

# UACM

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

NADA HUMANO ME ES AJENO

---

---

## POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

Caracterización de una metaloproteinasas de *Trichomonas vaginalis* expresada en presencia de  $Zn^{2+}$

# T E S I S

Que para obtener el título de

Maestro en Ciencias Genómicas

**Presenta**

Q.F.B. José Luis Villalpando Aguilar

**Directora de tesis**

Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez (UACM)

MÉXICO, D.F. JULIO 2011

## SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

### RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

#### DERECHOS RESERVADOS<sup>©</sup>

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

### **Directora**

Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez  
Profesora Investigadora.  
Posgrado en Ciencias Genómicas  
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

### **Asesores**

#### **Dra. Rossana Arroyo Verástegui**

Investigador titular  
Departamento de infectómica y Patogénesis Molecular.  
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN

#### **Dra. Rosalía Lira Carmona**

Unidad de Investigación Médica  
en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias.  
Centro Médico Nacional Siglo XXI.  
Instituto Mexicano del Seguro Social IMSS

#### **Dra. Itzel Quintas Granados**

Posgrado en Ciencias Genómicas  
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

#### **Dr. Mauricio Castañón Arreola**

Profesor Investigador  
Posgrado en Ciencias Genómicas  
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

El presente proyecto de investigación fue realizado en el laboratorio 1 en el Posgrado de Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, bajo la dirección de Dra. María Elizabeth Alvarez Sánchez y bajo la asesoría de la Dra. Rossana Arroyo Verástegui, Dra. Rosalia Lira Carmona, Dra. Itzel Quintas Granados y Dr. Mauricio Castañón Arreola. El proyecto fue financiado con fondos del Instituto de Ciencia y tecnología del Distrito Federal (ICyTDF) con No. de proyecto: PIFUTP08-150 numero de convenio ICyTDF/321/2009 y Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el No. de proyecto: 83808

Agradezco a la Universidad Autónoma de la Cuidad de México por su apoyo académico y económico y al CONACYT como becario número: 331285

*Agradecimiento*

*A todo aquel que apoyo y guió con sus sabios consejos e hizo posible este viaje lleno de aventura y retos, que deja grandes enseñanzas que hicieron madurar mi actitud académica..*

*Gracias a todos...*

## *Dedicatoria:*

A ustedes mi familia:  
A mi Hermano Mario, tú mi torre de babel  
A mi Mamá Enriqueta, a mi Papá Mario,  
A mi sobrino Bryan tu que le hechas siempre  
ganas  
A mis hermanas: Liliana, Celia, Alina,  
A Gonzales  
Sin ustedes esto no hubiera sido posible  
Gracias por nunca dejarme solo  
A mi novia Myriam la inspiración de cada día  
de mi vida  
A mi amigo a Diego  
Que esta siempre ahí  
A todos mis amigos:  
Benjamín, luz, Daniela, Marcela  
Gracias por estar aquí conmigo!!!

Y sobre todo a Dios y a la vida que me  
permiten disfrutar de este sueño  
Que incluso a veces no lo creo...

Por que como "Nach" dice:

"En lo que sea pero el mejor"

## Índice

	Página
Resumen	1
1. Introducción	3
1.1 Manifestaciones clínicas	4
1.1.1 Tricomonosis en la mujer	4
1.1.2 Tricomonosis en el hombre	5
1.1.3 Epidemiología	5
1.2 Morfología	9
1.3 Genoma de <i>Trichomonas vaginalis</i>	11
1.4 Metabolismo en <i>Trichomonas vaginalis</i>	12
1.5 Ciclo de vida de <i>Trichomonas vaginalis</i>	12
1.6 Patogenicidad	15
1.6.1 Citoadherencia	15
1.6.2 Apoptosis	16
1.6.3 Citotoxicidad	17
1.6.4 Fagocitosis	17
1.6.5 Hemólisis	18
1.6.6 Evasión de la respuesta inmune	18
1.7 <i>Trichomonas vaginalis</i> y Fe <sup>2+</sup>	19
1.8 Regulación génica en eucariontes	19
1.9 Regulación génica en <i>T. vaginalis</i>	20

1.10 Regulación génica por poliaminas en <i>T. vaginalis</i>	21
1.11 El Zn <sup>2+</sup>	23
1.12 El Zn <sup>2+</sup> en otros eucariontes	23
1.13 El proteoma humano de Zn <sup>2+</sup>	24
1.14 <i>Trichomonas vaginalis</i> y Zn <sup>2+</sup>	25
1.15 Metaloproteinasas	26
1.16 Importancia biológica de las metaloproteinasas	31
1.17 Metaloproteinasas en <i>Trichomonas vaginalis</i>	31
1.18 Antecedentes directos	32
2. Justificación y Objetivos del trabajo	33
2.1 Justificación	33
2.2 Hipótesis	33
2.3 Objetivo general	33
2.4 Objetivos particulares	33
2.5 Estrategia experimental	34
3. Materiales y Métodos	35
3.1 Análisis bioinformático	35
3.2 Cultivo de parásitos <i>Trichomonas vaginalis</i>	35
3.3 Extracción de DNA genómico de <i>Trichomonas vaginalis</i>	36
3.4 Extracción de RNA total de <i>Trichomonas vaginalis</i>	36
3.5 Síntesis de cDNA	36
3.6 Amplificación por PCR del gen <i>mp50</i> de <i>T. vaginalis</i>	37

3.7 Preparación de células competentes <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ y M15	38
3.8 Clonación del gen de TvMP50 de <i>T. vaginalis</i>	38
3.9 Extracción de plásmido por Miniprep	39
3.10 Subclonación del gen <i>mp50</i> en el vector pQE80L	39
3.11 Expresión de la proteína TvMP50r	40
3.12 Purificación de TvMP50r por afinidad a níquel	40
3.13 Obtención de anticuerpos anti-TvMP50r	41
3.14 Extracción de TCAs (extractos totales de proteínas)	41
3.15 Western blot	42
3.16 Ensayo de Inmunofluorescencia indirecta	42
4. Resultados	43
4.1 Análisis <i>In silico</i> del gen <i>mp50</i> y de la proteína TvMP50	43
4.2 Análisis del transcrito de <i>mp50</i> en cultivos de <i>T. vaginalis</i>	55
4.3 Expresión y purificación de TvMP50r	60
4.4 Inmunolocalización de TvMP50 en <i>T. vaginalis</i>	85
5. Discusión de resultados	94
6. Conclusiones y perspectivas	99
7. Bibliografía	100
8. Apéndice	111

## Lista de abreviaturas

➤ $\beta$ HPP	proteínasa procesadora hidrogenosomal subunidad $\beta$
➤ c.b.p	Cuanto baste para
➤ cDNA	Acido desoxirribonucleico complementario
➤ CNC147	Aislado de <i>Trichomonas vaginalis</i> obtenido de mujer
➤ CPs	Cisteín proteinasas
➤ D	Ácido aspartico
➤ DEPC	Dietilpirocarbonato
➤ DNA	Acido desoxirribonucleico
➤ DNAg	DNA genómico
➤ dNTPs	Deoxinucleótidos tri-fosfatados
➤ E	Ácido glutámico
➤ ECM	Matriz extracelular
➤ EDTA	Ácido etilén diaminotetra acético
➤ g	Gramos
➤ GTP-BP	proteína de unión a GTP
➤ H	Histidina
➤ HCl	Ácido clorhídrico
➤ HGMN01	Aislado de <i>Trichomonas vaginalis</i> obtenido de hombre
➤ h	Horas
➤ Inr	Regulador del inicio de la transcripción
➤ IPTG	Isopropil- $\beta$ -D- tiogalactopiranosido
➤ I.T.S.	Infecciones de transmisión sexual
➤ IREs	Elemento de respuesta a hierro
➤ IRPs	Proteínas reguladora por hierro
➤ kDa	Kilodaltones
➤ LB	Medio Luria –Broth
➤ $\mu$ g	Microgramos
➤ $\mu$ l	Microlitros
➤ ml	Mililitros
➤ mM	Milimolar
➤ nm	Nanómetros

➤ MS	Espectrometría de masas
➤ O.D.	Densidad Óptica
➤ O.N.	Toda la noche
➤ ORF	Open Reading Frame (Marco abierto de lectura)
➤ PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
➤ PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
➤ PDI	Proteína Disulfuro Isomerasa
➤ pH	Potencial de hidrogeno
➤ pI	Punto isoeléctrico
➤ PSA	Persulfato de amonio
➤ RNA	Acido ribonucleico
➤ RNAm	Acido ribonucleico mensajero
➤ RNAt	Acido ribonucleico de transferencia
➤ RNAi	Acido ribonucleico de interferencia
➤ rpm	Revoluciones por minuto
➤ RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa retrotranscriptasa
➤ SC	Suero de caballo
➤ SPI	Suero preinmune
➤ T.A.	Temperatura ambiente
➤ TAE	amortiguador-Tris-Acetato-EDTA
➤ TCA	Ácido tricloroacético
➤ TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetrametiletildiamina
➤ TvMP50	<i>T. vaginalis</i> Metaloproteinasa de 50 kDa
➤ TvMP50r	<i>T. vaginalis</i> Metaloproteinasa de 50 kDa recombinante
➤ TYM	Tripticasa-extracto de levadura y Maltosa
➤ UTR	Región no traducida
➤ V	Volts
➤ VECs	Células del epitelio vaginal
➤ Zn <sup>2+</sup>	Zinc
➤ 2-DE	Electroforesis en doble dimensión

## Índice de figuras.

	página
<b>Figura 1.</b> Gráfica de incidencia de tricomonosis por entidad en la Republica Mexicana 2010-2011.	7
<b>Figura 2.</b> Morfología de <i>Trichomonas vaginalis</i>	10
<b>Figura 3.</b> Ciclo de vida de <i>Trichomonas vaginalis</i> y transmisión sexual	13
<b>Figura 4.</b> Estructura básica de metaloproteinasas	28
<b>Figura 5.</b> Representación esquemática del ORF que codifica para TvMP50.	45
<b>Figura 6.</b> Árbol filogenético construido con la TvMP50 y metaloproteinasas de distintos organismos.	47
<b>Figura 7.</b> Identificación <i>In silico</i> del sitio catalítico de TvMP50.	49
<b>Figura 8.</b> Estructura secundaria de la TvMP50.	51
<b>Figura 9.</b> Modelaje 3D de la TvMP50 de <i>Trichomonas vaginalis</i> .	53
<b>Figura 10.</b> Expresión diferencial del transcrito de <i>mp50</i> en presencia y en ausencia de 1.6 mM de Zn <sup>2+</sup> en dos aislados diferentes de <i>T. vaginalis</i>	56
<b>Figura 11.</b> Análisis densitométrico de <i>mp50</i> en los aislados de <i>T. vaginalis</i> CNCD147 y HGMN01 en presencia y ausencia de Zn <sup>2+</sup> .	58
<b>Figura 12.</b> Análisis de restricción de la clona T2 (TOPO- <i>mp50</i> ).	62
<b>Figura 13.</b> Alineamiento del gen <i>mp50</i> de la clona T2 (TOPO- <i>mp50</i> ) reportada en la base de datos TrichDB.	64
<b>Figura 14.</b> Mapa del vector pQE80L.	66
<b>Figura 15.</b> Subclonación de <i>mp50</i> en el vector pQE80L.	68
<b>Figura 16.</b> Selección por PCR de clonas candidatas para la construcción pQE-80L- <i>mp50</i> .	71
<b>Figura 17.</b> Clonas candidatas pQE80L- <i>mp50</i> .	73

<b>Figura 18.</b> Análisis por restricción enzimática de las clonas candidatas pQE80L- <i>mp50</i> MQ1, MQ2 y MQ3.	<b>75</b>
<b>Figura 19.</b> Perfil electroforético de la inducción y purificación de TvMP50r.	<b>78</b>
<b>Figura 20.</b> Inmunodetección de TvMP50r.	<b>80</b>
<b>Figura 21.</b> Perfil de Inmunodetección con sueros de ratones anti-TvMP50r.	<b>83</b>
<b>Figura 22.</b> Inmunolocalización de TvMP50 en parásitos permeabilizados.	<b>86</b>
<b>Figura 23.</b> Inmunolocalización de TvMP50 en parásitos permeabilizados (zoom de 5).	<b>88</b>
<b>Figura 24.</b> Localización de TvMP50 en parásitos no permeabilizados.	<b>90</b>
<b>Figura 25.</b> Localización de TvMP50 en parásitos no permeabilizados (zoom de 5).	<b>92</b>

## Índice de tablas.

	página
<b>Tabla 1.</b> Secuencia de los oligonucleótidos empleados para amplificar <i>mp50</i> .	<b>61</b>

## Resumen

*Trichomonas vaginalis* es un parásito capaz de infectar y desarrollar tricomonosis en el tracto urogenital humano, el establecimiento de la infección requiere la participación de factores de virulencia como adhesinas y proteinasas que participan en la evasión de la respuesta inmune, adhesión, degradación de proteínas y daño celular al microambiente del huésped. El parásito es rico en genes que codifican para proteinasas (440 genes), de los cuales 123 genes corresponden a metaloproteinasas, hasta el momento se han identificado y caracterizado tres metaloproteinasas. El estudio de metaloproteinasas de *T. vaginalis* es de gran importancia para entender su participación en el establecimiento de la infección en el tracto urogenital masculino.

