, se observaron las células transfectadas al microscopio de epifluorescencia 24 h post-transfección. De esta forma, se analizaron los patrones de fluorescencia exhibidos por las células transfectadas en estudio. Los resultados obtenidos revelaron patrones de fluorescencia que podrían ser coincidentes con los compartimentos celulares a los que estaban destinados los sensores (Figura 19). Esto sugiere que el biosensor PxIII-roGFP2 se está expresando en los compartimentos celulares para los cuales éste fue diseñado, membrana plasmática, mitocondria y núcleo.

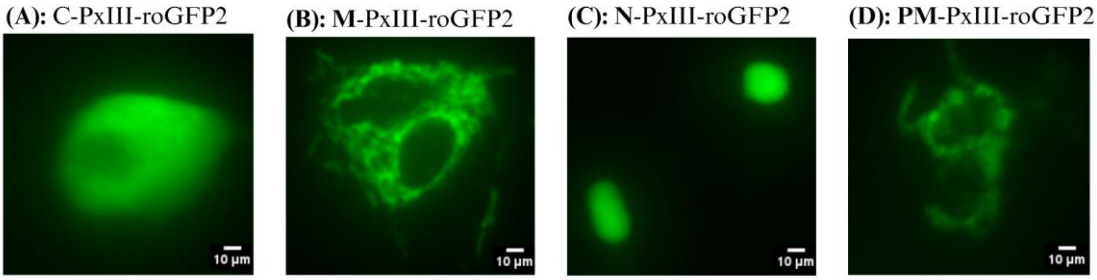

Figura 19. Células HepG2 transfectadas con las construcciones PxIII-roGFP2 observadas al microscopio de epifluorescencia, magnificación 20X. Escala: 10 μm. **(A):** célula HepG2 transfectada con C-PxIII-roGFP2. **(B):** célula HepG2 transfectada con M-PxIII-roGFP2. **(C):** célula HepG2 transfectada con N-PxIII-roGFP2. **(D):** célula HepG2 transfectada con PM-PxIII-roGFP2.

En el caso del biosensor diseñado para dirigirse hacia el núcleo (figura 19C), se observa una única marca en la célula correspondiente al tamaño y a la forma de un núcleo celular, por lo que, para esta construcción, se puede afirmar que el biosensor N-PxIII-roGFP2 se encuentra efectivamente en la región sub-celular de destino.

4. 3 Evaluación de la expresión del biosensor en distintas regiones sub-celulares en las células transfectadas

Con el fin de evaluar la expresión del biosensor PxIII-roGFP2 en las regiones sub- celulares de estudio, membrana plasmática, mitocondria y núcleo celular, se utilizaron dos metodologías: fijación de las células e imagenología de células vivas. En un principio, se pensó resolver este objetivo utilizando únicamente la fijación de las células conteniendo las construcciones, sin embargo, en el transcurso de este ensayo se identificó que ciertos marcadores, en particular MitoTracker™ Red FM (Invitrogen), se visualiza mejor en células vivas que en células fijadas. Es por ello que se procedió a realizar un segundo ensayo con este marcador, utilizando células vivas; A su vez, se probó el uso de Wheat Germ Agglutinin, WGA-1 (Invitrogen™), como marcador de membrana plasmática mediante el uso de imagenología de células vivas. Para llevar a cabo ambos ensayos, las células HepG2 fueron transfectadas 48 horas antes como se describe en la sección 3. 2. 9. 2.

Como se describe en la sección 4. 2. 2, las células HepG2 transfectadas fueron visualizadas 24 horas post-transfección para evaluar la expresión de los biosensores en estudio. Una vez confirmada la expresión de estos, se continúo con la evaluación de la localización de estos en los compartimentos de interés. Para ello, se observaron las células HepG2 al microscopio

confocal 48 horas post-transfección. En cuanto al ensayo de fijación celular, las células debieron de ser fijadas previo a ser llevadas al microscopio confocal; este procedimiento se encuentra detallado en la sección 3. 4.

Con respecto al biosensor PM-PxIII-roGFP2, diseñado para ser dirigido a membrana plasmática, su expresión fue evaluada tanto por imagenología de células vivas, como por la fijación celular. Haciendo referencia a ésta última, como se puede observar en la figura 20, las células transfectadas con el biosensor presentan patrones de fluorescencia similares a los esperados de acuerdo con el marcador utilizado, CellMask^{TM} Deep Red Stain. Éste se puede utilizar para tinción de la membrana plasmática en células vivas y fijadas de mamíferos, como es el caso de HepG2, siendo ideal para estudios de translocación y dinámica de la membrana plasmática, así como para la identificación celular en imágenes. En este caso, su uso está relacionado con la identificación celular, permitiendo delimitar las células entre sí, además de poder visualizar si las células presentan una morfología adecuada (60). En la figura 20 se puede apreciar la distribución de CellMask; en este caso, se observa que la misma es difusa, distribuyéndose de manera dispersa en lugar de aparecer como una estructura bien definida. Esto no concuerda con lo descrito según el fabricante, dónde se reporta una tinción homogénea del biosensor para células de mamífero (60). La distribución dada en este trabajo puede deberse a problemas de manipulación cuando se realizó la incubación con dicho marcador, o a problemas en el proceso de fijación. También puede estar atribuido a la concentración utilizada del marcador. A pesar de esto, si se pudo ver delimitación celular en las células de estudio (figura 20), y, en cuanto a la marca del biosensor PM-PxIII-roGFP2, esta se visualiza bordeando la membrana plasmática, sugiriendo la localización del biosensor en la región subcelular destino. Cabe destacar que la secuencia señalizadora utilizada para el diseño del biosensor PM-PxIII-roGFP2 corresponde a un fragmento de 78 aminoácidos (del aminoácido 75 al 153) de la

secuencia peptídica de la proteína transmembrana AKAP-79, proteína perteneciente al conjunto de proteínas de anclaje de la A-quinasa, la cual tiene como función principal el anclaje de proteínas a la membrana plasmática y otras estructuras intracelulares; puede que la marca dada por CellMask sea inespecífica en cuanto a la secuencia señalizadora utilizada, y por ende, la marca del biosensor y el marcador en cuestión sean distintas entre sí. Esto podría explicar la razón por la cual no se observa la co-localización entre el sensor de localización en membrana y CellMask.

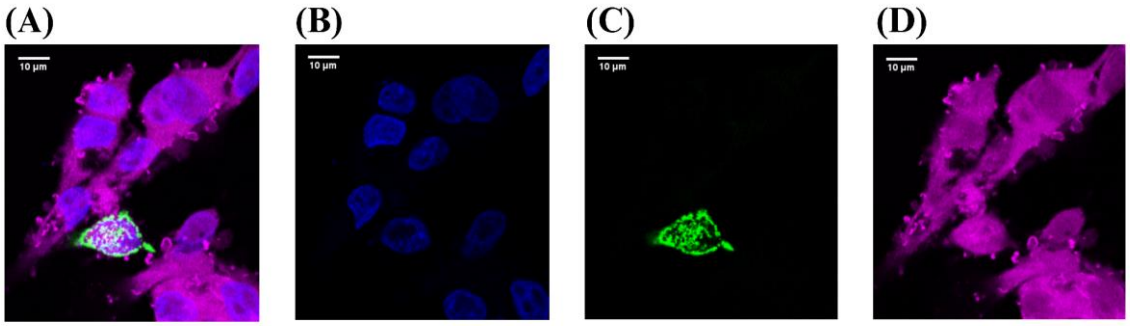

Figura 20. Estudio de la co- localización del biosensor PM-PxIII-roGFP2 con membranas plasmáticas en HepG2 en células fijadas. Imágenes de microscopía confocal de células HepG2 48 h post transfección con el biosensor. Núcleos (azul), membrana plasmática (magenta) y biosensor (verde). (A): Células HepG2 transfectadas, objetivo 40X. (B): visualización de la célula transfectada con el biosensor PM-PxIII-roGFP2 en el canal correspondiente al marcador del núcleo, objetivo 40X. (C): visualización de la célula transfectada con el biosensor PM-PxIII-roGFP2 en el canal del biosensor, objetivo 40X. (D): visualización de la célula transfectada con el biosensor PM-PxIII-roGFP2 en el canal del marcador de membrana plasmática, objetivo 40X.

En cuanto al biosensor M-PxIII-roGFP2, dirigido a mitocondria, se presentaron ciertas limitaciones técnicas durante los experimentos asociadas al uso del marcador de mitocondrias MitoTracker™ Red FM, el cual no fue posible de visualizar. En consecuencia, se decidió

evaluar la localización y co-localización de esta construcción en ensayos con células vivas, dónde finalmente se logró una resolución satisfactoria. La falta de resolución del marcador utilizado podría deberse a varios factores relacionados con la interacción entre el marcador y las mitocondrias. Es posible que la dilución utilizada del marcador, 1 μL de marcador en 300 μL de buffer, no fuera la adecuada para resaltar la señal de manera óptima o que las condiciones experimentales, como el tiempo de incubación hayan influido en la falta de resolución. Luego de leer bibliografía asociada con el uso de MitoTracker Red FM, se encontró que este marcador se aplica únicamente en células vivas debido a que el mismo no es retenido luego del protocolo de fijación (61). En consecuencia, se concluye que la ausencia de visualización del marcador de mitocondrias MitoTracker es debida a la incompatibilidad del mismo con la metodología empleada, es decir, con la fijación celular.

Como se visualiza en la Figura 21, las células HepG2 transfectadas con el biosensor N-PxIII-roGFP2 dirigido hacia el núcleo, tienen los patrones de fluorescencia esperados según el marcador correspondiente, DAPI (62). Esto permite confirmar la expresión del biosensor N-PxIII-roGFP2 en el núcleo.

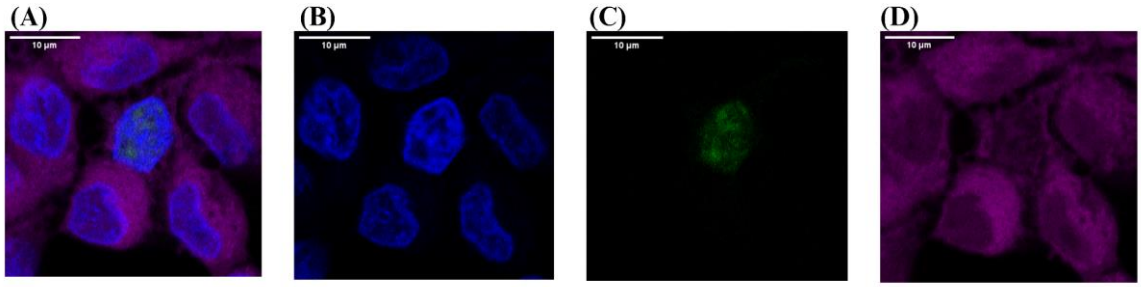

Figura 21. Estudio de la co- localización del biosensor N-PxIII-roGFP2 con el núcleo celular en HepG2 en células fijadas. Imágenes de microscopía confocal de células HepG2 48 h post transfección con el biosensor. Núcleos (azul), membrana plasmática (magenta) y biosensor (verde). (A): Células HepG2 transfectadas, magnificación 95X. (B): visualización de la célula transfectada con el biosensor

N-PxIII-roGFP2 en el canal correspondiente al marcador de núcleo, magnificación 95X. (C): visualización de la célula transfectada con el biosensor N-PxIII-roGFP2 en el canal del biosensor, magnificación 95X. (D): visualización de la célula transfectada con el biosensor N-PxIII-roGFP2 en el canal del marcador de membrana celular, magnificación 95X.

