



Código	FPI-009
Objeto	Guía de elaboración de Informe de avance de proyecto
Usuario	Director de proyecto de investigación
Autor	Secretaría de Ciencia y Tecnología de la UNLaM
Versión	5
Vigencia	03/9/2019

Departamento: Ciencias de la Salud

**Programa de acreditación:
PROINCE**

Programa de Investigación¹:

Código del Proyecto: E19

Título del proyecto

Caracterización funcional de la proteína de unión a ARN TcSR62 de *T. cruzi*

PIDC:

Elija un elemento.

PII:

Elija un elemento.

Director: Levy, Gabriela Vanesa

Director externo:

Codirector:

**Integrantes: Hernán Javier Aldana Marcos, Lucía Barcos, Analía Gabriela Níttolo,
Federico Ezequiel González**

Alumnos de posgrado:

Resolución Rectoral de acreditación: N° 279

Fecha de inicio: 01/01/21

Fecha de finalización: 31/12/22

¹ Los Programas de Investigación de la UNLaM están acreditados con resolución rectoral, según lo indica la Resolución HCS N° 014/15 sobre **Lineamientos generales para el establecimiento, desarrollo y gestión de Programas de Investigación a desarrollarse en la Universidad Nacional de La Matanza**. Consultar en el departamento académico correspondiente la inscripción del proyecto en un Programa acreditado.



Código	FPI-009
Objeto	Guía de elaboración de Informe de avance de proyecto
Usuario	Director de proyecto de investigación
Autor	Secretaría de Ciencia y Tecnología de la UNLaM
Versión	5
Vigencia	03/9/2019

A. Desarrollo del proyecto (adjuntar el protocolo)

A.1. Grado de ejecución de los objetivos inicialmente planteados, modificaciones o ampliaciones u obstáculos encontrados para su realización (desarrolle en no más de dos (2) páginas)

A continuación, se presentan los resultados obtenidos hasta el cierre de este período.

El presente proyecto tiene 3 objetivos específicos:

Objetivo 1: Estudiar el patrón de expresión y localización subcelular de la proteína TcSR62 en diferentes estadios y compararlos en las diferentes cepas de *T. cruzi*.

Grado de ejecución: 100%.

La concreción de este objetivo se ha cumplido en su totalidad. En el informe de avance se evidenció la expresión de la proteína TcSR62 en epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes de 4 cepas diferentes de *T. cruzi* y se corroboró la localización nuclear en tripomastigotes y en epimastigotes (**Figura 1**). Los estudios que vinieron a continuación, en los que se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFI) en células Vero infectadas con tripomastigotes de las cepas Y, CL-Brener, RA, Tulahuen y Sylvio, nos permitieron determinar que en amastigotes, además de una localización nuclear, se observa una presencia importante de la proteína TcSR62 en el citoplasma (**Figura 2**). Estos resultados fueron corroborados mediante el análisis de las imágenes por medio del programa ImageJ, donde pudo evidenciarse la co-localización de los fluorocromos en lo que sería el núcleo de los parásitos y una intensidad de fluorescencia adicional que corresponde a la región citoplasmática (**Figura 3**). Además, cabe destacar que en los tripomastigotes intracelulares también se observa la presencia nuclear de la proteína TcSR62 (datos no mostrados).

Estos resultados, junto con los presentados en el informe de avance indican que la proteína TcSR62 se expresa en los estadios de epimastigote, tripomastigote y amastigote de todas las cepas estudiadas. Además, la proteína tiene una localización nuclear en epimastigotes y en tripomastigotes, mientras que en amastigotes, se localiza mayoritariamente en núcleo y tiene además una fuerte presencia citoplasmática sugiriendo que tendría roles adicionales en el estadio intracelular de amastigote.

Objetivo 2: Evaluar los efectos de la sobreexpresión de una versión etiquetada de la proteína TcSR62 en epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi*.

Grado de ejecución: 50%.