El proteoma de *T. vaginalis* en presencia de  $Zn^{2+}$ , mostró la sobreexpresión de la metaloproteinasa de 50 kDa nombrada TvMP50, la cual es inmunodetectada diferencialmente por sueros de pacientes hombres con tricomonosis. El objetivo del presente trabajo fue la caracterización de la metaloproteinasa TvMP50, se sugiere que TvMP50 puede estar participando en el establecimiento de la infección en el tracto urogenital del hombre. TvMP50 es un gen no caracterizado en *T. vaginalis*, por lo que primero se realizó un análisis *In silico*, y se determinó la relación filogenética de TvMP50 con organismos como bacterias, algas, plantas, otros parásitos y el humano, por medio de un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de TvMP50 con la secuencia de la xaa-pro dipeptidasa de *H. sapiens* y la xaa-pro-aminopeptidasa de *E. coli*, se determinó que el sitio catalítico está conformado por H244 D261 D272 H351 H355 H362 E384 E407, y con un análisis y modelaje de la estructura secundaria y terciaria de TvMP50, se determinó el plegamiento estructural "pita bread", estos datos sugieren que la TvMP50 corresponde al clan MG, familia M24 subfamilia B dentro de la clasificación de MEROPS.

Por otra parte por medio de ensayos de RT-PCR tiempo final, se demostró que la expresión del RNAm de *mp50* fue expresado solamente en presencia de  $Zn^{2+}$  en el aislado de mujer (CNCD147), sin embargo en el aislado de hombre HGMN01 fue expresado en ausencia y se sobreexpresa en presencia de 1.6 mM  $Zn^{2+}$ , esto fue corroborado mediante densitometría mostrando una expresión diferencial del transcrito de *mp50* ambos aislados. Por otro lado para inmunodetectar y localizar a TvMP50 en *T.vaginalis*, se realizó la clonación de *mp50* en el vector pCR 2.1 TOPO y se expresó la proteína en el vector pQE-80L. TvMP50 se purificó por medio de cromatografía de afinidad a níquel obteniéndose una metaloproteínasa de 50kDa, la cual fue utilizada para la obtención de anticuerpos, inoculando la TvMP50r en ratones machos de la cepa Balb/c obteniendo el título de inmunoreconocimiento en extractos totales de proteínas de 1:10000 revelado por quimioluminiscencia. Posteriormente por inmunofluorescencia indirecta se determinó la localización de TvMP50 en la superficie y en el citoplasma de parásitos crecidos en ausencia de  $Zn^{2+}$ , mientras que los parásitos crecidos en presencia de 1.6 mM  $Zn^{2+}$  la proteína se sobre expresó tanto en citoplasma y en la superficie. Este trabajo demuestra que la presencia de  $Zn^{2+}$  produce la sobreexpresión de TvMP50.

## 1. Introducción.

La tricomonosis es una infección humana producida por protozoos flagelados pertenecientes al género *Trichomonas*, que se localizan en la cavidad bucal *Trichomonas tenax*, (Dobel 1939), en el intestino *Trichomonas hominis*, (Leuckart 1879) y en el aparato urogenital *Trichomonas vaginalis* (Donné 1837). De estas tres solo la última es patógena y produce una infección.

La tricomonosis urogenital humana, es una de las infecciones de transmisión sexual (I.T.S.) no viral de mayor prevalencia en el mundo; con un total estimado de 180 millones de casos de mujeres afectadas cada año (Cadena y cols., 2006). *Trichomonas vaginalis* infecta el tracto urogenital vaginal, desarrollando la infección entre 20-30 días después del contacto con una persona infectada. En el hombre la mayoría de los casos son asintomáticos, lo que significa que son casos no diagnosticados, por lo que las estadísticas actuales subestiman el número de casos, debido a que la tricomonosis no pertenece a un sistema de vigilancia epidemiológico, (SUIVE, Sistema Único de Información y Vigilancia Epidemiológica, 2011). Sin embargo la prevalencia de contagio de tricomonosis tiene origen en la falta de prevención e información en la población.

Por lo tanto, es importante evitar tener un comportamiento sexual de alto riesgo de contagio, evitando los factores de riesgo como: múltiples parejas sexuales, el historial de otras infecciones de transmisión sexual (I.T.S.), co-infecciones con Gonorrea u otros microorganismos, el pH vaginal mayor a 4.5, falla en el uso del condón (Petrin y cols., 1998 Schweble y Burgess, 2004). Por ello es de gran importancia el estudio de *T. vaginalis*, enfocado en el entendimiento de su biología para encontrar blancos farmacéuticos que ayuden a mejorar el diagnóstico y con ello dirigir de mejor manera el tratamiento optimando la calidad de vida de las personas.

## **1.1 Manifestaciones clínicas.**

### **1.1.1 Tricomonosis en la mujer.**

La mujer se infecta al tener relaciones sexuales con una persona infectada, el periodo de incubación es de 4 a 28 días para el establecimiento de la infección y presentar signos y síntomas leves como: vulvitis que en ocasiones se confunde con vulvitis bacteriana la cual no es tratada adecuadamente. Por lo tanto, se llega a la fase aguda de la infección presentando descargas mucopurulentas vaginales (verdes o amarillentas) con un olor fétido característico a aminas, prurito descrito como comezón en la vulva o uretra, irritación, disuria e inflamación y el característico cérvix de fresa (puntos hemorrágicos localizados en el cérvix) (Petrin y col., 1998; Schwebke y Burgess, 2004). Por otra parte, durante la fase crónica, las pacientes presentan dolor en el bajo vientre y dispareunia. La tricomonosis ocasiona consecuencias graves en las mujeres embarazadas con tricomonosis como: partos prematuros, abortos, debido a la ruptura de las membranas amnióticas por la participación de cisteín proteinasas (Laga y col., 1991), infertilidad, debido a que *T. vaginalis* es capaz de inmovilizar a los espermatozoides (Schwebke, 2004; Benchimol y col., 2008); inflamación crónica, debido al daño al tejido lo que propicia la activación de la respuesta inmune lo que atrae moléculas inflamatorias (Hardy y col., 1984). También se presenta predisposición a cáncer cérvicouterino (Laga y col., 1991), demostrado en estudios donde se observó que *T. vaginalis* ocasiona que las células cervicales sean irregulares con un patrón nuclear que se asemeja a los observados en lesiones pre y neoplásicas (Zhang y Bergg, 1994). Estudios de mujeres diagnosticadas con cáncer cervicouterino se determinó la presencia de anticuerpos séricos contra *T. vaginalis* y se observó la reactividad positiva de las pacientes estableciendo el aumento más de tres veces en la prevalencia de anticuerpos anti-trichomonas en los pacientes con cáncer cérvicouterino comparado con mujeres control (Sayed el-Ahl y col., 2002). Además, *T. vaginalis* favorece la susceptibilidad al contagio por VIH/SIDA, debido al aumento en concentraciones de partículas virales en mujeres con VIH (Guenthner y col., 2005; Petrin y col., 1998).

### 1.1.2 Tricomonosis en el hombre.

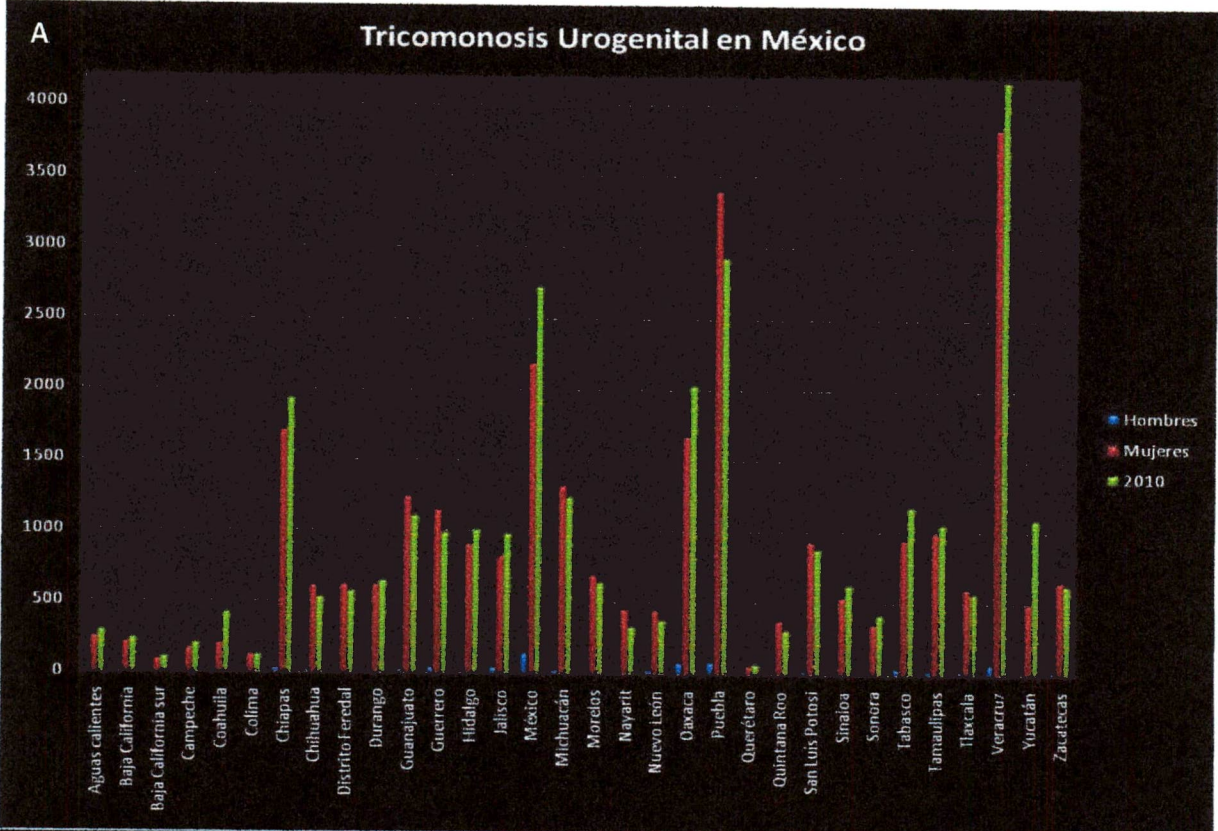
En México, del total de casos de tricomonosis reportados anualmente, solamente el 2.6% de ellos corresponde a pacientes masculinos (SUIVE, 2011), los cuales en su mayoría son asintomáticos. Se ha propuesto que puede deberse a las altas concentraciones  $Zn^{2+}$  que se encuentran presentes en el microambiente de la próstata y que va de 4.5 – 7 mM de  $Zn^{2+}$  que son tricomonocidas (Kriger y col. 1982). No obstante, los signos y síntomas que se pueden presentar en la fase aguda son: uretritis profusa purulenta, disuria, descargas mucopurulentas, prurito y sensación de ardor después del contacto sexual (Krieger y col., 1993). En la fase crónica, los síntomas son: prostatitis y balanopostitis; ocasionando consecuencias como son infertilidad (Tuttle y col., 1977), daño a la próstata, vesícula seminal, vejiga y tracto urinario (Krieger y col., 1995); así como predisposición a cáncer de próstata. Debido a la presencia de anticuerpos anti-trichomonas en pacientes con cáncer de próstata. se determinó la reactividad positiva contra *T. vaginalis* con un 30 % de los casos y 9% de los controles (Sutcliffe y col., 2006; Swygard y col., 2003).

### 1.1.3 Epidemiología

En México la tricomonosis se encuentra en primer lugar de incidencia con respecto a otras enfermedades de transmisión sexual (SUIVE, Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica 2010, 2011), debido a que esta infección no se encuentra bajo un sistema de vigilancia a nivel epidemiológico, el número de casos reportados está subestimado. La Figura 1 muestra la proporción de casos de tricomonosis reportados en mujeres y hombres (Barras verdes) durante el 2010 por entidad federativa. Los estados de Veracruz, Puebla, Estado de México y Chiapas presentan mayor incidencia de tricomonosis (SUIVE, Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica, 2010) y Registro Nominal de SIDA; 2010).