En el caso del biosensor sin péptido señal, C-PxIII-roGFP2, se visualiza una marca de fluorescencia correspondiente con una distribución homogénea en toda la célula, a excepción del núcleo celular (figura 22); esto evidencia la presencia del biosensor en el citosol, y, por lo tanto, se confirma la expresión del biosensor C-PxIII-roGFP2.

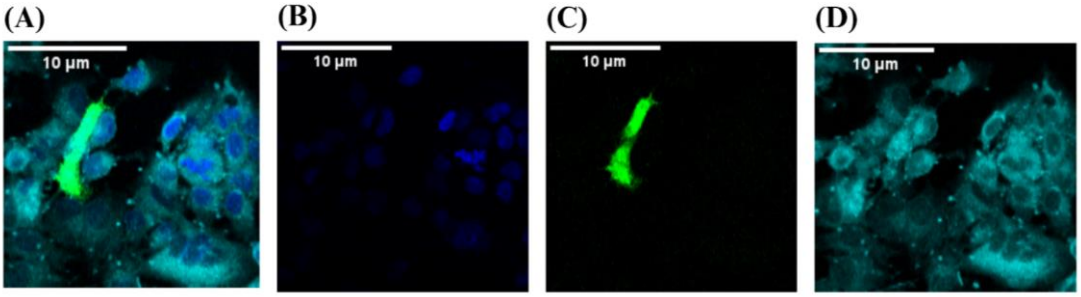

Figura 22. Estudio de la co- localización del biosensor C-PxIII-roGFP2 con el citoplasma en HepG2 en células fijadas. Imágenes de microscopía confocal de células HepG2 48 h post transfección con el biosensor. Núcleos (azul), membrana plasmática (cyan) y biosensor (verde). (A): células HepG2 transfectadas con el biosensor C-PxIII-roGFP2, magnificación 12X. (B): células transfectadas con el biosensor C-PxIII-roGFP2 en el canal correspondiente al núcleo, magnificación 12X. (C): células transfectadas con el biosensor C-PxIII-roGFP2 en el canal del biosensor, magnificación 12X. (D): células transfectadas con el biosensor C-PxIII-roGFP2 en el canal correspondiente al marcador de membrana, magnificación 12X.

Por otro lado, como es mencionado con anterioridad, se llevaron a cabo ensayos de imagenología con células vivas para evaluar la localización y co-localización de los

biosensores, particularmente de M-PxIII-roGFP2 y PM-PxIII-roGFP2, 48 horas después de efectuada la transfección. Siguiendo el protocolo detallado en la sección 3. 4 de Metodología, se emplearon marcadores específicos, MitoTracker™ Red FM (Invitrogen) para las mitocondrias y Wheat Germ Agglutinin, WGA-1 (Invitrogen™), para la membrana plasmática. Además, como en el ensayo con células fijadas, el marcador nuclear DAPI está incluido en el medio de montaje *Fluoroshield*™, permitiendo la identificación de los núcleos.

En busca de una mayor calidad en las imágenes obtenidas, se optó por utilizar el marcador WGA-1 como indicador de la membrana plasmática. Este marcador mejoró la resolución de las imágenes, como se ilustra en la figura 23. En este caso en particular, la marca del biosensor no corresponde en su totalidad a la marca dada por el marcador de la membrana plasmática. Esto podría deberse a que WGA-1 y el biosensor en cuestión, PM-PxIII-roGFP2, se localizan en diferentes regiones de la membrana plasmática; WGA-1 se une específicamente a glicoproteínas y glicolípidos en la superficie celular, compuestos que se encuentran normalmente en la cara externa de la bicapa lipídica (63), mientras que el péptido que dirige el biosensor a la membrana lo dispone en la cara interna de la misma. A pesar de esto, la distribución de la marca del biosensor en cuestión se encuentra rodeando las células; esto sugiere que el biosensor está en el compartimento destino: membrana plasmática (64). En futuros experimentos, podría utilizarse un marcador más idóneo, que permita marcar de forma específica la región interna de la membrana plasmática, zona donde se estaría expresando el biosensor en cuestión.

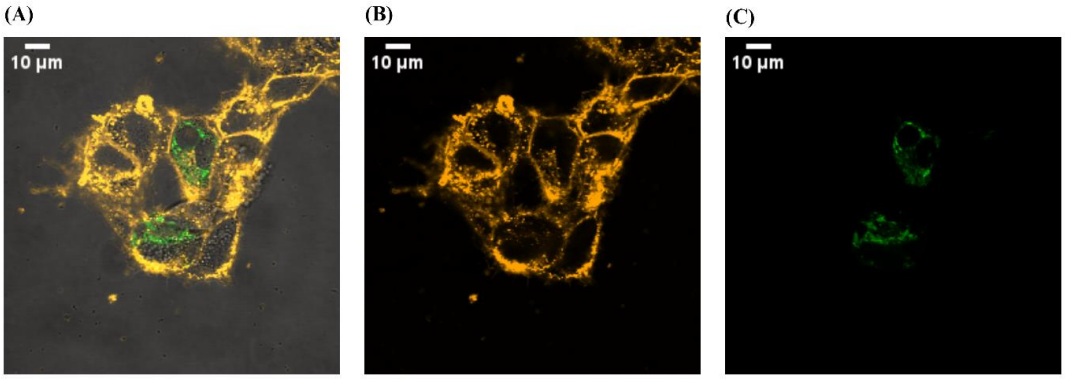

Figura 23. Estudio de la co-localización del biosensor PM-PxIII-roGFP2 con membrana plasmática en HepG2 mediante imagenología de células vivas. Imágenes de microscopía confocal de células HepG2 48 h post transfección con el biosensor. Membrana plasmática (amarillo) y biosensor (verde). (A): visualización de células HepG2 transfectadas con el biosensor PM-PxIII-roGFP2. (B): visualización de células transfectadas con el biosensor PM-PxIII-roGFP2 en el canal correspondiente al marcador de membrana. (C): visualización de las células transfectadas con el biosensor PM-PxIII-roGFP2 en el canal correspondiente al biosensor.

En relación con el biosensor M-PxIII-roGFP2 dirigido a la mitocondria, como se mencionó anteriormente, debido a que no fue posible visualizar el marcador MitoTracker Red FM mediante el uso de células fijada, se procedió a realizar un ensayo con células vivas 48 horas post-transfección. Para ello, se siguió el protocolo detallado en la sección 3. 4 de Metodología. Como se observa en la figura 24, las células transfectadas con el biosensor presentan un patrón de fluorescencia concordante con lo esperado según el marcador mitocondrial utilizado (61). Cabe destacar, que esta imagen se obtuvo aplicando la función ZetaStack, por lo que se puede confirmar que la marca del biosensor está en la mitocondria; Esto indica que el biosensor M-PxIII-roGFP2 se está expresando en el compartimento celular para el cual fue diseñado.

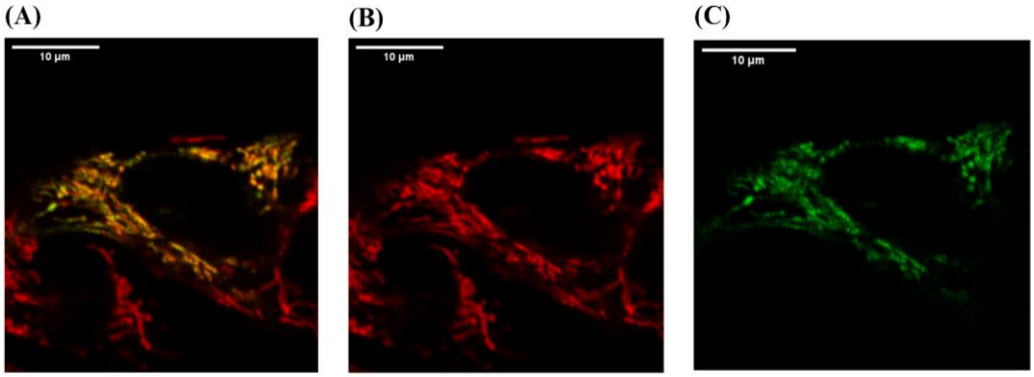

Figura 24. Estudio de la co-localización del biosensor M-PxIII-roGFP2 con mitocondria en HepG2 mediante imagenología de células vivas. Imágenes de microscopía confocal de células HepG2 48 h post transfección con el biosensor. Mitocondria (rojo) y biosensor (verde). (A): Células HepG2 transfectadas con el biosensor M-PxIII-roGFP2. (B): visualización de la célula transfectada con el biosensor M-PxIII-roGFP2 en el canal correspondiente al marcador de mitocondria. (C): visualización de la célula transfectada con el biosensor M-PxIII-roGFP2 en el canal del biosensor.

El análisis realizado mediante estas dos técnicas permite evaluar de forma cualitativa la expresión subcelular del biosensor PxIII-roGFP2 en diferentes compartimentos celulares. Esto proporciona una comprensión inicial de su localización y funcionalidad. Se observó, en todos los casos, que los patrones de fluorescencia de las células HepG2 transfectadas coincidían con los compartimentos celulares a los cuales el sensor estaba dirigido, es decir, la membrana plasmática, la mitocondria y el núcleo celular. Esto respalda la expresión efectiva del biosensor en su destino previsto.

Es importante destacar que, aunque estos experimentos se llevaron a cabo con líneas celulares transfectadas de manera transitoria, los resultados obtenidos en este estudio sientan las bases para investigaciones futuras con líneas celulares estables que expresen estos biosensores.

Se destaca además que, los marcadores se utilizaron una sola vez con el propósito de confirmar la localización de las diferentes variedades del biosensor. Posteriormente, se realizaron numerosas repeticiones de los ensayos, en cada una de las cuales se observaron patrones de fluorescencia consistentes y concordantes con los resultados previos. Esto permitió diferenciar las distintas variantes del biosensor.

4. 4 Análisis de la respuesta de los biosensores de LOOHs en la línea celular HepG2

4. 4. 1 Puesta a punto de las condiciones del ensayo para analizar la respuesta de los biosensores frente a estímulos

Con el objetivo de mejorar las condiciones del ensayo para evaluar la respuesta de los biosensores ante estímulos oxidantes, se realizaron ajustes en dos aspectos fundamentales: el tipo de buffer utilizado y la presencia de CO_2. Ambos factores resultan críticos para mantener las células en su estado óptimo durante la adquisición de las imágenes.

Inicialmente, se realizaron ensayos empleando el buffer HBSS (Solución Salina Equilibrada de Hank), con el agregado de 0.45 g/L de glucosa y 0.30 g/L de glutamina, junto con la presencia de 5% de CO_2. Aunque estas condiciones permitieron la visualización de las células y el estudio de la respuesta de los biosensores tras la exposición a diferentes moléculas oxidativas, se observó que las células eran más susceptibles a la muerte celular, incluso en ausencia de estímulos oxidantes; esto sugiere que las células estaban estresadas. Además, se notó que el medio de cultivo se volvió de color violeta en el transcurso del estudio; el medio de cultivo presenta como componente rojo fenol, este es un reactivo indicador de pH. El cambio del medio

hacia el violeta sugiere que el medio se encuentra en condiciones alcalinas, lo cual puede dar lugar al estrés celular. Posteriormente, al retirar el medio y agregar el buffer a las células para ser observadas al microscopio, se observaron anomalías en la morfología celular.