Este objetivo se cumplió de forma parcial. Se diseñaron diferentes oligonucleótidos que permitieron obtener la secuencia correspondiente al gen de la proteína TcSR62 con una etiqueta 3xflag en el extremo 5'. Luego de la ligación en vector pGEM-T easy se enviaron a secuenciar varias colonias, pero lamentablemente, todas presentaron mutaciones relevantes incluso utilizando enzimas con bajas tasa de error. La amplificación de la secuencia del gen de la proteína TcSR62 se intentó en primer lugar con la enzima PFU, luego con la Taq High Fidelity (Invitrogen) y finalmente con la enzima Q5 (NEB) que obtuvimos con otro financiamiento del laboratorio. Superada esta etapa y habiendo conseguido dos clones sin mutaciones relevantes, continuamos con el clonado del gen desde el vector p-GEM T al vector pTcIndex mediante enzimas de restricción. Esta segunda ligación, no fue muy eficiente pero finalmente conseguimos el clon que contiene la secuencia de interés en el sentido correcto. En paralelo a esto, los parásitos de la cepa Dm28 previamente transfectados con el vector pLew13 (que expresan la ARN polimerasa T7 y el represor de TET) fueron crecidos y mantenidos en fase exponencial para realizar la transfección. Para este paso, se utilizó el equipo Amaxa Nucleofector 2B (programa U-033)



Código	FPI-009
Objeto	Guía de elaboración de Informe de avance de proyecto
Usuario	Director de proyecto de investigación
Autor	Secretaría de Ciencia y Tecnología de la UNLaM
Versión	5
Vigencia	03/9/2019

junto con el buffer Tb-BSF (fosfato de sodio 90 mM, cloruro de potasio 5 mM, cloruro de calcio 0,15 mM, HEPES 50 mM, pH 7,3) ya que se observó que tiene alta eficiencia para *T. cruzi*. Como control se realizó la electroporación con agua, utilizando el mismo volumen que se usó para el ADN. La droga de selección (higromicina) se agregó luego de 24 hs de incubación a 28 °C y se agregó un adicional de 10% SFB.

Al momento de la escritura del presente informe, los parásitos se encuentran en el día 20 de selección, la cual se estima que culminará dentro de 30 días.

Objetivo 3: Identificar patrones de reconocimiento en moléculas de ARNm (descubrimiento de motivos y diseño de ribopolímeros).

Grado de ejecución: 25%

Sin avances significativos desde el último informe.