Actualmente hasta la semana 14 del 2011 se reportan 28,325 casos de mujeres y 683 casos de hombre con tricomonosis; de manera interesante al graficar los datos del total de casos de mujeres y hombres del 2010 (Fig. 1, panel A. Barras verdes) con datos de casos del 2011, se muestra una misma tendencia en la prevalencia e incidencia del número de casos de tricomonosis de mujeres (Fig. 1. Panel A. Barras rojas) y de hombres (Fig. 1 panel A y panel B. Barras azules) en los estados mencionados previamente (SUIVE, Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica 2011).

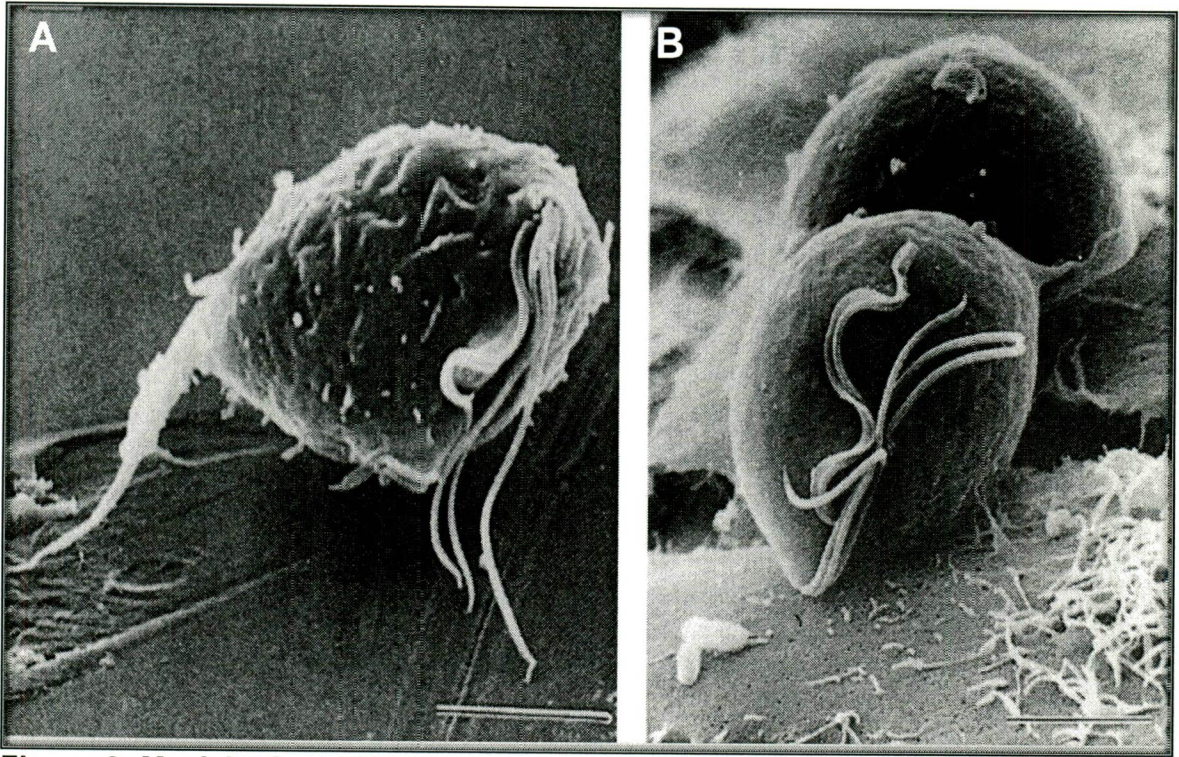
**Figura 1. Gráfica de incidencia de tricomonosis por entidad en la Republica Mexicana 2010-2011.** Los casos de mujeres y hombres presentes en cada estado durante el 2010 (panel A Barras verdes). Número de casos hasta la semana 14 del año 2011 de casos en mujeres (panel A Barras rojas) y casos en hombres (Panel A y B. Barras azules).



Fuente: SUIVE: Sistema Único de Investigación y Vigilancia Epidemiológica, 2010; 2011.

## 1.2 Morfología:

*T. vaginalis* es un parásito urogenital del género *Trichomonas*, que varía en tamaño y forma, presentando en promedio una longitud de 10  $\mu\text{m}$  de largo por 7  $\mu\text{m}$  de diámetro. La forma del protozooario tiende a ser uniforme, cambia de forma de pera a forma oval, además de tener una forma ameboide cuando se une a las células del epitelio vaginal (VECs) (Fig. 2). *T. vaginalis* posee cuatro flagelos anteriores y el quinto adosado a la membrana ondulante, la cual es soportada por la no contráctil costa. La membrana ondulante y el quinto flagelo le otorga la característica de movilidad. Este parásito en condiciones desfavorables de crecimiento, tiende a internalizar sus flagelos y llega a formar pseudoquistes (Honiberg y col., 1990). *T. vaginalis* contienen una estructura rígida denominada axostilo, que disecciona longitudinalmente al parásito, llegando a la parte posterior final en forma de punta. El parásito presenta un citoesqueleto, el cual se encuentra compuesto por fibras de tubulina, actina, centrina, formina, profilina siendo proteínas importantes en la constitución del citoesqueleto. Dineína y kinesinas son las proteínas motoras más importantes, son capaces de moverse a lo largo de hebras de citoesqueleto las fimbrinas son proteínas de unión a actina que interviene en la formación de retículas de microfilamentos (Carlton y col., 2007). Actualmente datos experimentales del grupo de trabajo demuestran la existencia de al menos 2 fimbrinas con número de acceso (gi/123493533, gi/12397260) (Vazquez-Carrillo y col., 2011). El núcleo se ubica en la parte anterior y se encuentra cubierto por una envoltura porosa. También posee gránulos denominados hidrogenosomas que producen hidrógeno molecular el cual es importante para la producción de energía y para el metabolismo del parásito (Müller y col., 1990; 1998).



**Figura 2. Morfología de *Trichomonas. vaginalis*.** Panel A) Forma ovoide o de pera encontrada en secreciones prostáticas u orina. Panel B) Forma ameboide en contacto con células del epitelio vaginal (Arroyo y col., 1995).

### 1.3 Genoma de *T. vaginalis*

El genoma de *T. vaginalis* se distribuye en 6 cromosomas, presentando un tamaño de 160 Mb (Carlton y col., 2007), el 65% de las secuencias son repetidas constituyendo 39 Mb del genoma que pertenecen a familias clasificadas como: transposones, retrotransposones, y virus (Carlton y col., 2007). El genoma contiene ~60,000 genes que codifican para proteínas, ~65 genes contienen intrones; además presenta genes que codifican a todos los 20 RNAs de transferencia (tRNAs) para los 20 aminoácidos que forman las proteínas son: Serina (Ser,S), Treonina (Thr,T), Cisteína (Cys,C), Asparagina (Asn,N), Glutamina (Gln,Q), Tirosina (Tyr,Y), Glicina (Gly,G), Alanina (Ala,A), Valina (Val,V), Leucina (Leu,L), Isoleucina (Ile,I), Metionina (Met,M), Prolina (Pro,P), Fenilalanina (Phe,F) y Triptófano (Trp,W), Ácido aspártico (Asp,D) y Ácido glutámico (Glu,E), Lisina (Lys,K), Arginina (Arg,R) e Histidina (His,H) (Bioquímica de Harper, 2001) y 250 RNAs ribosomales. La presencia de un gen de DICER-like en *T. vaginalis*, 2 genes Argonauta y 41 genes helicasa con caja- DEADDEAH, sugieren la existencia de una ruta de RNA de interferencia (RNAi). Además dentro del genoma existen genes que codifican enzimas involucradas en el metabolismo del aminoácido metionina incluyendo su posible regeneración (Carlton y col., 2007).

*T. vaginalis* contienen más de 75 proteínas GP63-like, homólogas de las proteínas de superficie de *Leshmania major*, que contribuyen a la patogenicidad y virulencia del insecto vector y el huésped humano (Yao y col., 2003). La mayoría de los genes en *T. vaginalis* que codifican a GP63-like poseen dominios que son requeridos para la activación catalítica de metaloproteinasas, incluyendo un pequeño "motif" denominado HEXXH. Por otra parte, dentro del genoma existe un total de 446 genes que codifican para proteinasas, las cuales corresponden a: 6 asparto-proteasas, 220 cisteín-proteasas, 123 metalo-proteasas, 80 serín-proteasas y 17 treonin-proteasas (Carlton y col., 2007).

La transcripción en *T. vaginalis* se da por la participación de un "motif" bien identificado denominado Inr, que es altamente conservado y funciona como sitio de inicio de la transcripción, siendo parecido al Inr de metazoarios.

El Inr de *T. vaginalis* es una secuencia conservada identificada como TCA+1Y(T/C)W(T/A) (Liston y Johnson, 1998; 1999), el cual se encuentra entre 6 a 20 nucleótidos (nt) corriente arriba del codón de inicio AUG de la traducción. Este elemento se encuentra en el 75% de las secuencias 5'UTR de los genes que codifican proteínas del genoma de *T. vaginalis*. (Carlton y col., 2007).

El elemento es reconocido por la proteína de unión a Inr denominada "IBP39". Esta proteína interactúa con el dominio C-terminal de la RNA polimerasa II enzima responsable de transcribir los genes codificantes de proteínas en este parásito. (Liston y Johnson, 1998; Liston y col., 2001; Lau y col., 2006).

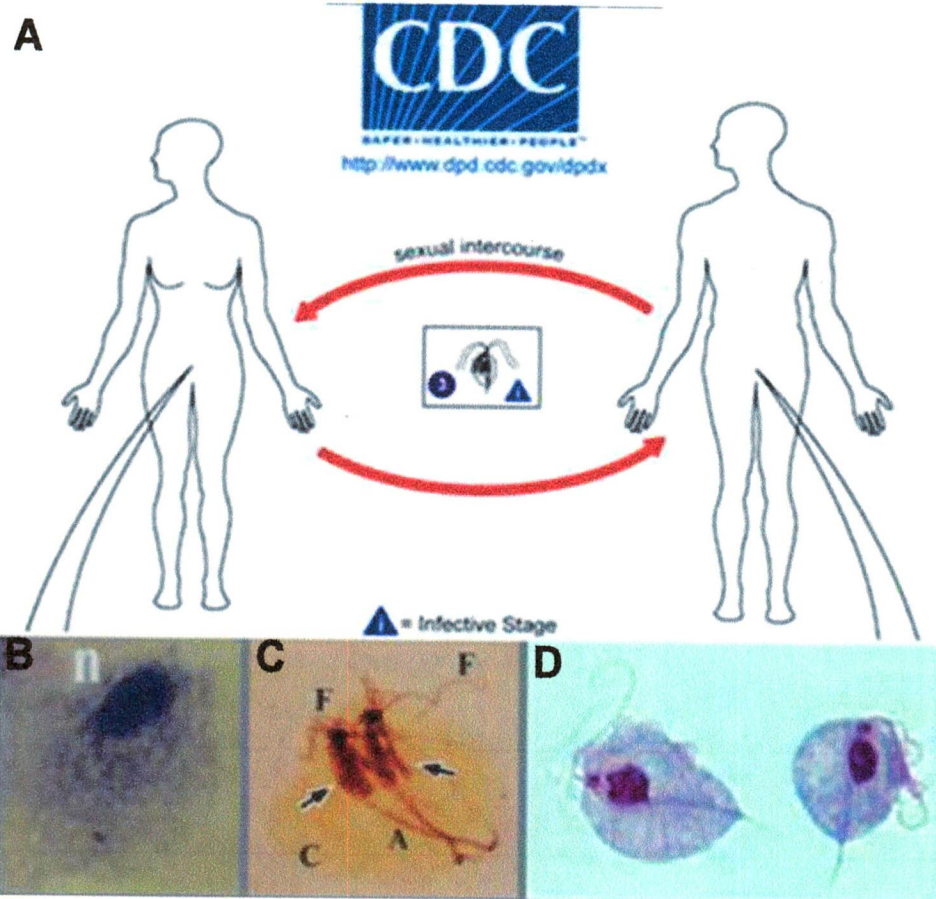
#### **1.4 Metabolismo en *T. vaginalis*.**

El metabolismo, estrés oxidativo y transporte en *T. vaginalis* es con base a carbohidratos como una fuente de energía de mantenimiento vía fermentativa, dentro de condiciones aerobias y anaerobias. El parásito utiliza muchos aminoácidos como sustratos de energía como la ruta mayor de arginina dihidrolasa, para la producción de energía. Las rutas de aminotransferasas y glutamato dehidrogenasa, son probablemente catabólicas pero puede ser reversible para permitir la síntesis de glutamato, aspartato, alanina, glutamato y glicina. Se indica que la ruta de novo de la biosíntesis de lípidos en *T. vaginalis* es conferida por el fosfolipidofosfatidiletanolamina, considerando otros lípidos, incluyendo colesterol, el cual es adquirido exógenamente (Carlton y col., 2007).