Para abordar esta problemática, se modificaron las condiciones del ensayo. Se evaluaron las siguientes condiciones: el uso del buffer HEPES, con el agregado 0.19 g/L de glucosa y 0.19 g/L de glutamina, recomendado para la microscopía de células vivas, y la ausencia de CO_2. Este buffer es recomendado para su uso en imagenología de células vivas debido a su capacidad para mantener el pH del medio de cultivo independientemente de la concentración de CO_2, gracias a la presencia de componentes químicos específicos en el buffer (65-67). HEPES (ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]etanosulfónico) es un buffer orgánico que contiene grupos amino y etilo, los cuales permiten la regulación del pH al aceptar o liberar protones según sea necesario, manteniendo así el pH del medio en un rango adecuado para el crecimiento celular. Esta capacidad de ajuste del pH independientemente de la concentración de CO_2 es fundamental en situaciones donde el suministro de CO_2 es irregular o no controlable, evitando cambios bruscos en el pH del medio de cultivo que podrían dañar las células durante la observación en tiempo real en el microscopio. A su vez, el HEPES proporciona flexibilidad al permitir la observación de células en su medio de crecimiento normal en el microscopio, sin necesidad de controlar la concentración de CO_2 en la platina, lo que facilita la manipulación experimental al prevenir fluctuaciones en el pH al realizar cambios en el medio de cultivo o agregar compuestos, como es el caso de los ensayos presentes en la siguiente sección (65-67).

En el primer experimento utilizando este buffer, debido a un error en la concentración final del buffer y una densidad celular inicial baja, junto con una muerte celular parcial relacionada con el proceso de transfección, las células se vieron significativamente afectadas. Esto se evidenció

en la morfología celular, en la coloración del medio de cultivo y en el estado redox del biosensor incluso sin la adición de estímulos, lo que indicaba un estado de estrés celular.

En un segundo experimento, se corrigió la concentración del buffer y se mantuvieron las células en la incubadora el tiempo máximo posible, extrayendo las placas sólo cuando se iban a observar al microscopio. Estas condiciones mejoradas permitieron observar una mejora significativa en el cultivo celular, evidenciada en la morfología celular y en la viabilidad celular al momento del estudio. Además, las células mostraron una mayor resistencia a las condiciones de oxidación sin que su morfología se viera comprometida significativamente, y se observó un patrón de oxidación del biosensor coherente con lo esperado.

En estos ensayos, además de haber probado que las distintas versiones del biosensor PxIII-roGFP2 es funcional, se fijaron los tiempos en los cuales las células transfectadas transitoriamente con los mismos pueden ser mantenidas en un entorno estable y adecuado para la imagenología de células vivas. Al realizar los ensayos con el buffer HBSS y presencia de CO_2, se observó que pasadas la hora y media aproximadamente de estar analizando las muestras en el microscopio confocal en el microambiente dado, la morfología de las células se veía afectada, y el biosensor presente en algunas de estas comenzaba a perder su fluorescencia. A su vez, se observaba un viraje del color del medio de cultivo al violeta, concordante con cambios en el pH que pudieron haber afectado las células, dando a lugar a la muerte de estas. Por otro lado, cuando los ensayos fueron realizados con el buffer HEPES y en ausencia de CO_2, las células podían mantenerse en buen estado durante un período de alrededor de dos horas o dos horas y media. Por esta razón, se decidió proceder con el buffer HEPES y en ausencia de CO_2 para realizar los demás experimentos.

4. 4. 2 Respuesta de los biosensores frente a moléculas oxidantes

Para evaluar la respuesta del biosensor a moléculas oxidantes y su capacidad para detectar lipoperóxidos, se expusieron las células transfectadas con los biosensores a dos moléculas oxidantes, H_2O_2 y COOH, ambas a una concentración de 50 µM durante 15 minutos. También se realizaron adquisiciones de 15 minutos sin estímulos para determinar el estado redox inicial del biosensor y de las células.

La respuesta del sensor a estos estímulos se evaluó utilizando la fórmula de GP, que relaciona las intensidades de fluorescencia medidas a 405 nm y 488 nm. Esta ecuación proporciona valores de GPs en una escala de -1 a 1. La variación en el valor de GP se traduce en cambios cromáticos que permiten visualizar de manera sencilla el estado redox del biosensor. En este contexto, un valor de GP más positivo, es decir, más cercano a 1, indica que el sensor está más reducido, lo que se refleja en tonalidades azules en las imágenes de GP. Por otro lado, valores de GP más negativos, es decir, más cercanos a -1, indican que el sensor está más oxidado y se reflejan en tonalidades rojas en las imágenes asociadas a estos valores.

En cuanto a la variante del biosensor sin péptido señal, C-PxIII-roGFP2, cuando se fue a realizar la medición en ausencia de estímulos oxidativos habían transcurrido más de 2 horas y media desde que se comenzó la toma de imágenes al microscopio; esto resultó en una afectación significativa de las células en este entorno, causando una disminución en la fluorescencia del biosensor en cuestión. Debido a estas condiciones adversas, los resultados obtenidos se consideran no representativos y, en caso de continuar con la línea de investigación, sería de suma importancia repetir este ensayo, ya que, evaluar el comportamiento del biosensor en condiciones normales permite establecer su estado basal, determinar su especificidad para

LOOHs, analizar posibles efectos de la auto-fluorescencia celular y comprobar la viabilidad celular antes de la exposición a estímulos oxidantes.

Por otro lado, al analizar el biosensor C-PxIII-roGFP2 en presencia de 50 μM COOH, se observó una variación a nivel de los valores de GP, los cuales tienden a valores negativos; esto sugiere una modificación en el estado oxidativo del biosensor (figura 25A). Como se mencionó anteriormente, la variación del valor GP se traduce en cambios cromáticos de las imágenes asociadas a estos; particularmente, en este caso se observó un cambio en la coloración de las imágenes de GP, pasando del tono celeste/verdoso, que representa el estado oxidativo inicial del biosensor, al amarillo/anaranjado (figura 25B). En su totalidad, dado los valores obtenidos de GP y la tendencia de las imágenes asociadas a estos a tonalidades cálidas, se puede confirmar la oxidación del biosensor en presencia de 50 μM de COOH.

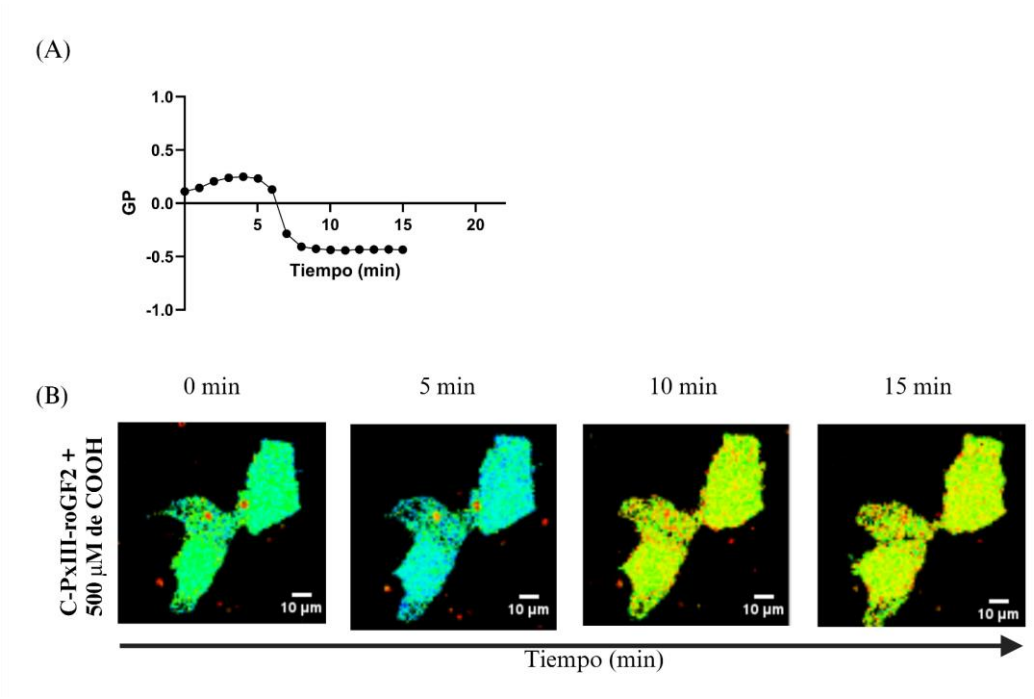

Figura 25. Evaluación de la oxidación o reducción de células HepG2 expresando el biosensor C-PxIII-roGFP2 desafiado con 50 μM de COOH. (A): Variación del GP del biosensor C-PxIII-roGFP2

en las células HepG2 transfectadas en presencia de 50 μM de COOH. **(B):** Imágenes de microscopía confocal de células HepG2 48 h post transfección con el biosensor a diferentes tiempos, 0, 5, 10 y 15 minutos. Magnificación: 63X. Escala: 10 μm. Biosensor reducido (azul) y Biosensor oxidado (verde/amarillo).

Con respecto a la respuesta del biosensor C-PxIII-roGFP2 ante el H_2O_2, cuando se realizó la medición las células ya se encontraban oxidadas desde el comienzo del experimento. Esto podría deberse a las condiciones experimentales, en particular, para la adquisición de imágenes se empleó el buffer HBSS y presencia de CO_2, y, a su vez, el experimento se llevó a cabo más de dos horas y media después de iniciada la toma de imágenes al microscopio; En consecuencia, el resultado obtenido no es representativo de acuerdo con el objetivo principal de este análisis, que es evaluar la respuesta del sensor frente al H_2O_2. Se recomienda repetir el ensayo en condiciones más óptimas.

Por otro lado, se realizó un ensayo con una concentración de 500 μM de H_2O_2, la cual supera los niveles fisiológicos (figura 26). En este caso, el biosensor muestra una respuesta similar a la obtenida con 50 μM de COOH; en particular, los valores de GP variaron, tendiendo a valores negativos; esto sugiere la oxidación del biosensor bajo estas condiciones (figura 26A). Esto se corresponde con el cambio en la coloración de las imágenes de GP, pasando del tono azul/celeste al amarillo/verdoso (figura 26C). Estos resultados sugieren que el biosensor C-PxIII-roGFP2 responde de manera más rápida a compuestos como el COOH, lo cual es acorde a lo esperado, dado que el módulo sensor del biosensor, PxIII, presenta una mayor sensibilidad a los compuestos derivados de hidróxidos lipídicos que al H_2O_2 (41, 43, 45).

Es importante destacar que los resultados obtenidos con esta concentración de H_2O_2 son preliminares y requieren un análisis más exhaustivo.