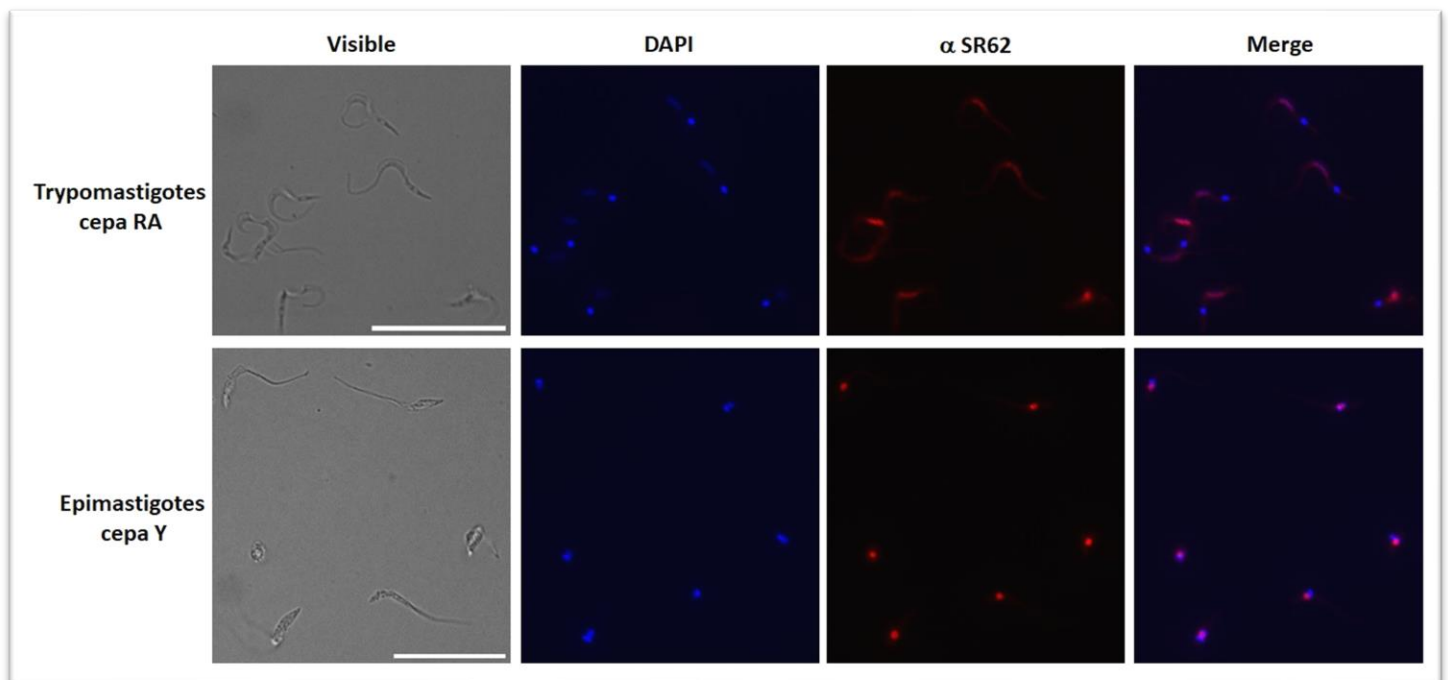


Figura 1: Inmunofluorescencias para visualizar la proteína TcSR62 en parásitos del estadio tripomastigote y epimastigote. Barra de escala 10µm.



Código	FPI-009
Objeto	Guía de elaboración de Informe de avance de proyecto
Usuario	Director de proyecto de investigación
Autor	Secretaría de Ciencia y Tecnología de la UNLaM
Versión	5
Vigencia	03/9/2019