#### **1.5 Ciclo de Vida de *T. vaginalis***

La transmisión del parásito es de persona a persona mediante contacto sexual y su duplicación se da por fisión binaria longitudinal sin desaparición de la membrana nuclear esto es mostrado en la figura 3 (Schwenbe y col., 2004).

**Figura 3. Ciclo de vida y transmisión sexual de *Trichomonas vaginalis*.** A) El ciclo de vida de *T. vaginalis* es muy simple ya que solo presenta la forma de trofozoíto, no tiene intermediarios, por lo que se transmite de persona a persona a través del contacto sexual. B-D) este parásito se divide por fisión binaria. (tesis Gómez Conde Eduardo )(adaptado de center for Disease control and prevention", Atlanta Georgia, EUA).



## 1.6 Patogenicidad

*Trichomonas vaginalis* es un parásito capaz de colonizar el tracto urogenital humano. El establecimiento de la infección es dependiente de la participación de moléculas descritas como adhesinas (Lehker y col., 1991; Arroyo y col., 1992; Moreno-Brito y col., 2005), proteinasas de superficie (Arroyo y Alderete, 1998; 1995; Mendoza-López y col., 2000) y receptores que permiten la colonización. La interacción parásito-célula blanco es un contacto de tipo ligando-receptor observado cuando interacciona *T. vaginalis* específicamente con células del epitelio vaginal (VECs), esto desencadena la señalización y un cambio morfológico de ovoide a ameboide con la formación de pseudópodos, esta transformación morfológica es específica hacia células de origen cervical (Arroyo y col., 1993). Otras moléculas implicadas en la patogenicidad son las proteinasas localizadas en superficie del parásito las cuales son responsables del daño al epitelio del tracto genital humano (Alvarez-Sánchez y col., 2000; 2007; Hernández-Gutiérrez y col., 2003; 2004)

### 1.6.1 Citoadherencia

La citoadherencia es el prerequisite para el establecimiento de la infección, permite la interacción del parásito con células del epitelio vaginal le da resistencia al parásito de no ser arrastrado por el flujo de mucosas vaginales o el flujo menstrual, lo cual permite la colonización. Las moléculas involucradas en la citoadherencia se encuentran en la superficie del parásito, permitiendo la interacción parásito-célula. Hasta el momento, se han identificado cinco adhesinas denominadas AP23, AP33, AP55, AP65, AP120 (Arroyo y cols., 1992 y Moreno-Brito y cols., 2005) Las cuales están ligadas a un evento de tipo ligando-receptor altamente específico como prerequisite de patogenicidad (Alderete y cols., 1995). Otras proteínas participantes expresadas durante la citoadherencia a células del epitelio vaginal (VECs) son: la "GTP-BP" proteína de unión a GTP involucrada en el endocitosis (Kucknoor y cols., 2005), la "PDI" proteína disulfuro isomerización con función de chaperona siendo una proteína involucrada en el plegamiento de

proteínas (Kucknoor y cols., 2005). La  $\alpha$ -tubulina es una proteína involucrada en la morfología del parásito (Kucknoor y cols., 2005). Al contacto de *T. vaginalis* con VECs se presenta un cambio morfológico de ovoide a ameboide (Arroyo y col., 1993) ya que la superficie celular de *T. vaginalis* es un mosaico de adhesinas, receptores para proteínas de matriz extracelular del huésped y carbohidratos, que son la base para la unión parásito-célula blanco (Beachey y col., 1998). La adhesión del parásito es regulada por la presencia de hierro, altas concentraciones de este elemento permite que *T. vaginalis* se adhiera mejor a las VECs. (Lehker y cols., 1991). El hierro regula positivamente la síntesis de adhesinas en *T. vaginalis*, reflejando que el parásito necesita mayor adherencia debido al flujo menstrual (Arroyo y cols., 1993). En este proceso de adhesión se encuentra involucrada una cisteín proteinasa de 30 kDa (CP30), localizada en la membrana plasmática, la cual es capaz de ser secretada durante la infección. La CP30 es capaz de degradar hemoglobina, colágeno IV, fibronectina, y laminina, proteínas presentes en el ambiente vaginal (Mendoza-López y cols., 2000).

### **1.6.2 Apoptosis**

*T. vaginalis* es capaz de unirse a neutrófilos de humano e inducir su apoptosis; se ha observado un aumento en la actividad de la caspasa-3 (inductor de apoptosis), así como una reducción en la actividad de Mcl-1; que es una proteína de la familia Bcl-2, que actúa como molécula en el control de la apoptosis (Kang y col., 2006). Además ensayos de parásitos tratados con anticuerpos anti-AP65 describen la reducción de la apoptosis, sugiriendo que la adhesión de *T. vaginalis* a neutrófilos humanos es necesaria para que se lleve a cabo la activación de apoptosis. Además se describe la producción de interleucina 8 (IL-8) y Gro- $\alpha$  (Kang y col. 2004) por neutrófilos humanos estimulados con *T. vaginalis* vivos, estas citocinas reclutan neutrófilos humanos por quimiotaxis lo que puede inducir inflamación vaginal (Kang y col., 2006)

### 1.6.3 Citotoxicidad

En la citotoxicidad, otra propiedad de virulencia del parásito que consiste en el daño a células del huésped por la actividad proteolítica de proteinasas, la expresión y actividad esta regulada por factores ambientales como el pH, la temperatura, la presencia de inhibidores o cationes como el hierro, poliaminas y  $Zn^{2+}$ . (Alderete y Graza, 1985; Alvarez-Sanchez y col., 2008; Vazquez-Carrillo, tesis de maestría, 2009)

Las cisteín proteinasas son el tipo más estudiado en *T. vaginalis*, las cuales degradan proteínas de la matriz extracelular; estas se ubican en citoplasma y en la membrana plasmática del parásito. La actividad proteolítica, transcrito y expresión de estas proteinasas se encuentran reguladas por el hierro (Álvarez-Sánchez y cols., 2007; Hernández-Gutiérrez y cols., 2003; 2004).

En el caso de CP65 se ha observado una regulación mediada por poliaminas a nivel de su actividad proteolítica, transcrito y expresión proteica (Álvarez-Sánchez y cols., 2008). La actividad proteolítica óptima de CP65 se da a un pH de 5.5 a 37°C siendo estas condiciones similares a la de pacientes con tricomonosis. La CP65 es capaz de degradar colágeno IV y fibronectina, pero no laminina 1 ni hemoglobina (Álvarez-Sánchez y cols. 2000).

La CP39 es activa proteolíticamente en un amplio rango de pHs (3.6-9.0) con un pH óptimo de actividad de 7.0, además CP39 degrada colágeno I, III, IV, hemoglobina y inmunoglobulinas humanas A y G, es capaz de unirse a células de epitelio vaginal (VECs) y a células de línea celular de cáncer de próstata (DU-145) (Hernández-Gutiérrez y col., 2004).

### 1.6.4 Fagocitosis

*T. vaginalis* puede fagocitar eritrocitos, bacterias, levaduras y virus. La fagocitosis esta mediada por la interacción de los flagelos anteriores y el flagelo recurrente con la célula a fagocitar, además de la participación de azúcares de superficie como el receptor de D-manosa o L-fucosa que median la internalización

de la célula (Pereira-Neves y col., 2007). La participación de los microfilamentos de actina en la fagocitosis es demostrado en ensayos utilizando citocalasinas bloqueando la función de los microfilamento de actina, observando una reducción en la capacidad del parásito a fagocitar células de levadura, sugiriendo que los microfilamentos participan en dicho proceso (Pereira-Neves y cols., 2007).

### **1.6.5 Hemólisis**

La hemólisis, es utilizada por el parásito para la adquisición de nutrientes como hierro, lípidos y proteínas. Esto es debido a que *T. vaginalis*; carece de muchas rutas de síntesis metabólica, como la síntesis de ácidos grasos, la de lípidos; por lo que los eritrocitos son una fuente de hierro y colesterol, la lisis de eritrocitos mediada por la actividad de cisteín-proteinasas (CPs) denominadas perforinas. Esto ocurre en tres pasos: 1) interacción ligando-receptor, 2) liberación de perforinas y 3) lisis celular (Petrin y cols., 1998).

### **1.6.6 Evasión de la respuesta inmune**

Así mismo *T. vaginalis* es capaz de evadir la respuesta inmune; a través de la degradación de inmunoglobulinas humanas (Igs): IgA, IgG e IgM por la acción de CPs (Provenzano y col., 1995). Estudios utilizando Igs humanas y lisados de *T. vaginalis* resultando que en tiempo y concentración dependiente se presenta la degradación de la cadena pesada de Igs humanas. Esto fue caracterizado con el uso de inhibidores de cisteín proteasas, eliminando por completo la degradación de inmunoglobulinas. Muestras de exudados vaginales de pacientes con tricomonosis fueron utilizados y se observó la degradación de inmunoglobulinas, esto es referido posiblemente como un mecanismo de evasión de la respuesta inmune de *T.vaginalis* al degradar Igs por proteinasas, lo que aumenta la probabilidad de coinfección con otras infecciones de transmisión sexual (Provenzano y col., 1995).

### **1.7 *Trichomonas vaginalis* y Fe<sup>2+</sup>**

Se conoce que el hierro regula positivamente la adhesión, incrementando la síntesis de adhesinas AP23, AP33, AP51, AP65 y AP120 (Lehker y col., 1991; Alderete y col., 1995, Moreno-Brito y col., 2005). Adicionalmente, el hierro regula negativamente a la cisteín-proteínasa CP30 que participa en la citoadherencia de este parásito (Mendoza-López y cols., 2000). Además influye en la regulación negativa de la citotoxicidad reduciendo la actividad proteolítica, transcrito y expresión de CP65 y de CP39 (Álvarez-Sánchez y cols., 2007; Hernández-Gutiérrez y cols., 2003).

Estudios proteómicos indican una expresión diferencial de 45 proteínas en presencia de hierro las cuales participan entre otras funciones en el metabolismo energético, proteólisis y metabolismo hidrogenosomal de *T. vaginalis*. Además se observa que en ausencia de hierro el parásito es capaz de internalizar los flagelos y el axostilo desarrollando una morfología de pseudoquiste (De Jesus y cols., 2007).

### **1.8 Regulación génica en Eucariontes.**

El mecanismo de regulación mediado a nivel transcripcional en eucariontes, esta dado por múltiples elementos de DNA espaciadores, denominados enhancers, son regiones que potencian la transcripción de genes, mientras que los silenciadores son secuencias que permiten la unión de factores de transcripción que inhiben la transcripción (Genes VII, 2002). La regulación puede estar dada en función de cationes como hierro o zinc, la cual requiere de los elementos de regulación al metal (MRE), los cuales son sitios corriente arriba del codón de inicio AUG de genes inducidos por la presencia del catión, estos MRE son reconocidos por factores de transcripción, estos son importantes en la regulación de la transcripción de genes en condiciones de crecimiento en presencia de cationes.

## 1.9 Regulación génica en *T. vaginalis*.

En *T. vaginalis* fue utilizada la región 5'-UTR del gen *ap65-1* como modelo de estudio de la regulación transcripcional en presencia de hierro en este parásito, lo que demostró que la secuencia consenso: AGATAACGA, corresponde al promotor en respuesta a hierro, además de manera interesante, se identificó el sitio de unión a la proteína MYB-like (Tsai y col., 2002). A nivel post-transcripcional, se ha propuesto un mecanismo que involucra elementos de regulación en "trans" como son las proteínas citoplasmáticas de regulación de hierro (IRP-1 y IRP-2) y elementos de regulación en "cis" que son elementos de respuesta a hierro (IREs) presentes en las regiones no traducidas (UTR's) 5' y 3' denominado como "sistema IRE/IRP". La unión de IRE por IRP puede inhibir la traducción o degradación de mRNAs dependiendo de la localización de UTR's 5' o 3'; esto está descrito para el gen *tvcp4* de *T. vaginalis* (Solano-González y cols., 2007).

Los elementos de respuesta a hierro (IREs) son estructuras tallo-burbuja que contienen dos regiones de unión para IRPs, la región consenso es CAGUGN (C<sub>1</sub> G<sub>5</sub>) y una menos común UAGUAN (U<sub>1</sub> A<sub>5</sub>) (Henderson y col., 1994) la mutación en estas regiones reduce la unión a estos elementos por la IRP (Laing y Hall, 1996). Numerosos estudios tienden a reportar IREs atípicos los cuales permiten la interacción con IRPs. Sin embargo, son mutantes de la secuencia canónica y son llamados IREs atípicos, un ejemplo claro es la identificación en la estructura 5'-UTR de la subunidad de 75 kDa del complejo 1 de la mitocondria (Lin y col., 2001). Las proteínas IRP en vertebrados son dos (IRP1 y IRP2) los cuales se unen a IREs con una afinidad de ( $K_d \approx 10^{-12}$  M) la forma de las proteínas tiene 57% de identidad y 75% de similitud. Ambas proteínas son proyectadas conteniendo 3 dominios compactos unidos a un cuarto dominio por una región bisagra teniendo una masa molecular de 98 kDa para IRP1 y 105 kDa para IRP2 debido a la inserción de 73 aminoácidos. Estas proteínas tienen homología con la aconitasa mitocondria pero solo la IRP1, resulta con esta actividad y al parecer la IRP2 perdió esta actividad durante la evolución (Rouault y Klausner, 1997; Panopoulos, 2004).