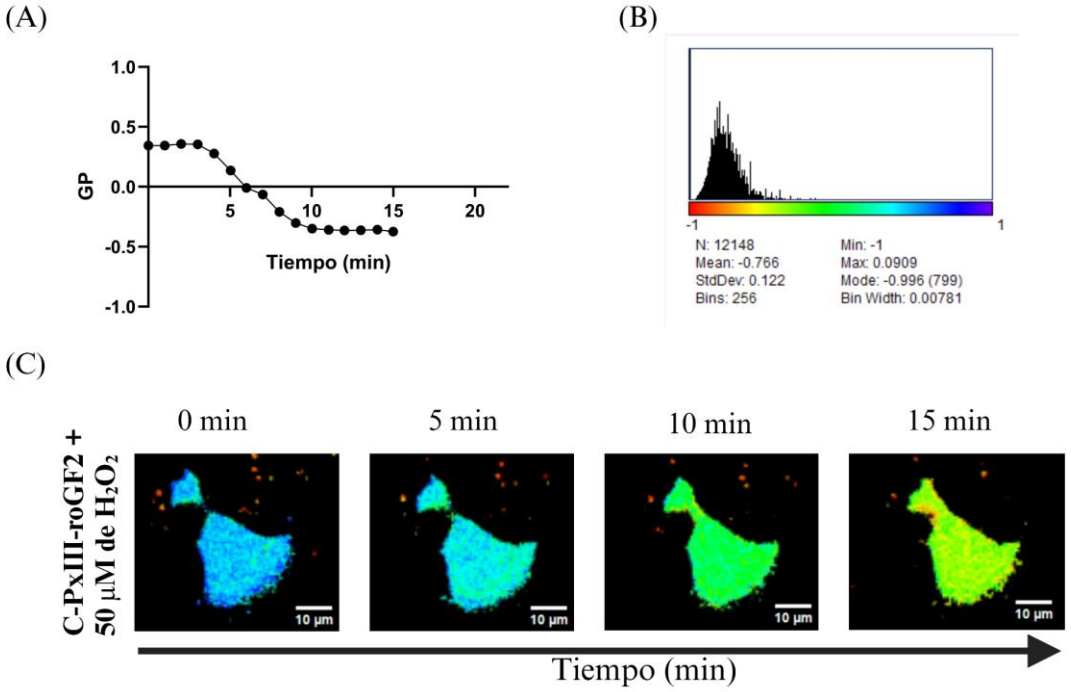

Figura 26. Evaluación de la oxidación o reducción de células HepG2 expresando el biosensor C-PxIII-roGFP2 desafiado con 500 μM de H_2O_2. (A): Variación del GP del biosensor C-PxIII-roGFP2 en las células HepG2 transfectadas en presencia de 500 μM de H_2O_2. **(B):** Histograma de dónde se obtuvo el valor de GP correspondiente al minuto 15. **(C):** Imágenes de microscopía confocal de células HepG2 48 h post transfección con el biosensor desafiado con 500 μM de H_2O_2 a diferentes tiempos, 0, 5, 10 y 15 minutos. Magnificación: 63X. Escala: 10 μm.

En estudios previos llevados a cabo por Oddone y colaboradores, se estudió la respuesta del biosensor C-PxIII-roGFP2 transfectado transitoriamente en células HepG2 frente a diferentes concentraciones de COOH y H_2O_2 (resultados no publicados). Con respecto al estudio del

biosensor en presencia de 50 μM de H_2O_2, se observó un leve cambio en el patrón de fluorescencia; este cambio es correspondiente con la oxidación del biosensor bajo las condiciones estudiadas. Por otro lado, se observó también una respuesta oxidativa por parte del biosensor luego de adicionar 50 μM de COOH a las células transfectadas con esta construcción. En este caso, se observó una respuesta más rápida en comparación con la respuesta frente al peróxido de hidrógeno, indicando una mayor sensibilidad del biosensor por el COOH que por H_2O_2; esto fue concordante con lo descrito en estudios anteriores (41, 43, 45). Si bien en este trabajo no fue posible realizar una comparación de este tipo debido al resultado obtenido con C-PxIII-roGFP2 frente a 50 μM de H_2O_2, se esperaba tener la misma respuesta.

En relación al biosensor PM-PxIII-roGFP2, dirigido hacia la membrana plasmática, en ausencia de estímulos oxidantes no se observó un cambio significativo en los valores de GP. Esto es concordante con lo esperado, dado que en un entorno sin estímulos oxidantes se esperarían valores de GP relativamente constantes a lo largo del ensayo.

En cuanto a la respuesta del biosensor en cuestión, PM-PxIII-roGFP2, en presencia del peróxido de cumeno, los resultados se presentan en la figura 27. En este caso, se observa una disminución en los valores de GP (figura 27A), lo cual es correspondiente con el cambio en la coloración de las imágenes asociadas a estos, pasando del azul, estado reducido del sensor, al verde, estado oxidado del mismo (figura 27B). En conjunto, los resultados sugieren la oxidación del biosensor en presencia de 50 μM de COOH.

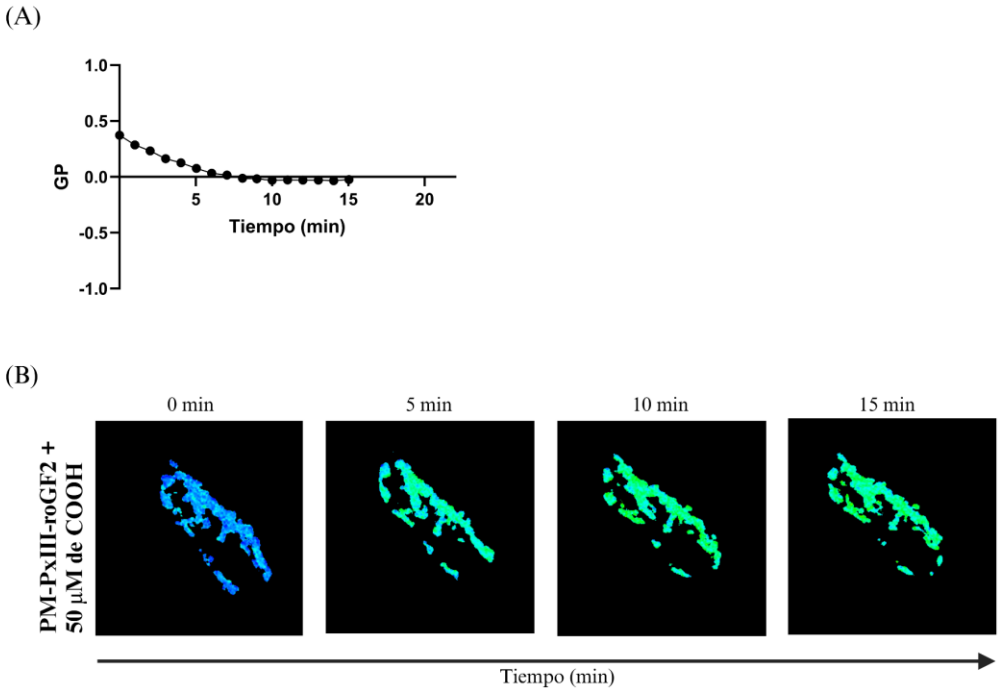

Figura 27. Evaluación de la oxidación o reducción de células HepG2 expresando el biosensor el biosensor PM-PxIII-roGFP2 desafiado con 50 μM de COOH. (A): Variación del GP del biosensor PM-PxIII-roGFP2 en las células HepG2 transfectadas en presencia de 50 μM de COOH. **(B):** Imágenes de microscopía confocal de células HepG2 48 h post transfección con el biosensor a diferentes tiempos, 0, 5, 11 y 15 minutos. Magnificación: 126X. Escala: 10 μm. Biosensor reducido (azul) y Biosensor oxidado (verde).

La exposición del biosensor PM-PxIII-roGFP2 frente a peróxido de hidrógeno se presenta en la figura 28. En este caso, el sensor se encuentra oxidado desde el comienzo del experimento, lo cual es reflejado en los valores de GP, siendo estos negativos desde el inicio del ensayo (figura 28A). Asimismo, se observa una disminución progresiva de la fluorescencia del biosensor a lo largo del tiempo, siendo casi nula al finalizar el ensayo. Esto es indicativo de la muerte celular inducida por el estrés oxidativo del entorno. Esto podría deberse a las condiciones subóptimas del ensayo, utilizándose el buffer HBSS y la presencia de CO_2 para su

realización. A su vez, habían transcurrido más de 2 horas desde que se comenzó la toma de imágenes, lo cual podría haber afectado el estado del cultivo celular. Por lo tanto, los resultados obtenidos en estas condiciones no son concluyentes para el propósito del estudio y requieren una optimización. Para una evaluación precisa de la respuesta del sensor ante el peróxido de hidrógeno, se recomienda la repetición del ensayo en condiciones más adecuadas. En particular, se sugiere realizar el ensayo dentro de las primeras 2 horas desde el inicio de la adquisición de imágenes con el microscopio, y el uso del buffer HEPES, con el fin de garantizar que las células estén en buen estado para la ejecución del ensayo.

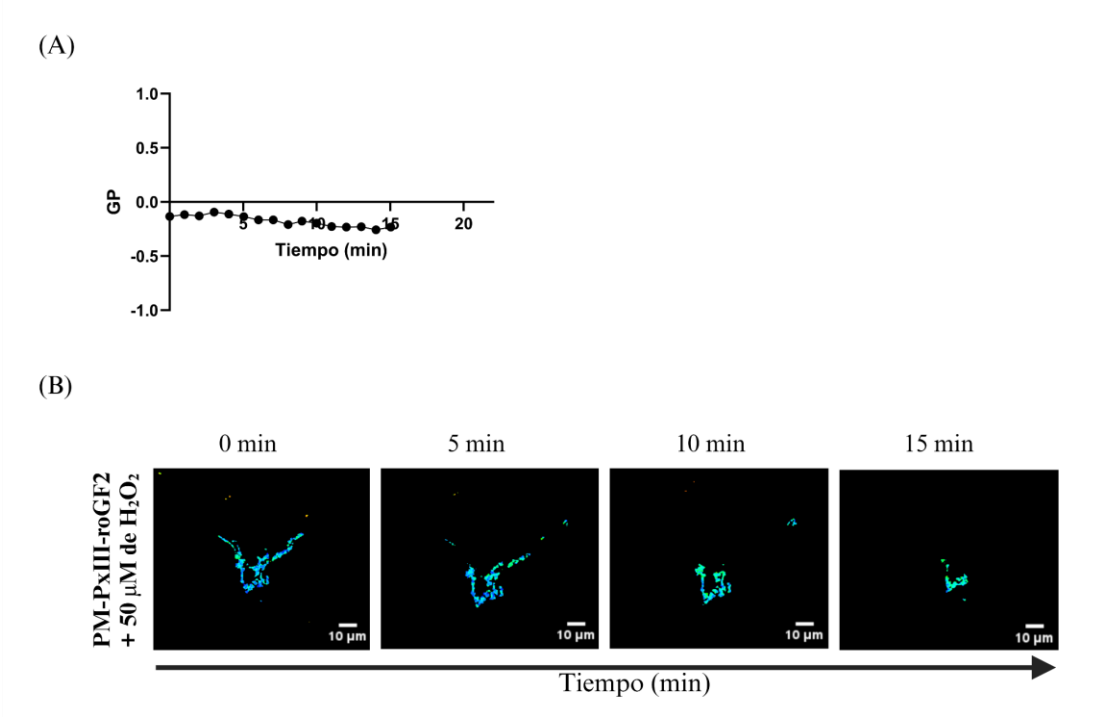

Figura 28. Evaluación de la oxidación o reducción de células HepG2 expresando el biosensor PM-PxIII-roGFP2 desafiado con 50 μM de H_2O_2. (A): Variación del GP del biosensor PM-PxIII-roGFP2 en las células HepG2 transfectadas en presencia de 50 μM de H_2O_2. **(B):** Imágenes de microscopía confocal de células HepG2 48 h post transfección con el biosensor a diferentes tiempos, 0, 5, 10 y 15 minutos. Magnificación: 63X. Escala: 10 μm. Biosensor reducido (azul) y Biosensor oxidado (verde).