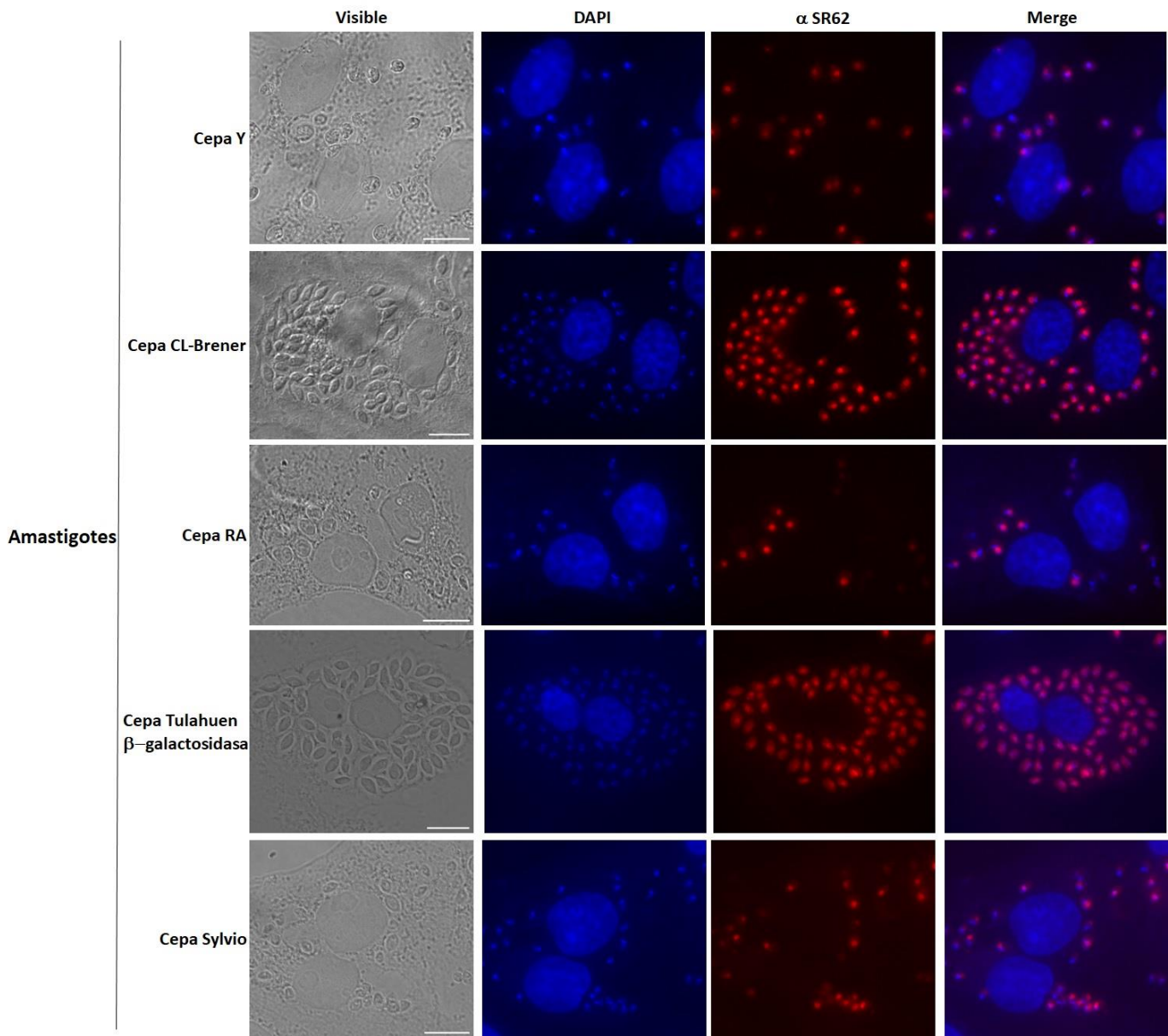


Figura 2: Inmunofluorescencias para visualizar la proteína TcSR62 en parásitos del estadio amastigote de distintas cepas mediante infecciones en células Vero. Barra de escala 10 μ m.



Código	FPI-009
Objeto	Guía de elaboración de Informe de avance de proyecto
Usuario	Director de proyecto de investigación
Autor	Secretaría de Ciencia y Tecnología de la UNLAM
Versión	5
Vigencia	03/9/2019