## 1.10 Regulación génica por poliaminas en *T. vaginalis*

Las poliaminas son pequeños cationes que regulan algunas propiedades de virulencia en este parásito, esto se encuentra descrito para cuatro adhesinas (García y col., 2005) y para el gen de *tvcp65* (Alvarez-Sanchez y col., 2008).

*T. vaginalis* carece de la ruta de síntesis de novo de espermina, por lo cual obtiene esta molécula de su hospedero mediante un sistema antiporte acoplada a la secreción de dos moléculas de putrescina por cada molécula de espermina. En pacientes con tricomonosis se encuentra presente en gran cantidad la enzima ornitina descarboxilasa (ODC), la cual participa en la vía de síntesis de la arginina hidrolasa que conduce a la producción de ATP. En personas sanas la putrescina y otras diaminas no son detectadas en secreciones vaginales, sugiriendo que el parásito produce putrescina durante la infección (Yarlett y col., 2000).

La espermina es convertida a espermidina dentro de los hidrogenosomas, vía espermidina N<sup>1</sup>-acetiltransferasa (SSAT)/ poliamina oxidasa. Esta enzima cataliza la transferencia de un grupo acetil de la acetil-CoA a un nitrógeno aminopropil terminal proveniente de la espermina o espermidina, los cuales son metabolizados de espermidina y putrescina por la acción de una poliamina oxidasa (Yarlett y col., 2000).

La inhibición de ODC por el inhibidor reversible 1-4 diamino butano (DAB) resulta en la reducción significativa de putrescina y ODC, los cuales incrementan al agregar putrescina exógena, reactivando el sistema antiporte (García y col. 2005).

Las poliaminas regulan la adquisición de hierro en las células de mamíferos, mediante la formación de complejo poliaminas-hierro incorporado a la vía de sistema de transporte de poliaminas. Se ha observado que la adición de espermina y espermidina a un medio con bajo hierro y DAB, no restaura el crecimiento celular. Contrariamente, al arrestar el crecimiento con DAB en un medio con hierro incrementa la cantidad de adhesinas, sugiriendo que la

transcripción y traducción de los genes de adhesinas no requieren del metabolismo de poliaminas en *T. vaginalis*.

Actualmente se encuentra descrito que el gen de *tvcp65*, en cuanto a RNAm, en cantidad de proteína y actividad proteolítica, así como su localización, se ve disminuida en parásitos crecidos en presencia del inhibidor DAB, lo que disminuye los niveles de citotoxicidad. Esto de manera interesante se revierte cuando se agrega al medio putrescina exógena reactivando la expresión y síntesis de TvCP65 (Alvarez-Sánchez y col., 2008).

### 1.11 El $Zn^{2+}$

El  $Zn^{2+}$  interviene en procesos bioquímicos necesarios para el desarrollo de la vida de los organismos. Entre estos cabe destacar la respiración celular, la utilización de oxígeno por parte de la célula, la reproducción tanto de ADN como de ARN, el mantenimiento de la integridad de la membrana celular y la eliminación de radicales libres, proceso que se hace a través de una cascada de sistemas enzimáticos. Este catión actúa como cofactor y como integrante de al menos 300 enzimas (Maret y col., 2009), como aldolasas, deshidrogenasas, esterasas, peptidasas, fosfatasa alcalina, anhidrasa carbónica, superóxido-dismutasa y ADN y ARN polimerasas, implicadas en el metabolismo energético y de los hidratos de carbono, en las reacciones de biosíntesis y degradación de proteínas, en procesos biosintéticos de ácidos nucleicos y compuestos hemo, en el transporte de  $CO_2$ . (Andreini, y col., 2006; Maret y col., 2009). Incluso, el proteoma total de un organismo Eucarionte contiene 8.8% proteínas que unen  $Zn^{2+}$  comparado con organismos de Bacteria and Archaea que presentan 5 - 6 % proteínas que unen  $Zn^{2+}$ , esto refleja la importancia y el requerimiento de este catión por los distintos organismo (Andreini, y col., 2006).

## 1.12 El $Zn^{2+}$ en otros eucariontes.

El  $Zn^{2+}$  es un nutriente esencial de muchos organismos.  $Zn^{2+}$  forma un centro catalítico de numerosas enzimas y tiene una función estructural en un amplio rango de proteínas. Sin embargo, este metal puede ser tóxico si se une inapropiadamente y compromete la función celular (Maret y col. 2009). En gran medida los organismos buscan mantener el  $Zn^{2+}$  a un nivel intracelular óptimo en presencia del catión, ya sea en condiciones limitadas o de exceso de  $Zn^{2+}$ . Por ejemplo en *S. cerevisiae*, el gen de ZRT1 que codifica a proteína de transporte que introducen el  $Zn^{2+}$ , la expresión del gen ZRT1 aumenta la captación de  $Zn^{2+}$  incrementando su afinidad por este catión cuando existen condiciones limitadas de  $Zn^{2+}$ , mientras que en condiciones de exceso de  $Zn^{2+}$ , la expresión de ZRT1, somete al  $Zn^{2+}$  a endocitosis y es degradado en vacuolas. Sin embargo los factores de transcripción son sensibles al  $Zn^{2+}$  y se encuentran en hongos, mamíferos, peces y posiblemente en plantas, lo que sugiere que el control de la transcripción de los genes implicados en la homeostasis del  $Zn^{2+}$  es de gran importancia universal (Dalton y col., 2000; Grotz y cols. 1998).

En los mamíferos, MTF-1 es una proteína de 72.5 kDa que contiene seis dedos de  $Zn^{2+}$  tipo C2H2 y tres dominios de activación (Brugnera y col., 1994). Esta proteína juega un papel central en la protección de las células contra la toxicidad del  $Zn^{2+}$ . Esto es en parte logrado por el aumento en la expresión de MT-1 y MT-2, dos genes que codifican para metalotioninas de unión a  $Zn^{2+}$  (Heuchel y col., 1994). MTF-1 también reduce los niveles citoplasmicos de  $Zn^{2+}$  mediante la regulación de la expresión de un sistema de flujo de salida de  $Zn^{2+}$  codificado por el gen ZnT-1 (Langmade y cols. 2000). El blanco principal putativo de MTF-1 es hZTL1, un gen que codifica para un transportador de absorción de  $Zn^{2+}$  que se localiza en la membrana apical de los enterocitos que son células de intestino encargadas de absorber los nutrientes al interior del humano (Cragg y col., 2002).

Las proteínas Zap1 y MTF 1-tienen una serie de características comunes como: funcionan como activadores de la transcripción influyendo en los dominios de transactivación y en los dominios de unión al DNA que contienen dedos de  $Zn^{2+}$  tipo C2H2. Zap1 contiene dos dominios ácidos de activación (Zhao y col., 1997). El primer dominio de activación se encuentra en el amino terminal en una región rica en cisteína y residuos de histidina. El segundo dominio de activación se encuentra en una región que contiene dos dominios de dedos de zinc tipo C2H2 (Bird y col., 2003). Otros cinco dominios de dedos de zinc Carboxilo-terminal son esenciales para la actividad de Zap1 para la unión al DNA (Evans y col., 2003; Bird y col., 2000).

### **1.13 El proteoma humano de $Zn^{2+}$**

Los proteomas de  $Zn^{2+}$  de distintos organismos difieren en un 4 y 10 % de los genes que codifican a proteínas que requieren  $Zn^{2+}$ . Aproximadamente el 10% del genoma humano codifica para proteínas de  $Zn^{2+}$  llegando a ser aproximadamente 3000 proteínas (Andreini y cols. 2006). A continuación se mencionan las proteínas de  $Zn^{2+}$  que han sido anotadas: 397 hidrolasas, 302 ligasas, 167 transferasas, 43 oxidoreductasas y 24 liasas/isomerasas. Además son 957 factores de transcripción, 221 proteínas de señalización, 141 proteínas de transporte/almacenamiento, 53 proteínas con sitios estructurales de unión al metal y 19 proteínas relacionadas con mecanismo de reparación, replicación y traducción, además estas proteínas son 427 proteínas dedos de  $Zn^{2+}$  y 456 proteínas de función de desconocida. Con estos datos se puede conocer el impacto del  $Zn^{2+}$  en la fisiología humana y la extensa regulación del control celular dada por este catión. Sin embargo las bases de datos no pueden identificar sitios donde se puede unir el  $Zn^{2+}$  transitoriamente, ni donde difieren proteínas/cadenas peptídicas que suministran los ligandos para la unión del  $Zn^{2+}$  y ni donde el orden de los ligandos no son secuenciales en la cadena peptídica o donde los ligandos de unión son sitios multi-metal (Maret y cols. 2004).

La abundancia de las interacciones proteína-Zn<sup>2+</sup> sugieren que la dimensión del proteoma humano de Zn<sup>2+</sup> tendría que continuar siendo explorado (Maret y col. 2009).

Por otra parte, en *E. histolytica* se ha descrito que el Zn<sup>2+</sup> inhibe la actividad de cisteín proteinasas ocasionando una disminución de la adhesión y del daño celular del parásito al huésped. Esto fue demostrado mediante el análisis de Zimogramas usando geles de sustrato con azocaseína y gelatina que a concentraciones de 1.0 – 25 mM de ZnCl<sub>2</sub> se bloquea la actividad proteolítica en un 70% de cisteín-proteinasas de lisados de trofozoítos. La inhibición fue reversible al utilizar L-cisteína y L histidina. Estos resultados muestran que las concentraciones de Zn<sup>2+</sup> pueden interferir con la citotoxicidad de *E. histolytica* inhibiendo el daño celular (Franco y col., 1999).

#### **1.14 *Trichomonas vaginalis* y Zn<sup>2+</sup>**

Estudios han demostrado que el Zn<sup>2+</sup> en altas concentraciones  $\geq 1.6$  mM de Zn<sup>2+</sup> disminuyen la adhesión y la citotoxicidad de *T. vaginalis* sobre con monocapas de células prostáticas DU-145 (Vázquez-Carrillo, tesis de maestría, 2009; Vázquez-Carrillo y col., 2011). El Zn<sup>2+</sup> es un catión muy importante clasificado como el segundo metal de ingesta en la dieta humana. El contenido corporal promedio en el hombre adulto varía entre 1.4 a 2.3 g (McCance y Widdowson 1942); las mayores concentraciones se encuentran en el hígado, músculos voluntarios, hueso, próstata y ojos. En el microambiente de la próstata, existen concentraciones elevadas de Zn<sup>2+</sup> las cuales se encuentran entre 4.5 a 7 mM las cuales son descritas como tricomonocidas; aunque concentraciones menores de este catión permite el establecimiento de *T. vaginalis* (Kriger y col.1982).

El proteoma de *T. vaginalis* obtenido mediante geles de doble dimensión (2-DE), de parásitos crecidos en presencia y ausencia de Zn<sup>2+</sup>, se mostraron aproximadamente 150 manchas en el presencia de 1.6 mM de Zn<sup>2+</sup>, comparado con 170 manchas en parásitos crecidos en ausencia de Zn<sup>2+</sup>, las proteínas

detectadas de ubican entre el punto isoeléctrico (pI) 4-7 con masas moleculares entre 20 y 250 kDa. Los geles muestran cambios en el perfil de proteínas con una expresión diferencial de 27 proteínas en presencia de  $Zn^{2+}$ . La mayoría de las proteínas expresadas diferencialmente tuvieron pesos moleculares entre 50 y 100 kDa. Mediante Western blot utilizando suero proveniente de un paciente masculino con tricomonosis se obtuvo el inmunoproteoma de *T. vaginalis* en ausencia y presencia de 1.6 mM de  $Zn^{2+}$ . Las manchas que tuvieron una sobreexpresión e inmunodetección diferencial en presencia de  $Zn^{2+}$  fueron analizadas por espectrometría de masas (MS). El resultado mostró que los péptidos identificados y cuya secuencia fue analizada por MASCOT presentaron identidad para: fimbrinas (gi|123493533, gi|123397260), adenosylhomocysteinasa (gi|123499896,gi|123488577), asparaginil endopeptidasa-like cistein-peptidasa (gi|123408789) y aminopeptidasa p-like metaloproteasa (gi|123445672) (Vazquez-Carrillo y col., 2011). El análisis del proteoma e inmunoproteoma, permitió la identificación de una metaloproteinasas de 50 kDa sobreexpresada e inmunodetectada diferencialmente por el suero de pacientes masculinos con tricomonosis (Vazquez-Carrillo y Col., 2011). Por lo cual es de gran importancia el análisis y caracterización de la metaloproteinasas lo cual nos permitirá entender su posible participación en la tricomonosis en el hombre.