Para el caso de la variante del biosensor PxIII-roGFP2 con localización en la membrana plasmática, si bien se pudo evaluar la funcionalidad de este en cuanto a su respuesta frente a COOH, como se menciona con anterioridad, se debería repetir el ensayo de respuesta del biosensor frente a H_2O_2 con el fin no solo de evaluar dicha respuesta, sino también para evaluar la especificidad del biosensor frente a los estímulos estudiados. Se esperaría que el biosensor tenga una mayor especificidad por COOH, un derivado de los lipoperóxidos, en comparación con H_2O_2, dada la afinidad del módulo PxIII del biosensor por este tipo de especies (41, 43, 45).

En relación al biosensor M-PxIII-roGFP2, dirigido hacia mitocondria, en ausencia de estímulos oxidantes no se observó un cambio relevante a nivel de la variación de GP. Esto es concordante con lo esperado, dado que en un entorno sin estímulos oxidantes se esperarían valores de GP constantes a lo largo del ensayo.

Con respecto al comportamiento del biosensor M-PxIII-roGFP2 en presencia del peróxido de cumeno, los resultados se presentan en la figura 29. En este caso, se observa una modificación significativa en los valores de GP, tendiendo estos a ser negativos (figura 29A). Esto, en conjunto con las imágenes relacionadas con estos valores, las cuales tienden a tonalidades más cálidas a medida que avanza el experimento (figura 29B), sugieren la oxidación del sensor bajo las condiciones en estudio.

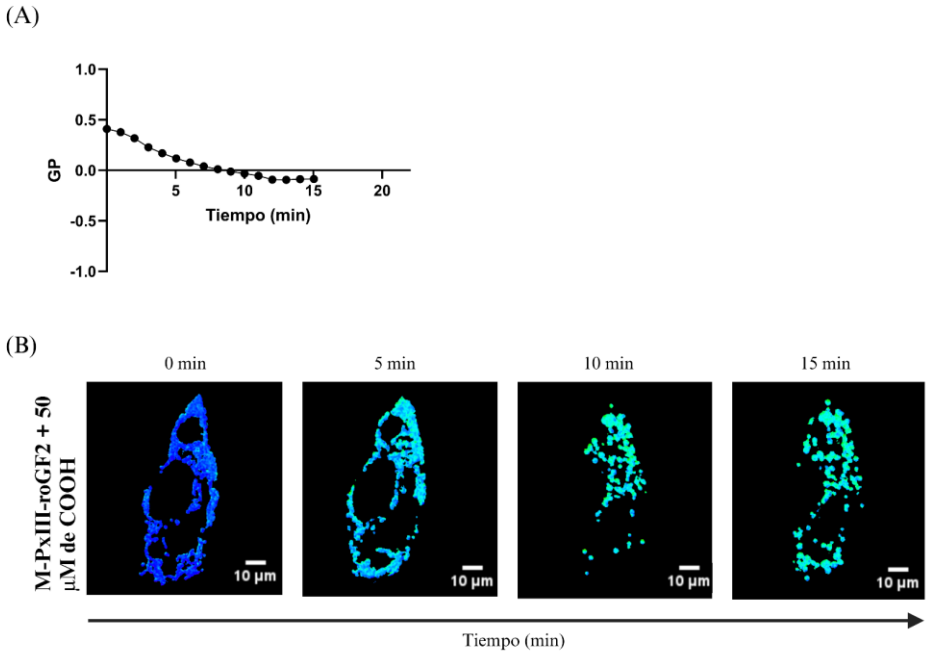

Figura 29. Evaluación de la oxidación o reducción de células HepG2 expresando el biosensor M-PxIII-roGFP2 desafiado con 50 μM de COOH. (A): Variación del GP del biosensor M-PxIII-roGFP2 en las células HepG2 transfectadas en presencia de 50 μM de COOH. **(B):** Imágenes de microscopía confocal de células HepG2 48 h post transfección con el biosensor a diferentes tiempos, 0, 7, 12 y 15 minutos. Magnificación: 126X. Escala: 10 μm. Biosensor reducido (azul) y Biosensor oxidado (verde).

Por otro lado, evaluando la respuesta del biosensor M-PxIII-roGFP2 frente a peróxido de hidrógeno, como se muestra en la figura 30A, se observa una modificación en los valores de GP. Éstos tienden a valores negativos, lo que indicaría la oxidación del sensor en cuestión. Asimismo, las imágenes de los valores de GP tienden a colores más cálidos, lo cual es concordante con lo anteriormente descrito.

Frente a este estímulo, las variaciones observadas no son tan evidentes como en el caso del agregado de COOH. Esto es consistente, como se mencionó anteriormente, con la especificidad del módulo PxIII del biosensor, que tiende a reaccionar más lentamente frente al peróxido de

hidrógeno en comparación con los peróxidos lipídicos y sus derivados, como el COOH (41, 43, 45).

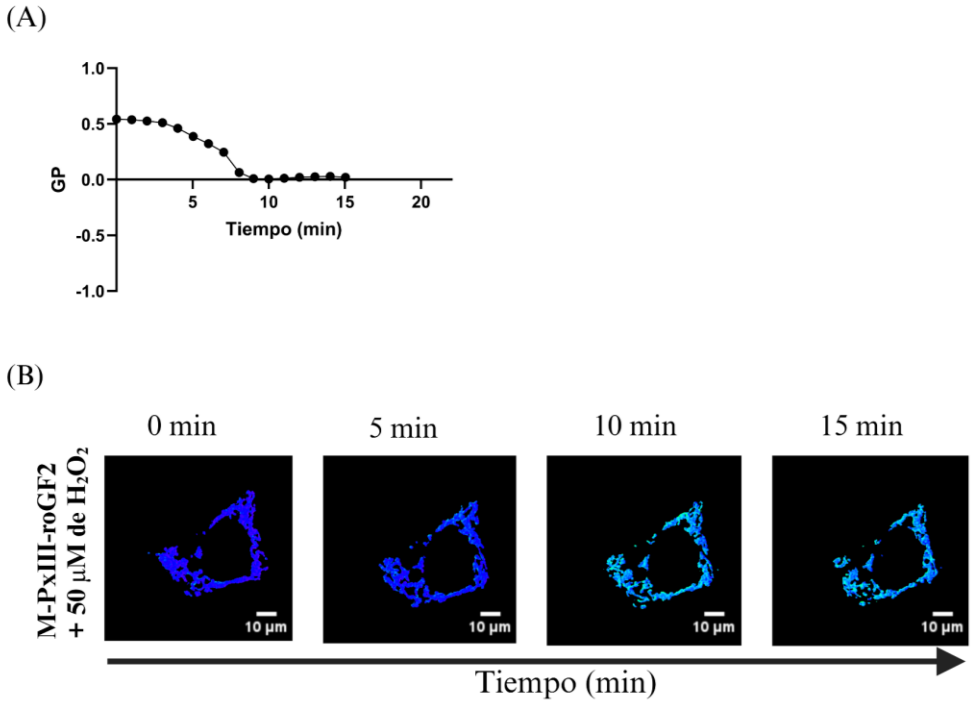

Figura 30. Evaluación de la oxidación o reducción de células HepG2 expresando el biosensor M-PxIII-roGFP2 desafiado con 50 μM de H_2O_2. (A): Variación del GP del biosensor M-PxIII-roGFP2 en las células HepG2 transfectadas en presencia de 50 μM de H_2O_2. **(B):** Imágenes de microscopía confocal de células HepG2 48 h post transfección con el biosensor a diferentes tiempos, 0, 5, 9 y 15 minutos. Magnificación: 126X. Escala: 10 μm. Biosensor reducido (azul) y Biosensor oxidado (verde).

Con respecto al biosensor N-PxIII-roGFP2, dirigido hacia el núcleo celular, cuando se fue a realizar la medición sin estímulos en las células transfectadas con el biosensor, al igual que en el experimento de C-PxIII-roGFP2 sin estímulos, ya habían transcurrido más de 2 horas y media desde que se comenzó con la toma de imágenes al microscopio con estas células. Esto afectó la medición ya que cuando se realizó el experimento, las células no estaban en su estado óptimo, resultando en una disminución casi completa en la fluorescencia del biosensor, lo cual indica

que las células en estudio murieron. Se sugiere la repetición de esta medición, ya que la misma es esencial para evaluar la autofluorescencia de las células, lo cual podría afectar la interpretación de las imágenes obtenidas con esta versión del biosensor.

Haciendo referencia al biosensor N-PxIII-roGFP2 dirigido hacia el núcleo celular, y en presencia del peróxido de cumeno, los resultados obtenidos se presentan en la figura 31. En este caso, se puede visualizar un cambio significativo en los valores de GP, sugiriendo su oxidación (figura 31A). Esto es consistente con lo esperado. Por otro lado, al analizar la coloración de las imágenes asociadas a estos valores, también se observa un cambio, pasando del color azul al celeste (figura 31B). En conjunto, estos resultados indican que el biosensor N-PxIII-roGFP2 se oxida en presencia de COOH.

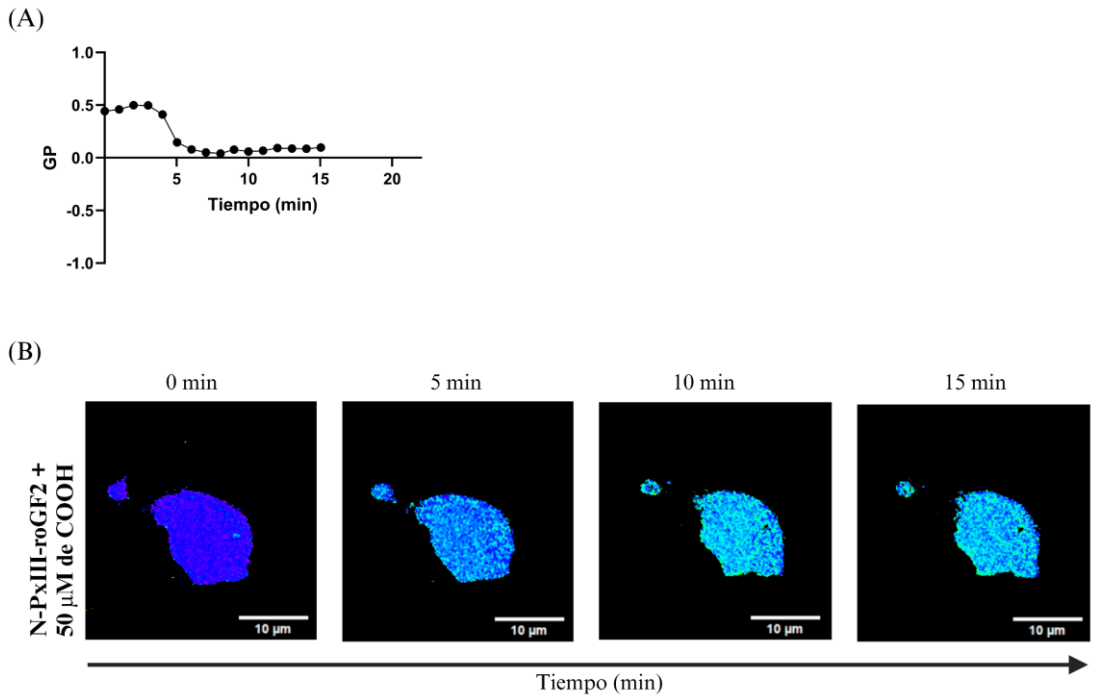

Figura 31. Evaluación de la oxidación o reducción de células HepG2 expresando el biosensor N-PxIII-roGFP2 desafiado con 50 μM de COOH. (A): Variación del GP del biosensor N-PxIII-roGFP2 en las células HepG2 transfectadas en presencia de 50 μM de COOH. **(B):** Imágenes de microscopía confocal de células HepG2 48 h post transfección con el biosensor a diferentes tiempos, 0, 5, 12 y 19 minutos. Magnificación: 63X. Escala: 10 μm. Biosensor reducido (azul) y Biosensor oxidado (celeste/verde).