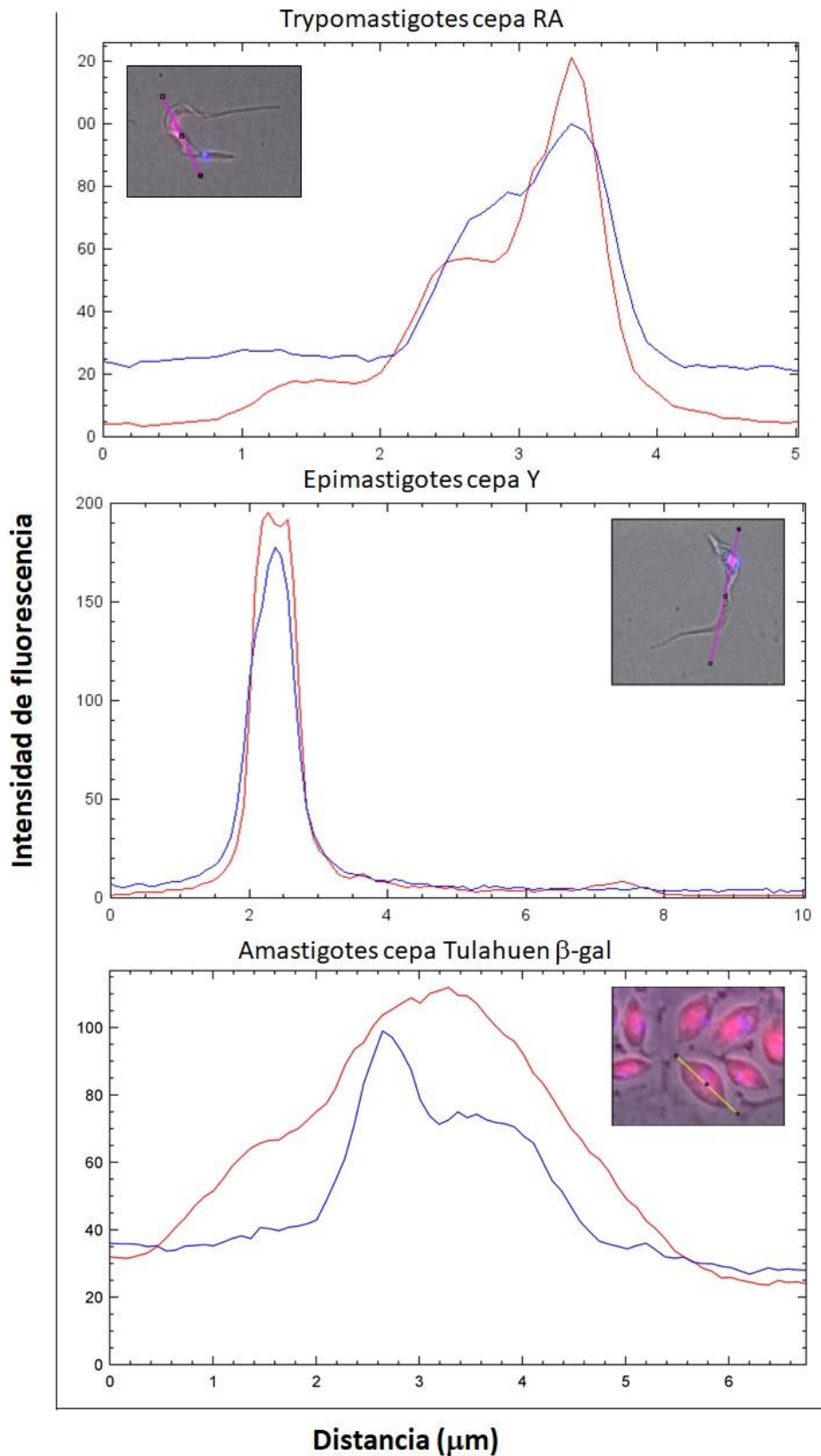


Figura 3. Perfiles de intensidades de fluorescencias correspondientes al marcador nuclear DAPI (perfiles azules) y a la fluorescencia correspondiente al anticuerpo conjugado anti-conejo (perfiles rojos). Nótese la similitud de ambos perfiles en la superposición de los picos en las regiones que corresponden a los núcleos para los casos de tripomastigotes y epimastigotes, y las diferencias entre ambos fluorocromos para el caso de los amastigotes. Los histogramas mostrados corresponden a parásitos de la cepa Tulahuen y son representativos del resto de las cepas. (Realizado con el programa ImageJ).



Código	FPI-009
Objeto	Guía de elaboración de Informe de avance de proyecto
Usuario	Director de proyecto de investigación
Autor	Secretaría de Ciencia y Tecnología de la UNLAM
Versión	5
Vigencia	03/9/2019

B. Principales resultados de la investigación

B.1. Publicaciones en revistas (informar cada producción por separado)

Artículo 1:	
Autores	
Título del artículo	
N° de fascículo	
N° de Volumen	
Revista	
Año	
Institución editora de la revista	
País de procedencia de institución editora	
Arbitraje	Elija un elemento.
ISSN:	
URL de descarga del artículo	
N° DOI	

B.2. Libros

Libro 1	
Autores	
Título del Libro	
Año	
Editorial	
Lugar de impresión	
Arbitraje	Elija un elemento.
ISBN:	
URL de descarga del libro	
N° DOI	

B.3. Capítulos de libros

Autores	
Título del Capítulo	
Título del Libro	
Año	
Editores del libro/Compiladores	
Lugar de impresión	
Arbitraje	Elija un elemento.
ISBN:	
URL de descarga del capítulo	
N° DOI	



Código	FPI-009
Objeto	Guía de elaboración de Informe de avance de proyecto
Usuario	Director de proyecto de investigación
Autor	Secretaría de Ciencia y Tecnología de la UNLAM
Versión	5
Vigencia	03/9/2019

B.4. Trabajos presentados a congresos y/o seminarios

Los resultados que se obtuvieron hasta la fecha 31-12-22 formaron parte de dos Congresos de alcance nacional de la Sociedad Argentina de Protozoología.