Debido a la relevancia de este tipo de moléculas en el proyecto, a continuación se detallan algunos aspectos importantes.

### **1.15 Metaloproteinasas**

Metaloproteinasas (o metaloproteasas) constituyen una familia de enzimas del grupo de las proteasas, clasificados por la naturaleza del grupo funcional más destacado en su sitio activo. Estas son las enzimas proteolíticas cuya catalítico mecanismo consiste en un metal. La mayoría de las metaloproteasas son dependientes de zinc, pero algunos de cobalto uso. El ión metálico se coordina para que la proteína a través de tres ligandos. Los ligandos de coordinación de los iones metálicos pueden variar con la histidina, el glutamato, aspartato, lisina y

arginina. La posición de coordinación cuarto está ocupado por una molécula de agua lábil.

Existen dos subgrupos de las metaloproteinasas de:

exopeptidasas: metaloexopeptidasas

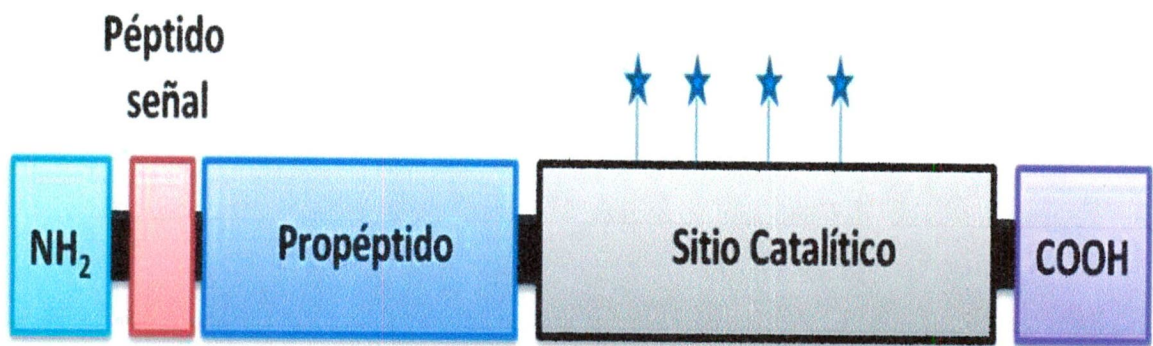
endopeptidasas: metaloendopeptidasas. Metaloendopeptidasas conocidos son proteínas ADAM y metaloproteinasas de la matriz.

El tratamiento con agentes quelantes tales como EDTA lleva a la inactivación completa. EDTA es un quelante de metales, que elimina el zinc, que es esencial para la actividad. También son inhibidas por el ortofenantrolina quelante.

Existen metaloenzimas que contienen  $Zn^{2+}$  en su estructural y se encuentran involucradas en funciones inmunes, reproductivas, neurológicas y del sistema cardiovascular (McCall y col., ,2000). Las metaloproteinasas son proteínas que degradan enlaces peptídicos y se dividen generalmente en: endopeptidasas y exopeptidasas. Las metaloproteinasas participan en muchos procesos biológicos como: morfogénesis, procesamiento de hormonas peptídicas, liberación de citocinas (Westermarck y col., 1999). Sin embargo, una función aberrante en su actividad proteolítica da como resultado enfermedades como: artritis, fallas en el sistema cardiovascular, osteoartritis, enfermedades autoinmunes y cáncer (Cascales y cols., 2010).

Las metaloenzimas se pueden clasificar en función de la especificidad del sustrato como: colagenasas, gelatinasas, estromelinas y matrilisinas; actualmente se clasifican con base a la estructura de la enzima (Vincenti y col., 2002). La estructura básica de las metaloproteinasas presenta una serie de dominios característicos como son: un péptido señal que dirige su secreción al exterior de la célula, un propéptido que mantiene a la enzima inactiva hasta que sufre un corte proteolítico y un dominio catalítico carboxilo terminal que une  $Zn^{2+}$  (fig. 4) (Egeblad y col., 2002; Chang y col., 1992).

**Figura 4. Estructura básica de una metaloproteínasa.** La estructura se compone de un péptido señal que permite la ubicación subcelular o la secreción de las proteínasas (rosa), un propéptido que permite el control de activación de las proteínasas (azul) y un dominio catalítico (verde) donde se ubica el sitio catalítico. Aquí se lleva a cabo la interacción (flechas rojas) con el catión como ejemplo el  $Zn^{2+}$  (pentágono naranja). Además de la unión del sustrato (flechas verdes), estos dominios esta formados por la relación de los aminoácidos Histidina (H), Ácido aspártico(D) , Ácido glutámico(E) o Lisina (L).



Aminoácidos: H,D,E o L.

La base de datos MEROPS clasifica a las proteinasas en función de la relación filogenética de su estructura terciaria y dominio catalítico en clanes y familias. El clan contiene a todas las proteinasas que surgen de un ancestro común (Reeck y cols., 1987). Estos clanes contienen una o más familias que muestran evidencia de su relación evolutiva por sus similitudes en estructura terciaria. En ocasiones cuando sus estructuras no están disponibles se analizan el orden de los residuos del sitio catalítico en la cadena polipeptídica y a menudo los “motifs” de secuencia común alrededor de los residuos del sitio catalítico. Cada clan es identificado con dos letras, la primera representa el tipo catalítico de la familia incluyendo en el clan con la letra “P” que es utilizada para el clan que contiene más de una familia de los tipos catalíticos como: serína, treonina y cisteína. Por lo tanto para aspártico-proteasas (A), cisteína-proteasas (C), Glutámico-proteasas (G), Metallo-proteasas (M), Asparagina-proteasas (P), serína-proteasas (S), treonina-proteasas (T) y las no asignadas (Rawlings y col., 2010).

Las metaloproteinasas están divididas en 15 clanes denominados como: MA, MC, MD, ME, MF, MG, MH, MU, MK, MM, MN, MO, MP, MQ y las no asignadas (Rawlings y Barret 1993). Las estructuras terciarias son analizadas en cada uno de los miembros de cada uno de los clanes excepto en el ME. Estos muestran algunos grados de similitud entre la estructura terciaria dentro de los miembros de los clanes MC, MF y MH, pero la posición relativa de los ligandos no son conservadas, por lo que no se considera un origen común entre estos clanes (Rawlings y Barrett, 1993; Barrett y Rawlings, 1995).

Dentro de la clasificación el clan MG que contiene principalmente exopeptidasas que requieren iones co-catalíticos como el  $Zn^{2+}$  o  $Mg^{2+}$ . La estructura determinada en *E. coli*, la metionil aminopeptidasa, muestra dos dominios estructurales con un sitio activo entre los dominios que son estructuralmente similares. Esto podría explicar que surgió de una duplicación de un gen ancestral por un evento de fusión génica (Roderick y Matthews, 1993; Handbook of proteolytic enzymes, 2000)

### **1.16 Importancia biológica de las metaloproteinasas.**

Las metaloproteinasas participan en variedad de procesos biológicos; su actividad proteolítica se encuentra dirigida contra proteínas de la matriz extracelular, autoactivación de proteasas, reciclamiento de aminoácidos, entre múltiples procesos que involucran un corte proteolítico. Esto es controlado a tres niveles: transcripción, activación de la proenzima e inactivación (Folgueras y col., 2004). Por otro lado las metaloproteinasas se ven implicadas en mecanismos como: estabilidad del mRNA, eficiencia traduccional, compartimentación y secreción enzimática, reclutamiento en la membrana celular, selección de sustrato, su liberación, oligomerización, incorporación, internalización celular y finalmente autólisis (López-Otín y col., 2008). Las metaloproteinasas son consideradas enzimas con actividad proteolítica involucrada en la remodelación de la matriz extracelular, la cual es esencial para muchos procesos biológicos como: desarrollo embrionario, recuperación de la herida, migración celular, angiogénesis, reparación y remodelación del tejido, así como para el crecimiento (Chang y col., 1992).

La ausencia de control en la actividad de las metaloproteinasas puede llevar a una excesiva degradación o remodelación de la matriz extracelular (ECM), lo cual se observa en algunas condiciones patológicas como: artritis, fallas en el sistema cardiovascular, osteoartritis, enfermedades autoinmunes y cáncer (Lowther y col., 2002; Cascales y col., 2010).

### **1.17 Metaloproteinasas en *Trichomonas vaginalis*.**

En el genoma de *T. vaginalis* existe un total de 446 genes que codifican para proteinasas, las cuales corresponden a: 6 asparto-proteasas, 220 cisteína-proteasas, 123 metalo-proteasas, 80 serina-proteasas y 17 treonina-proteasas (Carlton y col., 2007).

En *T.vaginalis* se han identificado 2 metaloproteinasas con pesos moleculares de >220 y 140 kDa, estas metaloproteinasas fueron identificadas mediante el uso de inhibidores como: Ácido etilendiaminotetraacético y ácido etilenglicoltetraacético (EDTA y EGTA) (Bóznér y col., 1991); su actividad óptima se encuentra en un pH de 8-9 (Graham y col., 1991).

Asimismo se reportó la identificación y caracterización de una metaloproteína de 47 kDa correspondiente a la metaloproteína de procesamiento de hidrogenosoma de la subunidad  $\beta$  ( $\beta$ HPP), la cual fue clonada, expresada y purificada la metaloproteína recombinante y fue comparada la actividad con la metaloproteína nativa, además la actividad fue determinada por la activación con  $MnCl_2$  y disminuyendo drásticamente con el uso de EDTA, determinando la función de metaloproteína (Brown y cols., 2007).

### **1.18 Antecedentes directos**

Estudios de proteómica e inmunoproteómica de *T. vaginalis* en presencia de  $Zn^{2+}$  demuestran la expresión diferencial de 27 proteínas, de las cuales fueron identificadas por MS; obteniendo interesantemente proteínas correspondientes a: fimbrinas (gi|123493533, gi|123397260), adenosylhomocisteinasa (gi|123499896,gi|123488577), asparaginil endopeptidasa-like cisteína-peptidasa (gi|123408789) y aminopeptidasa p-Like metaloproteasa (gi|123445672). De acuerdo con estos resultados, se destaca la sobre-expresión diferencial de una metaloproteína de 50 kDa, denominada por el grupo TvMP50, expresada en condiciones de  $Zn^{2+}$  e inmunodelectada por sueros de pacientes masculinos con tricomonosis, lo que nos lleva a sugerir que la caracterización e identificación de la metaloproteína podría ser una herramienta importante para ser utilizada en el inmunodiagnóstico de la tricomonosis masculina (Vazquez-Carrillo y col.,2011).

## 2. Justificación y Objetivos del trabajo

### 2.1 Justificación

El proteoma de *T. vaginalis* en presencia de  $Zn^{2+}$  presenta la expresión diferencial de una metaloproteinasas de 50 kDa, la cual es inmunogénica en pacientes masculinos con tricomonosis. La caracterización de TvMP50 es relevante para el entendimiento de la tricomonosis en el hombre.