Al examinar la respuesta del biosensor N-PxIII-roGFP2 frente al peróxido de hidrógeno, se observa un leve cambio en los valores de GP, indicando una posible oxidación (figura 32A). Sin embargo, es importante tener en cuenta que desde el comienzo del experimento los valores de GP tienden a ser bajos en relación a los obtenidos con las demás variantes del biosensor. Ésto podría deberse a un ambiente celular más oxidado de lo esperado, lo cual es reflejado a su vez en a la oxidación parcial inicial del biosensor, la cual se puede apreciar en la imagen asociada al valor de GP del minuto 0 (figura 32B). En este contexto, habría sido esencial haber

evaluado el estado de oxidación del biosensor en ausencia de estímulos para descartar, si fuera necesario, esta oxidación inicial. A pesar de esto, la tendencia del valor GP hacia valores más negativos en conjunto con el cambio en la coloración de las imágenes asociadas a estos respaldan la oxidación del sensor frente a este estímulo.

Mediante estos experimentos se evidenció una respuesta correspondiente a la esperada de la variante N-PxIII-roGFP2 frente a la presencia de los estímulos oxidantes H_2O_2 y COOH. Cabe destacar que, si bien la coloración de las imágenes de GP parecen indicar una mayor oxidación del sensor frente al H_2O_2, los valores de GP, a partir de los cuales se extraen estas imágenes, sugieren lo contrario; en este caso, al igual que con las demás variantes del sensor en estudio, el biosensor presenta una oxidación más rápida frente al COOH en comparación con el otro compuesto oxidante. Esto es concordante con la sensibilidad de la unidad PxIII del biosensor en estudio (41, 43, 45).

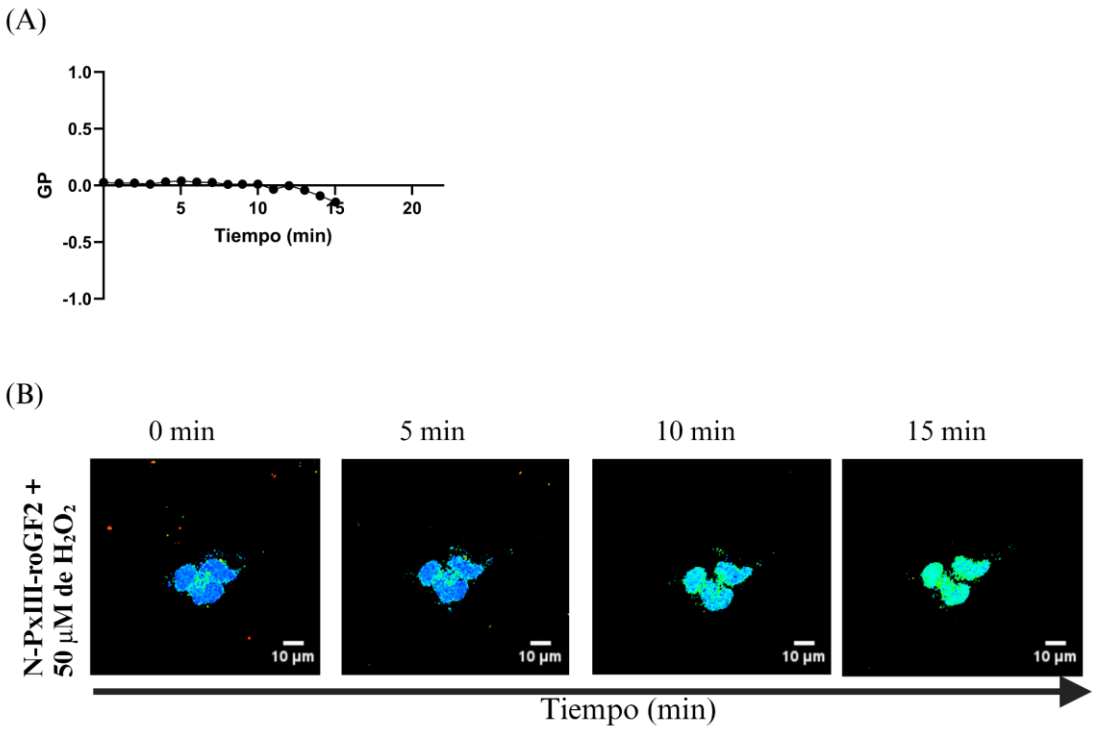

Figura 32. Evaluación de la oxidación o reducción de células HepG2 expresando el biosensor N-PxIII-roGFP2 desafiado con 50 μM de H_2O_2. (A): Variación del GP del biosensor N-PxIII-roGFP2 en las células HepG2 transfectadas en presencia de 50 μM de H_2O_2. **(B):** Imágenes de microscopía confocal de células HepG2 48 h post transfección con el biosensor a diferentes tiempos, 0, 5, 12 y 15 minutos. Magnificación: 63X. Escala: 10 μm. Biosensor reducido (azul) y Biosensor oxidado (verde).

Utilizando técnicas de microscopía confocal y el programa ImageJ junto con Macro GP, se llevó a cabo un análisis de la respuesta del biosensor PxIII-roGFP2 en diferentes compartimentos celulares, en presencia de 50 μM H_2O_2 y 50 μM COOH. Este estudio permitió evaluar la funcionalidad del biosensor en las condiciones examinadas. Con la excepción de las variantes C-PxIII-roGFP2 y PM-PxIII-roGFP2, en todos los casos, el biosensor mostró una respuesta más rápida ante la exposición a COOH que a H_2O_2, lo que sugiere su especificidad para detectar compuestos derivados de lipoperóxidos. Estos resultados confirman la utilidad del biosensor PxIII-roGFP2 para su propósito original. Es importante destacar que en los casos

en los que no se pudo comparar la respuesta del biosensor ante los estímulos, se debió a problemas en las condiciones experimentales.

Por último, es de importancia destacar que, en este proyecto, se está trabajando con un sensor ratiométrico; Éstos, desempeñan un papel crucial en la investigación biológica al proporcionar mediciones precisas y estables en una variedad de entornos celulares. Presentan como característica distintiva, la capacidad de realizar mediciones ratiométricas, basadas en la relación de intensidad entre dos señales fluorescentes generadas al excitar a dos longitudes de onda diferentes, en este caso, 405 y 488 nm. Esta capacidad se debe al comportamiento de doble excitación asociado con una única longitud de emisión de la proteína roGFP2 (32, 34, 38, 69).

La ventaja más destacada de los biosensores ratiométricos radica en su capacidad para reducir o eliminar errores experimentales, como cambios en la concentración del indicador, fotoblanqueo, variaciones en los niveles de expresión y la inestabilidad en la iluminación. Además, estas mediciones ratiométricas permiten cancelar la influencia del pH en el rango fisiológico, sobre la intensidad de fluorescencia, lo que mejora la precisión y fiabilidad de los datos (32, 34, 38, 69).

En comparación con estos, los biosensores intensiométricos, que miden la intensidad de fluorescencia en una sola longitud de onda, requerirían controles en cada experimento realizado. En este caso, los controles serían el uso de agentes oxidantes y reductores de tioles, como la diamida y el DTT, respectivamente. Mediante el uso de éstos, se obtendría el valor de intensidad de fluorescencia máxima dada por el biosensor en su estado basal reducido (intensidad de fluorescencia 100%), y el valor de intensidad de fluorescencia mínima dada por el biosensor en su estado basal oxidado (intensidad de fluorescencia 0%). Esto aumentaría la

complejidad de los procedimientos y la necesidad de analizar un mayor número de muestras para garantizar resultados confiables.

En el contexto de la microscopía de células vivas y en aplicaciones asociadas a la investigación celular, trabajar con un biosensor ratiométrico como el PxIII-roGFP2 es sumamente ventajoso. La capacidad de obtener mediciones precisas y estables, independientes de factores como la concentración del pH, simplifica la interpretación de los resultados. Esto es especialmente relevante en investigaciones que requieren mediciones precisas del estado redox en condiciones desafiantes, como microscopía de células vivas.

5. Conclusiones

En este estudio, se abordó la evaluación de la expresión y funcionalidad del biosensor fluorescente PxIII-roGFP2 diseñado para detectar LOOHs en zonas y compartimentos celulares específicos, incluyendo la membrana plasmática, las mitocondrias y el núcleo celular, en células HepG2.

Se logró la caracterización de las construcciones plasmídicas conteniendo las secuencias codificantes de las diferentes versiones del biosensor PxIII-roGFP2 dirigido a membrana plasmática, mitocondria y núcleo celular.

Se obtuvieron las líneas celulares HepG2 con las construcciones caracterizadas, sumado a la obtención de la línea celular HepG2 con el biosensor PxIII-roGFP2 sin péptido señal, y se optimizó la técnica de transfección utilizada.

Se evaluó exitosamente la expresión del biosensor PxIII-roGFP2 en los compartimentos celulares de destino en células HepG2 transfectadas con las construcciones plasmídicas correspondientes, mediante microscopía confocal.

Se logró definir un protocolo adecuado para evaluar la funcionalidad de las variantes de PxIII-roGFP2, donde se optimizaron las condiciones del experimento (buffer utilizado y presencia/ausencia de CO_2) y se monitoreo la respuesta del sensor frente a concentraciones fisiológicas de H_2O_2 y COOH siguiendo la fluorescencia de los biosensores por microscopía confocal. Se obtuvo una respuesta más rápida con COOH, verificando la especificidad del biosensor PxIII-roGFP2 por compuestos derivados de ácidos orgánicos.

Es importante destacar que los resultados generados en este trabajo se utilizarán como información relevante dentro de un proyecto más grande implicado en la obtención de la línea celular HepG2 transfectada de forma estable con las diferentes versiones del biosensor PxIII-roGFP2.

6. Perspectivas

Este proyecto sienta las bases para una serie de investigaciones prometedoras que pueden expandir nuestro entendimiento sobre el estrés oxidativo, la ferroptosis y las aplicaciones de estos biosensores.

En investigaciones futuras, se sugiere la realización de experimentos adicionales con el propósito de abordar la necesidad de una evaluación más exhaustiva del biosensor N-PxIII-roGFP2 en condiciones sin estímulos oxidantes, así como la repetición del ensayo con el biosensor PM-PxIII-roGFP2 frente a H_2O_2. Estos experimentos resultan esenciales para obtener una comprensión más detallada del comportamiento del biosensor ante estos estímulos y para evaluar su estado inicial de oxidación.

Una dirección importante para futuras investigaciones es la generación de líneas celulares estables que expresen de manera continua los biosensores en los compartimentos celulares de interés. Esto permitiría una evaluación a largo plazo de la expresión subcelular de los biosensores y brindaría la oportunidad de realizar estudios funcionales detallados y el análisis de los efectos de diferentes condiciones experimentales y tratamientos, incluyendo la ferroptosis. En este contexto, sería relevante llevar a cabo una evaluación fisiológica del biosensor PxIII-roGFP2 en respuesta a inductores de la ferroptosis.

Además, existe un potencial significativo para mejorar la especificidad y sensibilidad de los biosensores de LOOHs. Esto podría lograrse mediante modificaciones en la estructura del biosensor o en su estrategia de detección para optimizar su rendimiento. A su vez, se podrían explorar estrategias de expresión del biosensor en otros medios; en este sentido, el uso de

nanopartículas conteniendo los biosensores dirigidos a las regiones subcelulares de estudio se han estado desarrollando.