Autores	<i>Níttolo AG, Couce M, Chidichimo A, Gonzalez F, Benacerraf A, Cardozo T, Levy GV.</i>
Título	<i>Búsqueda de nuevos blancos terapéuticos en la Enfermedad de Chagas: Caracterización de la proteína TcSR62 de Trypanosoma cruzi</i>
Año	2022
Evento	<i>XI Congreso SAP</i>
Lugar de realización	<i>Mendoza, Argentina</i>
Fecha de presentación de la ponencia	<i>16/03/2022</i>
Entidad que organiza	<i>Sociedad Argentina de Protozoología.</i>
URL de descarga del trabajo (especificar solo si es la descarga del trabajo; formatos pdf, e-pub, etc.)	https://protozoologia.org.ar/congresos-y-reuniones-sap/congreso-sap-2022/

Autores	<i>Níttolo AG, Chidichimo A, Gonzalez F, Benacerraf A, Teikel V, Levy GV.</i>
Título	<i>“Efecto del sorafenib tosilato durante la infección con Trypanosoma cruzi en células Vero”</i>
Año	2022
Evento	<i>XXXIII Reunión anual de la SAP</i>
Lugar de realización	<i>CABA, Argentina</i>
Fecha de presentación de la ponencia	<i>18/11/2022</i>



Código	FPI-009
Objeto	Guía de elaboración de Informe de avance de proyecto
Usuario	Director de proyecto de investigación
Autor	Secretaría de Ciencia y Tecnología de la UNLaM
Versión	5
Vigencia	03/9/2019

Entidad que organiza	<i>Sociedad Argentina de Protozoología.</i>
URL de descarga del trabajo (especificar solo si es la descarga del trabajo; formatos pdf, e-pub, etc.)	https://protozoologia.org.ar/wp-content/uploads/PARASITUS-Vol.1-2022.pdf

B.5. Otras publicaciones

Autores	
Año	
Título	
Medio de Publicación	

C. Otros resultados. Indicar aquellos resultados pasibles de ser protegidos a través de instrumentos de propiedad intelectual, como patentes, derechos de autor, derechos de obtentor, etc. y desarrollos que no pueden ser protegidos por instrumentos de propiedad intelectual, como las tecnologías organizacionales y otros. Complete un cuadro por cada uno de estos dos tipos de productos.

C.1. Títulos de propiedad intelectual. Indicar: Tipo (marcas, patentes, modelos y diseños, la transferencia tecnológica) de desarrollo o producto, Titular, Fecha de solicitud, Fecha de otorgamiento

Tipo	Titular	Fecha de Solicitud	Fecha de Emisión

C.2. Otros desarrollos no pasibles de ser protegidos por títulos de propiedad intelectual. Indicar: Producto y Descripción.

Producto	Descripción

D. Formación de recursos humanos. Trabajos finales de graduación, tesis de grado y posgrado. Completar un cuadro por cada uno de los trabajos generados en el marco del proyecto.

D.1. Tesis de grado

Director (apellido y nombre)	Autor (apellido y nombre)	Institución	Calificación	Fecha /En curso	Título de la tesis



Código	FPI-009
Objeto	Guía de elaboración de Informe de avance de proyecto
Usuario	Director de proyecto de investigación
Autor	Secretaría de Ciencia y Tecnología de la UNLaM
Versión	5
Vigencia	03/9/2019

D.2 Trabajo Final de Especialización

Director (apellido y nombre)	y Autor (apellido y nombre)	Institución	Calificación	Fecha /En curso	Título del Trabajo Final

D.2. Tesis de posgrado: Maestría

Director (apellido y nombre)	y Tesista (apellido y nombre)	Institución	Calificación	Fecha /En curso	Título de la tesis