### 2.2 Hipótesis

El  $Zn^{2+}$  regula positivamente la expresión de TvMP50 en *T. vaginalis*

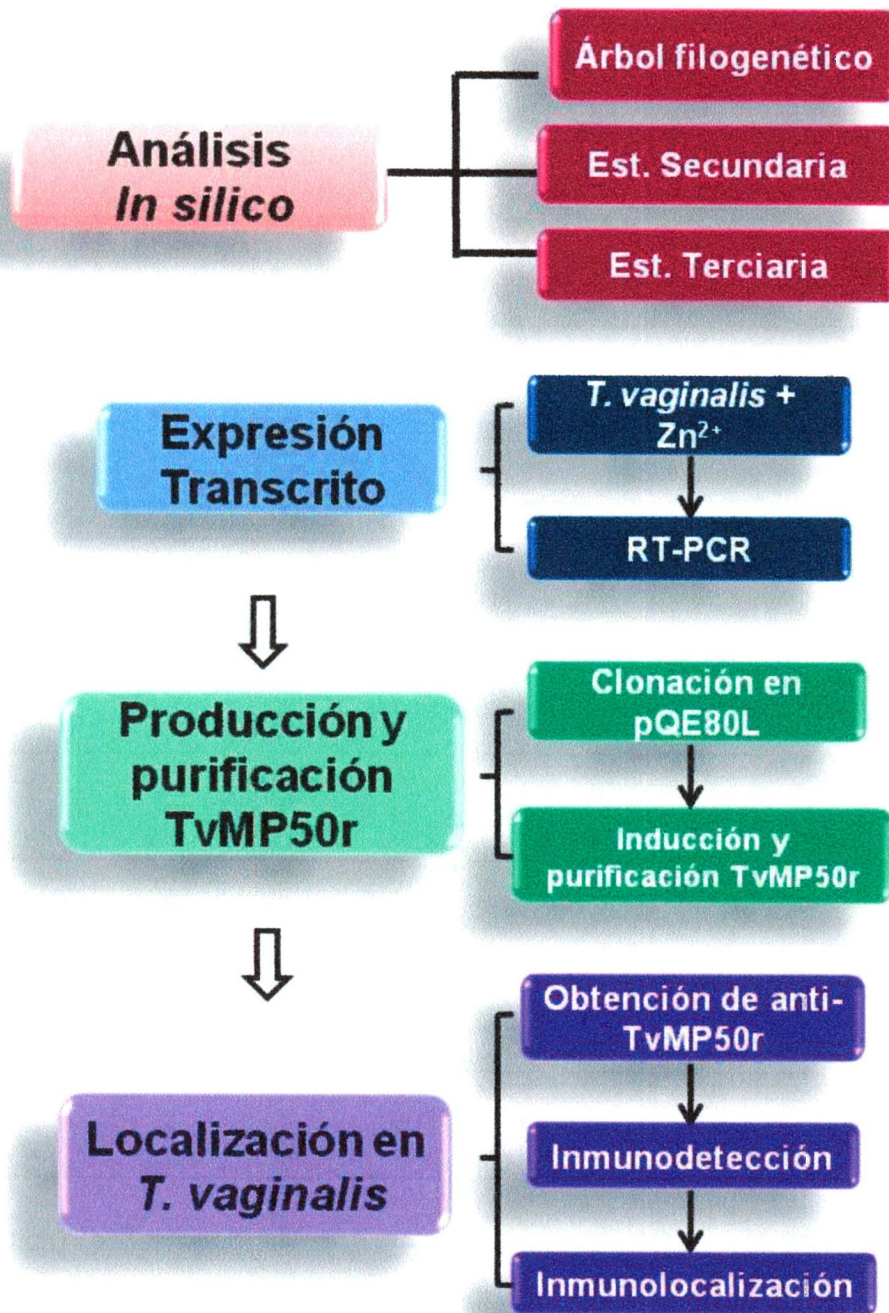
### 2.3 Objetivo general

Caracterizar la TvMP50 de *Trichomonas vaginalis* expresada en presencia de  $Zn^{2+}$

### 2.4 Objetivos particulares:

- 1.-Análizar *In silico* de la TvMP50 de *T. vaginalis*.
- 2.-Determinar la expresión del transcrito de TvMP50 en presencia y ausencia de  $Zn^{2+}$  de *T. vaginalis*.
- 3.- Obtener y expresar la TvMP50 recombinante de *T. vaginalis*
4. Inmunolocalizar e inmunodetectar a TvMP50 en *T. vaginalis*.

## 2.5 Estrategia experimental



### 3. Materiales y métodos

#### 3.1 Análisis bioinformático.

A partir de la identificación de los péptidos por espectrometría de masas, se realizó una búsqueda en el programa MASCOT identificando una metaloproteinasa de 50 kDa clasificada en el clan MG, familia M24 para lo cual se realizó el análisis bioinformático utilizando la base de datos: TrichDB (<http://trichdb.org/trichdb>), en la cual se obtuvo la secuencia completa del gen *mp50* y la secuencia completa de aminoácidos. Además en la base de datos MEROPS ([merops.sanger.ac.uk](http://merops.sanger.ac.uk)) fueron obtenidas las secuencias homólogas a la proteína TvMP50. Mediante el uso del programa Jalview 2.6.1 ([www.jalview.org](http://www.jalview.org)) se llevó a cabo el alineamiento de las secuencias homólogas a TvMP50 y se eliminó la redundancia de las secuencias hasta en un 30%. El árbol filogenético se realizó con el programa MEGA 4.0.2 con el algoritmo de Neighbor-joining con la prueba de Bootstrap de 1000 repeticiones. También se realizó el análisis de la estructura secundaria de la proteína TvMP50 con el software Jalview 2.6.1. Por otra parte, el análisis de la estructura 3D teórica se realizó utilizando el programa Swiss-model (<http://swissmodel.expasy.org>) y fue usado el servidor Phyre para el modelaje de la proteína. La identificación de los aminoácidos que corresponden al sitio catalítico fue realizado con el programa Clustal W ([www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2)) mediante un alineamiento de la proteína TvMP50 (MER082185) con las proteínas Xaa-prolidasa de *Homo sapiens* (MER001248) y la Xaa-proaminopeptidasa de *E.coli* (MER001244). La secuencia de la TvMP50 fue agregada al banco de secuencias GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)) los nombres fueron *mp50* para el gen y TvMP50 para la proteína, con número de acceso: JF263458.

### **3.2 Cultivo de parásitos *T. vaginalis***

Los aislados de mujer CNCD147 y de hombre HGMN 01, se cultivaron en medio TYM (tripticasa-extracto de levadura-maltosa), complementado con 10% de suero de caballo inactivado por calor (30 min a 56°C), por 24 h / 37°C en presencia de  $Zn^{2+}$  (1.6 mM de  $Zn^{2+}$ ) y en ausencia de  $Zn^{2+}$ , para obtener los parásitos en fase logarítmica de crecimiento.

### **3.3 Extracción de DNA genómico de *T. vaginalis***

20 x 10<sup>6</sup> parásitos se lavaron tres veces con 1 ml PBS pH 7.0, se centrifugaron a 1800 rpm/ 5 min en cada lavado; posteriormente, se resuspendieron en 2 ml PBS pH 7.0, se agregó el amortiguador de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, SDS 0.2%, NaCl 100mM, EDTA 10 mM), fenol y se agitaron por inversión. Se centrifugaron a 13,000 rpm/5 min/4°C. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo de 1.5 ml, y se le adicionó fenol y cloroformo en una relación 1:1 y fue centrifugado a 13000 rpm/5 min/4°C, la fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo y se precipitó con 500 µl de etanol y acetato de sodio 3M, después se incubaron a -20°C/2 h, luego se centrifugaron a 13,000 rpm/15 min/4°C, fue decantado el sobrenadante y la pastilla se lavó con etanol frío al 70% y se centrifugó a 13,000 rpm/15 min, una vez finalizados los lavados la pastilla se dejó secar y se resuspendió en agua libre de nucleasas. La cuantificación se realizó por espectrofotometría a 260 nm.

### **3.4 Extracción de RNA Total de *Trichomonas vaginalis*.**

20 x 10<sup>6</sup> parásitos, se centrifugaron a 1800rpm/15 min/4°C y se resuspendieron en PBS pH 7.0, después se agregó 1 ml de trizol frío, se mezcló por inversión y se incubó por 10 min/ TA y 30 min/4°; luego se agregó cloroformo y se mezcló a T.A y se centrifugó a 10,000 rpm/15 min/4°C. El RNA presente en la fase acuosa se precipitó con 1 ml de isopropanol, después se mezcló e incubó 15 min/ T. A. y posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm/15min/4°C. El sobrenadante se decantó, la pastilla se lavó con etanol al 75%, se centrifugó a 10,000 rpm/15 min/ 4°C y la pastilla se secó a T. A. y se resuspendió en agua-DEPEC.

### 3.5 Síntesis de cDNA.

A 1 µg de RNA se le adicionó 1 µl de oligo dT y cbp 12 µl de agua DEPC, después se incubó a 70°C/15 min y se colocó en hielo durante 5 min, luego se agregó 2µl dNTPs, 2 µl DTT, 4 µl amortiguador 5x, y se incubaron a 42°C/ 2 min, se colocaron en hielo y se agregó la 1µl transcriptasa reversa (RT). La mezcla se incubó a 42°C/ 50 min y a 70°C / 10 min.

### 3.6 Amplificación por PCR del gen de *mp50* de *T. vaginalis*.

Para la amplificación del gen, se diseñaron los oligonucleótidos a los cuales se les adiciono el sitio de corte para las enzimas de restricción *BamHI* y *HindIII*. Para la reacción de PCR se usaron 10 pmol de los oligonucleotidos sentido y antisentido, dNTP [0.2 µM], MgCl<sub>2</sub> [1.5 µM], cDNA del aislado CNCD147 de *T. vaginalis* crecido en condiciones de 1.6 mM de Zn<sup>2+</sup>, Taq polimerasa y agua inyectable.

Los iniciadores utilizados para la amplificación del gen *mp50* fueron:

sentido 5'GCCGGATCCATGTCAGGTGACGAATTC 3'

antisentido: 5'CGCAAGCTTTCAAACTACTCTTGAAGC 3',

La secuencia subrayada corresponde al sitio de corte de las enzimas de restricción *BamHI* en el iniciador sentido y *HindIII* en el iniciador antisentido.

El programa utilizado fue:

94°C 2min	1 ciclo
94°C 1min	} 30 ciclos
55°C 1.4min	
72°C 2 min	
72°C 7min	1 ciclo

Para llevar a cabo la PCR-colonia se utilizaron los oligonucleótidos del vector pQE-80L

Sentido: 5'-CGGATAACAATTTACACACAG 3'

antisentido: 5'GTTCTGAGGTCATTACTGG-3'

el programa utilizado fue:

94°C 2 min	}	1 ciclo
94 °C 1min		30 ciclos
50°C 1:50 min		
72°C 2 min		
72°C 7min	1 ciclo	

Para la amplificación del gen de *β-tubulina* se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

BTUB9 5'-CATTGATAACGAAGCTCCTTTACGAT-3'

BTUB2 5'-GCATGTTGTGCCGGACATAACCAT-3'

### 3.7 Preparación de células competentes *E. coli* DH5α y M15.

La cepa de *E. coli* se creció en medio LB 24 h/ 37°C, este cultivo se inoculó en medio LB a 200 rpm/ 37°C hasta alcanzar una densidad óptica (OD) de 0.5 a 0.9, se incubó en hielo por 5 min, se centrifugó a 3000 rpm/10min/4°C, se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en amortiguador (100 mM RbCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub> 50 mM, KC<sub>2</sub>H<sub>3</sub> O<sub>2</sub> 30 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, glicerol 15%) TFB1 frío, se incubó en hielo 5 min, se centrifugó a 3000 rpm/10 min/4°C, se resuspendió en amortiguador (MOPS 10 mM, RbCl<sub>2</sub> 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 75 mM, glicerol 15%) TFB II y se incubó en hielo 15 min. Las alícuotas de 50 µl se almacenaron a -80°C.

### 3.8 Clonación del gen de la TvMP50 de *T.vaginalis*.

A partir del cDNA de parásitos crecidos en presencia 1.6 mM de Zn<sup>2+</sup> se realizó una RT-PCR para la obtención del amplicón de TvMP50. Este producto se clonó en el vector de mantenimiento pCR 2.1 TOPO (Invitrogen). La clonación se realizó con 4 µl de la reacción de PCR, 1 µl del vector, 0.5 µl de H<sub>2</sub>O y 1 µl de la solución de sales del kit, la mezcla se incubó 1 h a T A.

Posteriormente se transformaron células DH5 $\alpha$  por choque térmico colocando el vial de células transformantes 30 min en hielo y después se incubaron en un baño maría a 42°C/ 30 s. e inmediatamente después se agregaron 250  $\mu$ l de medio LB, después se incubó a 200 rpm/ 37°C/ 1 h. El total del vial de células transformantes se plaqueó en alícuotas de 10 y 50  $\mu$ l en placas de agar-LB- con 200  $\mu$ g/ ml de ampicilina y se incubaron a 37°C O/N; se utilizó el control de vector sin el inserto. Posteriormente se picaron las colonias y se crecieron en medio LB con 200  $\mu$ g/ ml de ampicilina, para continuar con la extracción de DNA plasmídico por miniprep.

### **3.9 Extracción de DNA plasmídico por Miniprep.**

Las transformantes previamente crecidas en medio de cultivo LB con 200 $\mu$ g/ ml de ampicilina, se centrifugaron a 13,000 rpm/15 min, se resuspendieron en amortiguador (Tris-HCl 50mM pH8.0, EDTA 10 mM) P1, se les dio vortex unos segundos, se le adicionó amortiguador (NaOH 200 mM, SDS 1%) P2, se mezcló por inversión y se incubó a T.A. por 5 min, luego se adicionó el amortiguador (Acetato de Potasio 3.0 M) P3, y se incubó en hielo 5 min y luego se centrifugó a 13,000 rpm/15 min/4°C. El sobrenadante se colectó en un tubo y se le adicionó 0.6 volumen de etanol absoluto frío, se incubó a T.A. y se centrifugó a 13,000 rpm/15 min/4°C. La pastilla se lavó con 1 ml de etanol al 70%, se mezcló por inversión y se centrifugó a 13,000 rpm/ 20 min/4°C., la pastilla se dejó secar y se adicionó agua libre de DNAsas.