El impacto clínico y terapéutico de estos biosensores es considerable. Futuras investigaciones pueden centrarse en aplicar estos biosensores en contextos clínicos, incluyendo la detección temprana de moléculas indicativas de enfermedades de interés médico. Además, podrían emplearse en ensayos farmacológicos para evaluar el impacto de diferentes compuestos en el metabolismo redox celular y su potencial toxicidad.

7. Análisis Económico

El contexto de este trabajo de grado no justifica realizar aún una evaluación del impacto económico del producto.

Bibliografía

(1) Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, Squadrito F, Altavilla D, Bitto A. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. [Internet]. 2017. [citado 8 Oct 2023]; 2017(8416763):1-13. Disponible desde: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5551541/

(2) Ali H, Assiri MA, Shearn CT, Fritz KS. Lipid peroxidation derived reactive aldehydes in alcoholic liver disease. Current opinion in toxicology. [Internet]. 2019. [citado 3 Set 2023]; 13:110–117. Disponible desde:https://doi.org/10.1016/j.cotox.2018.10.003

(3) Clemente SM, Martínez-Costa OH, Monsalve M, Samhan-Arias AK. Targeting Lipid Peroxidation for Cancer Treatment. Molecules. [Internet]. 2020. [citado 5 Set 2023]; 25(21):5144. Disponible desde: https://doi.org/10.3390/molecules25215144

(4) Reichert CO, de Freitas FA, Sampaio-Silva J, Rokita-Rosa L, Barros P de L, Levy D, Bydlowski SP. Ferroptosis Mechanisms Involved in Neurodegenerative Diseases. International Journal of Molecular Sciences. [Internet]. 2020. [citado 3 Set 2023]; 21(22):8765. Disponible desde: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7699575/pdf/ijms-21-08765.pdf

(5) Catalá A, Díaz M. Editorial: Impact of Lipid Peroxidation on the Physiology and Pathophysiology of Cell Membranes. Frontiers in Physiology. [Internet]. 2016. [citado 8 Oct 2023]; 7. Disponible desde: https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00423

(6) Ito F, Sono Y, Ito T. Measurement and Clinical Significance of Lipid Peroxidation as a Biomarker of Oxidative Stress: Oxidative Stress in Diabetes, Atherosclerosis, and Chronic Inflammation. Antioxidants. [Internet]. 2019. [citado 6 Oct 2023]; 8(3):72. Disponible desde: https://doi.org/10.3390/antiox8030072

(7) Evans EPP, Scholten JTM, Mzyk A, Reyes-San-Martin C, Llumbet AE, Hamoh T, Arts EGJM, Schirhagl R, Cantineau AEP. Male subfertility and oxidative stress. Redox Biology. [Internet]. 2021. [citado 7 Oct 2023]; 46:102071. Disponible desde: https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102071

(8) Feng H, Stockwell BR. Unsolved mysteries: How does lipid peroxidation cause ferroptosis? PLOS Biology. [Internet]. 2018. [citado 2 Oct 2023]; 16(5):e2006203. Disponible desde:

https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006203

(9) Demirci-Çekiç S, Özkan G, Avan AN, Uzunboy S, Çapanoğlu E, Apak R. Biomarkers of Oxidative Stress and Antioxidant Defense. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. [Internet]. 2022. [citado 3 Oct 2023]; 209:114477. Disponible desde: https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114477

(10) Dryden GW, Deaciuc I, Arteel G, McClain CJ. Clinical implications of oxidative stress and antioxidant therapy. Current Gastroenterology Reports. [Internet]. 2005. [citado 8 Oct 2023]; 7(4):308–316. Disponible desde: https://doi.org/10.1007/s11894-005-0024-y

(11) Forman HJ, Zhang H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. Nature Reviews Drug Discovery. [Internet]. 2021. [citado 23 Set 2023]; 20(9):689–709. Disponible desde: https://doi.org/10.1038/s41573-021-00233-1

(12) Deus CM, Teixeira J, Raimundo N, Tucci P, Borges F, Saso L, Oliveira PJ. Modulation of cellular redox environment as a novel therapeutic strategy for Parkinson's disease. European Journal of Clinical Investigation. [Internet]. 2022. [citado 23 Set 2023]; 52(10):e13820. Disponible desde: https://doi.org/10.1111/eci.13820

(13) Ho E, Karimi Galougahi K, Liu C-C, Bhindi R, Figtree GA. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. Redox Biology. [Internet]. 2013. [citado 5 Oct 2023]; 1(1):483–491. Disponible desde: https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.07.006

(14) Gasparovic AC, Jaganjac M, Mihaljevic B, Sunjic SB, Zarkovic N. Assays for the Measurement of Lipid Peroxidation. Cell Senescence. Methods in Molecular Biology. [Internet]. 2013. [citado 27 Set 2023]; 965:283–296. Disponible desde: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23296666

(15) Murphy MP, Bayir H, Belousov V, Chang CJ, Davies KJA, Davies MJ, Dick TP, Finkel T, Forman HJ, Janssen-Heininger Y, et al. Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo. Nature metabolism. [Internet]. 2022. [citado 7 Oct 2023]; 4(6):651–662. Disponible desde: https://www.nature.com/articles/s42255-022-00591-z

(16) Stockert JC. Lipid Peroxidation Assay Using BODIPY-Phenylbutadiene Probes: A Methodological Overview. Methods in molecular biology. [Internet]. 2021. [citado 3 Oct 2023]; 2202:199–214. Disponible desde: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0896-8_16

(17) Carter M, Shieh J. Gene Delivery Strategies. En: Carter M, Shieh J, editors. Guide to Research

Techniques in Neuroscience. 2nd ed. San Diego: Academic Press; 2015. p. 239–252.

(18) Heydari-Bafrooei E, Ensafi AA. Nanomaterials-based biosensing strategies for biomarkers diagnosis, a review. Biosensors and Bioelectronics: X. [Internet]. 2023. [citado 3 Oct 2023];13:100245. Disponible desde: https://api.semanticscholar.org/CorpusID:253414725

(19) Li D, Xiong Q, Lu D, Chen Y, Liang L, Duan H. Magnetic nanochains-based dynamic ELISA for rapid and ultrasensitive detection of acute myocardial infarction biomarkers. Analytica Chimica Acta. [Internet]. 2021. [citado 3 Oct 2023]; 1166:338567. Disponible desde: https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338567

(20) Dong J, Ueda H. ELISA-type assays of trace biomarkers using microfluidic methods. Wiley Interdisciplinary Reviews. Nanomedicine and Nanobiotechnology. [Internet]. 2017. [citado 3 Oct 2023]; 9(5):e1457. Disponible desde: https://doi.org/10.1002/wnan.1457

(21) Hosen MI, Forey N, Durand G, Voegele C, Bilici S, Avogbe PH, Delhomme TM, Foll M, Manel A, Vian E, et al. Development of Sensitive Droplet Digital PCR Assays for Detecting Urinary TERT Promoter Mutations as Non-Invasive Biomarkers for Detection of Urothelial Cancer. Cancers. [Internet]. 2020. [citado 3 Oct 2023]; 12(12):3541. Disponible desde: https://doi.org/10.3390/cancers12123541

(22) Abusalah MAH, Binti Hassan SA, Mat Lazim N, Abdullah B, Binti Wan Sohaimi WF, Husin A, Cheng KY, Yean CY. Design of InnoPrimers-Duplex Real-Time PCR for Detection and Treatment Response Prediction of EBV-Associated Nasopharyngeal Carcinoma Circulating Genetic Biomarker. Diagnostics. [Internet]. 2021. [citado 8 Oct 2023]; 11(10):1761. Disponible desde: https://www.mdpi.com/2075-4418/11/10/1761

(23) Ao L, Liao T, Huang L, Lin S, Xu K, Ma J, Qiu S, Wang X, Zhang Q. Sensitive and simultaneous detection of multi-index lung cancer biomarkers by an NIR-II fluorescence lateral-flow immunoassay platform. Chemical Engineering Journal. [Internet]. 2022. [citado 8 Oct 2023]; 436:135204. Disponible desde: https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.135204

(24) Liu W, Yuan Y, Liu Q, Chen M, Chen X. Hydrogel-integrated microfluidic platform for separation-free colorimetric and distance-based detection of biomarkers in whole blood. Sensors and Actuators B: Chemical. [Internet]. 2022. [citado 8 Oct 2023]; 355:131296. Disponible desde:

https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.131296

(25) Liu SC, Yoo PB, Garg N, Lee AP, Rasheed S. A microfluidic device for blood plasma separation and fluorescence detection of biomarkers using acoustic microstreaming. Sensors and Actuators A: Physical. [Internet]. 2021. [citado 8 Oct 2023]; 317:112482. Disponible desde: https://doi.org/10.1016/j.sna.2020.112482

(26) Kulkarni MB, Ayachit NH, Aminabhavi TM. Biosensors and Microfluidic Biosensors: From Fabrication to Application. Biosensors. [Internet]. 2022. [citado 10 Oct 2023]; 12(7):543. Disponible desde: https://doi.org/10.3390/bios12070543

(27) Ovechkina VS, Zakian SM, Medvedev SP, Valetdinova KR. Genetically Encoded Fluorescent Biosensors for Biomedical Applications. Biomedicines. [Internet]. 2021. [citado 8 Oct 2023]; 9(11):1528. Disponible desde:https://doi.org/10.3390/biomedicines9111528

(28) Tetyana P, Shumbula PM, Njengele-Tetyana Z, Tetyana P, Shumbula PM, Njengele-Tetyana Z. Biosensors: Design, Development and Applications. Nanopores. [Internet]. 2021. Disponible desde: https://doi.org/10.5772/intechopen.97576

(29) Kostyuk AI, Panova AS, Kokova AD, Kotova DA, Maltsev DI, Podgorny OV, Belousov VV, Bilan DS. In Vivo Imaging with Genetically Encoded Redox Biosensors. International Journal of Molecular Sciences. [Internet]. 2020. [citado 3 Oct 2023]; 21(21):8164. Disponible desde: https://doi.org/10.3390/ijms21218164

(30) Ren W, Ai H-W. Genetically Encoded Fluorescent Redox Probes. Sensors. [Internet]. 2013. [citado 5 Oct 2023]; 13(11):15422–15433. Disponible desde: https://doi.org/10.3390/s131115422

(31) Zimmermann J, Morgan B. Thiol-based redox probes. En: Alvarez B, Comini MA, Salinas G, Trujillo M, editors. Redox Chemistry and Biology of Thiols. Academic Press; 2022. p. 373–403.