D.3. Tesis de posgrado: Doctorado

Director (apellido y nombre)	y Tesista (apellido y nombre)	Institución	Calificación	Fecha /En curso	Título de la tesis

D.4. Trabajos de Posdoctorado

Director (apellido y nombre)	Posdoctorando (apellido y nombre)	Institución	Calificación	Fecha /En curso	Título del trabajo	Publicación

E. Otros recursos humanos en formación: estudiantes/ investigadores (grado/posgrado/ posdoctorado)

Apellido y nombre del Recurso Humano	Tipo	Institución	Período (desde/hasta)	Actividad asignada ²
Federico González	Grado	UNLaM CIN CIC	01/01/2021 – 31/09/2022 01/10/2022- Continúa	Búsqueda bibliográfica, análisis de resultados. Participación en diferentes tareas.
Miriam Inglese	Grado	UNLaM CIN	01/09/2022 – Continúa	Búsqueda bibliográfica, análisis de resultados. Participación en diferentes tareas.
Analía Níttolo	Post-doctorado	UNLaM Conicet	01/01/2021 – 31/12/2022.	Coordinación general y realización de los experimentos, análisis de resultados.

² Descripción de la/s actividad/es a cargo (máximo 30 palabras)



Código	FPI-009
Objeto	Guía de elaboración de Informe de avance de proyecto
Usuario	Director de proyecto de investigación
Autor	Secretaría de Ciencia y Tecnología de la UNLaM
Versión	5
Vigencia	03/9/2019

F. Vinculación³: Indicar conformación de redes, intercambio científico, etc. con otros grupos de investigación; con el ámbito productivo o con entidades públicas. Desarrolle en no más de dos (2) páginas.

G. Otra información. Incluir toda otra información que se considere pertinente.

Durante el transcurso del período informado no se han encontrado grandes dificultades, sino sólo aquellas inherentes al trabajo experimental. La obtención de la versión wild type etiquetada del gen de la proteína TcSR62 se vio demorada. Lamentablemente, y a pesar de la utilización de enzimas adecuadas para la amplificación, se tuvo que recurrir a una enzima de última generación para evitar la generación de mutaciones no deseadas. Cabe aclarar que los costos de esta enzima son demasiado altos como para seleccionarla como la primera opción. Sin embargo, se pudo sortear esta dificultad y se puede continuar con los objetivos de este proyecto.

H. Cuerpo de anexos:

- **Anexo I:** Copia de cada uno de los trabajos mencionados en los puntos B, C y D, y certificaciones cuando corresponda.⁴
- **Anexo II:**
 - FPI-014: Comprobante de liquidación y rendición de viáticos. (si corresponde)
 - FPI-015: Rendición de gastos del proyecto de investigación acompañado de las hojas foliadas con los comprobantes de gastos.
 - FPI-035: Formulario de reasignación de fondos en Presupuesto.
- Nota justificando baja de integrantes del equipo de investigación.

Firma y aclaración
del director del proyecto.

Lugar y fecha: San Justo, 10 de Marzo de 2023.

- Cargar este formulario junto con los documentos correspondientes **exclusivamente** al Anexo I en SIGEVA UNLaM.
- Enviar toda la documentación anterior más la correspondiente al ANEXO II junto con los comprobantes de gastos escaneados, en archivo PDF por correo electrónico a la Secretaría de Investigaciones Departamental investigacionessalud@unlam.edu.ar. Conservar una copia impresa de toda la documentación para ser presentada ante la Secretaría
- **La plataforma SIGEVA-UNLaM estará habilitada para realizar la carga de documentación entre el 2 de marzo y el 1° de abril de 2022.**

³ Entendemos por acciones de “vinculación” aquellas que tienen por objetivo dar respuesta a problemas, generando la creación de productos o servicios innovadores y confeccionados “a medida” de sus contrapartes.

⁴ En caso de libros, podrá presentarse una fotocopia de la primera hoja significativa o su equivalente y el índice.