(32) Meyer AJ, Dick TP. Fluorescent Protein-Based Redox Probes. Antioxidants & Redox Signaling. [Internet]. 2010. [citado 23 Oct 2023]; 13(5):621–650. Disponible desde: https://doi.org/10.1089/ars.2009.2948

(33) Morgan B, Van Laer K, Owusu TNE, Ezeriņa D, Pastor-Flores D, Amponsah PS, Tursch A, Dick TP. Real-time monitoring of basal H2O2 levels with peroxiredoxin-based probes. Nature Chemical Biology. [Internet]. 2016. [citado 8 Oct 2023]; 12(6):437–443. Disponible desde:

https://doi.org/10.1038/nchembio.2067

(34) Hanson GT, Aggeler R, Oglesbee D, Cannon M, Capaldi RA, Tsien RY, Remington SJ. Investigating Mitochondrial Redox Potential with Redox-sensitive Green Fluorescent Protein Indicators. Journal of Biological Chemistry. [Internet]. 2004. [citado 4 Oct 2023]; 279(13):13044–13053. Disponible desde: https://doi.org/10.1074/jbc.m312846200

(35) Dooley CT, Dore TM, Hanson GT, Jackson WC, Remington SJ, Tsien RY. Imaging dynamic redox changes in mammalian cells with green fluorescent protein indicators. The Journal of biological chemistry. [Internet]. 2004. [citado 4 Oct 2023]; 279(21):22284–22293. Disponible desde: https://doi.org/10.1074/jbc.m312847200

(36) Heim R, Cubitt AB, Tsien RY. Improved green fluorescence. Nature. [Internet]. 1995. [citado 2 Oct 2023]; 373(6516):663–664. Disponible desde: https://doi.org/10.1038/373663b0

(37) Gutscher M, Pauleau A-L, Marty L, Brach T, Wabnitz GH, Samstag Y, Meyer AJ, Dick TP. Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential. Nature Methods. [Internet]. 2008. [citado 5 Oct 2023]; 5(6):553–559. Disponible desde: https://doi.org/10.1038/nmeth.1212

(38) Lohman JR, Remington SJ. Development of a Family of Redox-Sensitive Green Fluorescent Protein Indicators for Use in Relatively Oxidizing Subcellular Environments. Biochemistry. [Internet]. 2008. [citado 10 Oct 2023]; 47(33):8678–8688. Disponible desde: https://doi.org/10.1021/bi800498g

(39) Cannon MB, Remington SJ. Re-engineering redox-sensitive green fluorescent protein for improved response rate. Protein Science. [Internet]. 2006. [citado 10 Oct 2023]; 15(1):45–57. Disponible desde: https://doi.org/10.1110/ps.051734306

(40) Schlecker T, Comini MA, Melchers J, Ruppert T, Krauth-Siegel RL. Catalytic mechanism of the glutathione peroxidase-type tryparedoxin peroxidase of Trypanosoma brucei. The Biochemical Journal. [Internet]. 2007. [citado 23 Set 2023]; 405(3):445–454. Disponible desde: https://doi.org/10.1042/bj20070259

(41) Ebersoll S, Bogacz M, Günter LM, Dick TP, Krauth-Siegel RL. A tryparedoxin-coupled biosensor reveals a mitochondrial trypanothione metabolism in trypanosomes. eLife. [Internet]. 2020. [citado 5 Oct 2023]; 9:e53227. Disponible desde: https://doi.org/10.7554/elife.53227

(42) Xie Y, Kang R, Klionsky DJ, Tang D. GPX4 in cell death, autophagy, and disease. Autophagy.

[Internet]. 2023. [citado 23 Oct 2023]; 19(10):2621–2638. Disponible desde: doi: https://doi.org/10.1080/15548627.2023.2218764

(43) Diechtierow M, Krauth-Siegel RL. A tryparedoxin-dependent peroxidase protects African trypanosomes from membrane damage. Free Radical Biology and Medicine. [Internet]. 2011. [citado 4 Oct 2023]; 51(4):856–868. Disponible desde: https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.014

(44) Kim TK, Eberwine JH. Mammalian cell transfection: the present and the future. Analytical and Bioanalytical Chemistry. [Internet]. 2010. [citado 23 Oct 2023]; 397(8):3173–3178. Disponible desde: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2911531/

(45) Bogacz M, Krauth-Siegel RL. Tryparedoxin peroxidase-deficiency commits trypanosomes to ferroptosis-type cell death. Conrad M, Garrett WS, editors. eLife. [Internet]. 2018. [citado 5 Oct 2023]; 7:e37503. Disponible desde: https://elifesciences.org/articles/37503

(46) Belousov VV, Fradkov AF, Lukyanov KA, Staroverov DB, Shakhbazov KS, Terskikh AV, Lukyanov S. Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. Nature Methods. [Internet]. 2006. [citado Oct 8 2023]; 3(4):281–286. Disponible desde: https://doi.org/10.1038/nmeth866

(47) Allameh A, Niayesh-Mehr R, Aliarab A, Sebastiani G, Pantopoulos K. Oxidative Stress in Liver Pathophysiology and Disease. Antioxidants. [Internet]. 2023. [citado 3 Oct 2023]; 12(9):1653. Disponible desde: https://www.mdpi.com/2076-3921/12/9/1653

(48) Li S, Tan H-Y, Wang N, Zhang Z-J, Lao L, Wong C-W, Feng Y. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. International Journal of Molecular Sciences. [Internet]. 2015. [citado 5 Oct 2023]; 16(11):26087–26124. Disponible desde: https://doi.org/10.3390/ijms161125942

(49) Asrani SK, Devarbhavi H, Eaton J, Kamath PS. Burden of liver diseases in the world. Journal of Hepatology. [Internet]. 2019. [citado 8 Oct 2023]; 70(1):151–171. Disponible desde: https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.09.014

(50) Donato MT, Tolosa L, Gómez-Lechón MJ. Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells. En: Vinken M, Rogiers V, editors. Methods in Molecular Biology. Protocols in In Vitro Hepatocyte Research. Vol. 1250. New York, NY: Springer New York; 2015. p. 77–93.

(51) Stockwell BR. Ferroptosis turns 10: Emerging mechanisms, physiological functions, and therapeutic

applications. Cell. [Internet]. 2022. [citado 8 Oct 2023]; 185(14):2401–2421. Disponible desde: https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.06.003

(52) Zhang X, Du L, Qiao Y, Zhang X, Zheng W, Wu Q, Chen Y, Zhu G, Liu Y, Bian Z, et al. Ferroptosis is governed by differential regulation of transcription in liver cancer. Redox Biology. [Internet]. 2019. [citado 23 Oct 2023]; 24:101211. Disponible desde: https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101211

(53) Tang D, Chen X, Kang R, Kroemer G. Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications. Cell Research. [Internet]. 2021. [citado 8 Oct 2023]; 31(2):107–125. Disponible desde: https://doi.org/10.1038/s41422-020-00441-1

(54) Sun Y, Deng R, Zhang C. Erastin induces apoptotic and ferroptotic cell death by inducing ROS accumulation by causing mitochondrial dysfunction in gastric cancer cell HGC-27. Molecular Medicine Reports. [Internet]. 2020. [citado 4 Oct 2023]; 22(4):2826–2832. Disponible desde: https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11376

(55) Zhao Y, Li Y, Zhang R, Wang F, Wang T, Jiao Y. The Role of Erastin in Ferroptosis and Its Prospects in Cancer Therapy. OncoTargets and therapy. [Internet]. 2020. [citado 15 Oct 2023]; 13:5429–5441. Disponible desde: https://doi.org/10.2147/ott.s254995

(56) Bilan DS, Pase L, Joosen L, Gorokhovatsky AY, Ermakova YG, Gadella TWJ, Grabher C, Schultz C, Lukyanov S, Belousov VV. HyPer-3: a genetically encoded H_2O_2 probe with improved performance for ratiometric and fluorescence lifetime imaging. ACS chemical biology. [Internet]. 2013. [citado 8 Oct 2023]; 8(3):535–542. Disponible desde: https://doi.org/10.1021/cb300625g

(57) Chong ZX, Yeap SK, Ho WY. Transfection types, methods and strategies: a technical review. PeerJ. [Internet]. 2021. [citado 8 Oct 2023]; 9:e11165. Disponible desde: https://doi.org/10.7717/peerj.11165

(58) Fus-Kujawa A, Prus P, Bajdak-Rusinek K, Teper P, Gawron K, Kowalczuk A, Sieron AL. An Overview of Methods and Tools for Transfection of Eukaryotic Cells in vitro. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. [Internet]. 2021. [citado 27 Set 2023];9. Disponible desde: https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.701031

(59) DH5α Competent Cells - US. [citado 29 Oct 2023]. Disponible desde: https://www.thermofisher.com/uy/en/home/life-science/cloning/competent-cells-for-transformation/competent-cells-strains/dh5a-competent-cells.html

(60) Peshenko IV, Olshevskaya EV, Dizhoor AM. Binding of Guanylyl Cyclase Activating Protein 1 (GCAP1) to Retinal Guanylyl Cyclase (RetGC1). The Journal of Biological Chemistry. [Internet]. 2008. [citado 8 Oct 2023]; 283(31):21747–21757. Disponible desde: https://doi.org/10.1074/jbc.m801899200

(61) Dagda RK, Cherra SJ, Kulich SM, Tandon A, Park D, Chu CT. Loss of PINK1 Function Promotes Mitophagy through Effects on Oxidative Stress and Mitochondrial Fission. The Journal of Biological Chemistry. [Internet]. 2009. [citado 8 Oct 2023]; 284(20):13843–13855. Disponible desde: https://doi.org/10.1074/jbc.m808515200

(62) Chazotte B. Labeling Nuclear DNA Using DAPI. Cold Spring Harbor Protocols. [Internet]. 2011. [citado 8 Oct 2023]; 2011(1):pdb.prot5556. Disponible desde: https://doi.org/10.1101/pdb.prot5556

(63) Lecuit T, Wieschaus E. Polarized Insertion of New Membrane from a Cytoplasmic Reservoir during Cleavage of the Drosophila Embryo. The Journal of Cell Biology. [Internet]. 2000. [citado 7 Oct 2023]; 150(4):849–860. Disponible desde: https://rupress.org/jcb/article-pdf/150/4/849/1859364/0006044.pdf

(64) Dell'Acqua M, Faux M, Thorburn J, Thorburn A, Scott J. Membrane-targeting sequences on AKAP79 bind phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. The EMBO journal. [Internet]. 1998. [citado 23 Set 2023]; 17:2246–60. Disponible desde: https://doi.org/10.1093/emboj/17.8.2246

(65) Depping R, Seeger K. 1H-NMR spectroscopy shows cellular uptake of HEPES buffer by human cell lines—an effect to be considered in cell culture experiments. Analytical and Bioanalytical Chemistry. [Internet]. 2019. [citado 23 Set 2023]; 411(4):797–802. Disponible desde: https://doi.org/10.1007/s00216-018-1518-4

(66) Michl J, Park KC, Swietach P. Evidence-based guidelines for controlling pH in mammalian live-cell culture systems. Communications Biology. [Internet]. 2019. [citado 18 Oct 2023]; 2(1):1–12. Disponible desde: https://doi.org/10.1038/s42003-019-0393-7

(67) Frigault MM, Lacoste J, Swift JL, Brown CM. Live-cell microscopy - tips and tools. Journal of Cell Science. [Internet]. 2009. [citado 1 Oct 2023]; 122(6):753–767. Disponible desde: doi:https://doi.org/10.1242/jcs.033837

(68) Lennicke C, Cochemé HM. Redox metabolism: ROS as specific molecular regulators of cell signaling and function. Molecular Cell. [Internet]. 2021. [citado 3 Oct 2023]; 81(18):3691–3707. Disponible

desde: https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.08.018

(69) Pak VV, Ezeriņa D, Lyublinskaya OG, Pedre B, Tyurin-Kuzmin PA, Mishina NM, Thauvin M, Young D, Wahni K, Gache SAM, et al. Ultrasensitive genetically encoded indicator for hydrogen peroxide identifies roles for the oxidant in cell migration and mitochondrial function. Cell metabolism. [Internet]. 2020. [citado 3 Oct 2023]; 31(3):642-653.e6. Disponible desde: https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.02.003