### **3.10 Subclonación del gen de *mp50* en el vector pQE80L**

Una clona del vector pQE80L se inoculó en 5 ml de LB-ampicilina y se incubó a 200 rpm/ 37 °C / O.N. Posteriormente el cultivo se centrifugó a 8,000/ rpm/20 min/4°C, la pastilla fue resuspendida en 166  $\mu$ l de amortiguador P1 (con RNAsa A [100 $\mu$ g/ml]), posteriormente se adicionaron 333  $\mu$ l de amortiguador P2, se mezcló por inmersión de 4 a 6 veces y se incubó 5 min a TA. Después se adicionó 150  $\mu$ l de amortiguador P3. Después se precipitó el DNAp con 0.6 volumen de isopropanol al 70% y se centrifugó a 13,000rpm/10 min y se lavó dos

veces sin resuspender la pastilla con etanol frío al 70%, se centrifugó entre cada lavado a 13,000 rpm/5min y la pastilla se seco a TA y se resuspendió en agua inyectable.

La liberación del inserto del gen *mp50* del vector pCR 2.1 TOPO y de la restricción del vector pQE80L se realizó con las enzimas *BamHI* y *HindIII*, se llevó a cabo siguiendo las especificaciones de cada enzima, el inserto y el vector se ligaron en una relación 5:1 usando T4 DNA ligasa se incubó a 4°C/ON, como controles se utilizo: 1) el vector sin inserto + ligasa, 2) el vector sin inserto sin ligasa.

Después fueron usadas células M15 para transformar la reacción de ligación utilizando 10 µl, después se tomó una alícuota de 100 µl del tubo de células competentes M15 (previamente descongeladas), y se agregó la reacción de ligación, se incubó por 20 min/4°C, después se le dio choque térmico, colocando el tubo a 42°C en un baño de agua por 90 s. Y se le adicionó inmediatamente 500 µl de medio LB. Las células M15 con el inserto fueron incubadas 60-90 min/ 37°C. Después se plaquearon alícuotas de 50,100 y 200 µl en placas de agar-LB con 25 µg/ml kanamicina y 200 µg/ml ampicilina y fueron incubadas a 37°C /ON.

### **3.11 Expresión de la proteína TvMP50r**

A partir de un cultivo de una clona positiva conteniendo el vector pQE-80L-*mp50* con una OD<sub>600</sub>, 0.9 se realizó la inducción y la expresión la proteína TvMP50r con 1 mM de IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosida)/ 1 h, después se purificó por columna de afinidad a níquel.

### **3.12 Purificación de TvMP50r por afinidad a Níquel.**

A partir de la fracción soluble obtenida de un cultivo de 250ml células M15 que contienen el plásmido con el inserto de *mp50*, se purificó la proteína TvMP50r por cromatografía de afinidad a níquel, se activo la columna de níquel con el amortiguador de unión (Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> 50 mM, pH 8.0, NaCl 300 mM, Imidazol 10 mM;) La cromatografía se realizó usando una columna de 1cm de diámetro por 10 cm

de altura empaquetada con 5ml de resina Ni-NTA agarosa, equilibrada con el amortiguador de unión ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM, pH 8.0, NaCl 300 mM, Imidazol 10 mM;) para eliminar las proteínas inespecíficas. Finalmente, la proteína se eluyó con el amortiguador de elución ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM, pH 8.0, NaCl 300 mM, Imidazol 250 mM).

### **3.13 Obtención de anticuerpos anti-TvMP50r**

Para la obtención de anticuerpos contra la TvMP50r de *T. vaginalis* se inmunizaron 5 ratones Balb/c machos con 5 semanas de edad. Las inmunizaciones se hicieron por vía intraperitoneal, la primera inmunización se realizó con 18 $\mu\text{g}$  de la proteína TvMP50r y el adyuvante TITERMAX Gold en una relación 1:1 y una segunda inmunización a los 8 días con 50  $\mu\text{g}$  de proteína en una relación 1:1 con el adyuvante TITERMAX Gold. La mezcla total de cada inmunización fue aproximadamente de 200  $\mu\text{l}$  por ratón (1:1). Los sangrados se llevaron a cabo cada semana realizando 6 sangrados en total. La respuesta anti-TvMP50r fue evaluado en cada uno de los sangrados por ensayos de Western blot, usando como antígeno a la proteína recombinante hasta la obtención de un título máximo contra esta proteína.

### **3.14 Obtención de extractos totales de proteínas de *T. vaginalis* por precipitación con TCA.**

Los parásitos en fase logarítmica de crecimiento se lavaron tres veces con PBS frío pH 7.0, 20 x 10<sup>6</sup> parásitos se resuspendieron en 0.9 ml de PBS frío pH 7.0 y 0.1 ml de TCA al 100%, después se mezcló y incubado 18 h/ 4°C. Después la pastilla fue centrifugada a 13000 rpm/3 min/ 4°C y se lavó cinco veces con PBS frío a pH 7.0. Las paredes del tubo se secaron con un hisopó estéril entre cada lavado. Finalmente, la pastilla se resuspendió con 400  $\mu\text{l}$  de amortiguador de muestra 1x (BM1x) con 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol y se hirvió durante 3 min. de estas muestras se tomaron 10-20  $\mu\text{l}$  y se analizaron en geles de SDS-PAGE al 12% al 10%. Las proteínas separadas se transfirieron a membrana de nitrocelulosa para realizar el ensayo de Western blot.

### **3.15 Ensayo de Western blot**

Los extractos totales de proteínas de *T. vaginalis* y la proteína TvMP50r. Se corrieron en el gel de SDS-PAGE al 12% y se transfirieron a membrana de nitrocelulosa por electrotransferencia. Las membranas se bloquearon con leche al 5% en PBS-Tween al 0.05%, pH 7, a 4°C/ON, se incubaron con el suero de ratón anti-TvMP50r en una dilución 1:100 en PBS-Tween 20 al 0.05 % pH 7/ 24h/ 4°C y se lavaron con PBS pH 7.0-Tween al 0.1%, después se incubaron con el anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado a peroxidasa a una dilución 1:3000 (Bio-Rad). La reacción se detectó por color usando el sustrato substrato 4-cloro-naftol o por quimioluminiscencia utilizando el sustrato GE Healthcare (No. catalogo RPN2132).

### **3.16 Ensayo de Inmunofluorescencia indirecta.**

$20 \times 10^6$  parásitos se crecieron en ausencia y presencia de 1.6 mM  $Zn^{2+}$  durante 24 hrs. Después los parásitos se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS a pH 7.0 (filtrado por 0.22  $\mu$ m) durante 1 hr/ 37°C, después se lavaron con PBS pH 7.0 tres veces/ 5 min; para la eliminación de RNA se dió un tratamiento con HCl 1M durante 2 h/ T. A. Posteriormente se realizó la neutralización con  $NH_4Cl$  50 mM en PBS pH 7.0 por 10 min, al cabo de este tiempo se lavaron con PBS pH 7.0 y se continuó con el lavado con glicina 50 mM en PBS pH 7.0 en frio por 5 min, después un bloqueo con suero fetal bovino (SFB) y se realizó el lavado con PBS-SFB 1%/ 5 min, y se permeabilizaron los parásitos con Tritón 100 x al 0.2% /10 min. Después se lavaron 3 veces con PBS-SFB al 1% y se incubaron con el anticuerpo primario (anti-TvMP50) O.N. Después de 24 h se lavaron con PBS-SFB 1% tres veces por 5 min se incubaron / 1 h con el anticuerpo secundario (cabra-anti-mouse acoplado a FITC) y por último se lavaron tres veces con PBS-SFB al 1% pH 7.0 y el exceso de PBS de la placa se secó, se agregó 8  $\mu$ l de la solución de vectashield-DAPI + PBS pH 7.0 en una relación 50:50 (50 $\mu$ l de vectashield-DAPI + 50 $\mu$ l de PBS pH 7.0 ) en el porta objetos y fueron selladas las laminillas con barniz transparente.

## 4. Resultados.

### 4.1 Análisis *In silico* del gen *mp50* y de la proteína TvMP50.

La proteína TvMP50 es codificada por un gen con un tamaño de 1320 pb ubicado dentro del genoma de *T. vaginalis* en el locus TVAG\_403460, flanqueando a este gen pero en la cadena complementaria encontramos dos posibles marcos de lectura abierto (ORFs). Río arriba en la región 5' a *mp50* se encuentra un gen que codifica para una proteína de unión a lípidos dependiente de calcio y río abajo de la región 3' de *mp50* se ubica un gen que codifica para una proteína hipotética (Fig. 5). El análisis del árbol filogenético se basó en obtener secuencias homólogas a TvMP50 a partir de la base de datos MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>). El cladograma se construyó y el análisis muestra que organismos pluricelulares tienen el origen común bacteriano en este tipo de metaloproteinasas. De manera interesante se encontró una probable duplicación de la proteína de nuestro interés TvMP50 (*Trichomonas vaginalis* MER082185 y la probable duplicación de *Trichomonas vaginalis* MER082187) y se agrupó en la rama de bacterias (*E.coli*, MER001243 y MER001244; *Dickeya dadantii* MER193279). Así mismo se muestra que la divergencia de este tipo de metaloproteinasas provienen de organismos unicelulares (*E. coli*, MER001243 y MER001244; *Dickeya dadantii* MER193279). Así se muestra la divergencia hasta organismos pluricelulares como: (*Holdemania filiformis* MER171888, *Giardia intestinalis* MER036146, *Saccharomyces cerevisiae* MER001733, *Trichomonas vaginalis* MER078259, *Ostreococcus tauri* MER081872 y *Homo sapiens* MER001248) (Fig. 6).

Por otra parte, para analizar el sitio catalítico de TvMP50 MER078259 fue utilizado como templatado el sitio catalítico de las metaloproteinasas de *E. coli* MER001244 y *Homo sapiens* MER001248 conformado por: 4 histidinas (H) en la posición 215, 324, 328 y 335, 2 ácidos aspárticos (D) en la posición 232 y 243, y 2 ácidos glutámicos (D) en la posición 364 y 407 (<http://merops.sanger.ac.uk/>), clasificadas en el clan MG, en la subfamilia B. Nuestros resultados mostraron que TvMP50 conserva los aminoácidos y las posiciones correspondientes al sitio

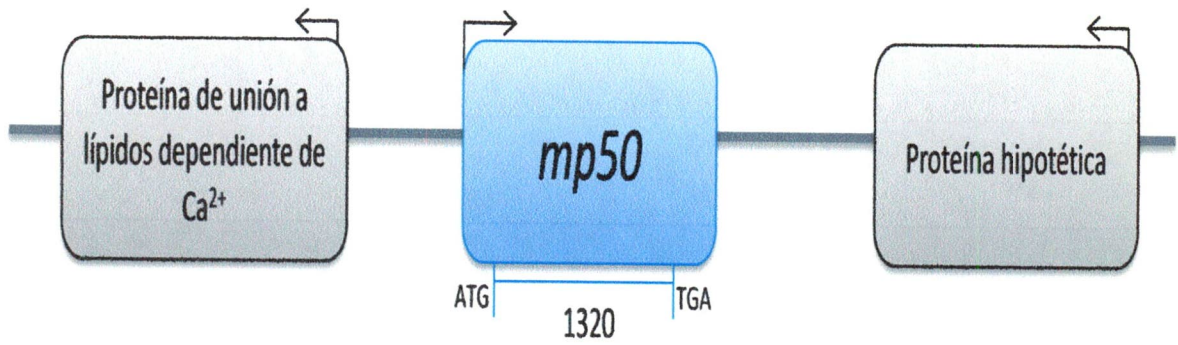
catalítico de este tipo metaloproteinasas sugiriendo la subclasificación en la subfamilia B (fig.7).

Posteriormente, se realizó el análisis de la predicción de estructura secundaria basado en la secuencia de aminoácidos de TvMP50 MER078259 alineada con las secuencias de las metaloproteinasas de *E. coli* MER001244 y *Homo sapiens* MER001248. El análisis mostró la presencia de regiones correspondientes a  $\alpha$  hélices (flechas rojas), regiones de hojas beta (flechas verdes) y las regiones no predichas (áreas grises). Los resultados en el programa Jalview muestran intervalos de confianza entre 7 y 9, los cuales predicen la probabilidad de formación de estructuras secundarias, además las estructuras secundarias predichas fueron analizadas a nivel de la estructura terciaria de la proteína TvMP50 (Fig. 8). El modelaje en 3D está basado en el templado correspondiente a la proteína cristalizada Xaa-proaminopeptidasa de *Homo sapiens* con un score de predicción de  $196 \times 2e^{-50}$  correspondiente al PDB:2IW2 (Muller no publicado) en donde podemos observar un plegamiento de hélices  $\alpha$  y hojas  $\beta$  antiparalelas característico de aminopeptidasa denominado "pita bread" (Bazan y col. 1994) (Fig. 9).

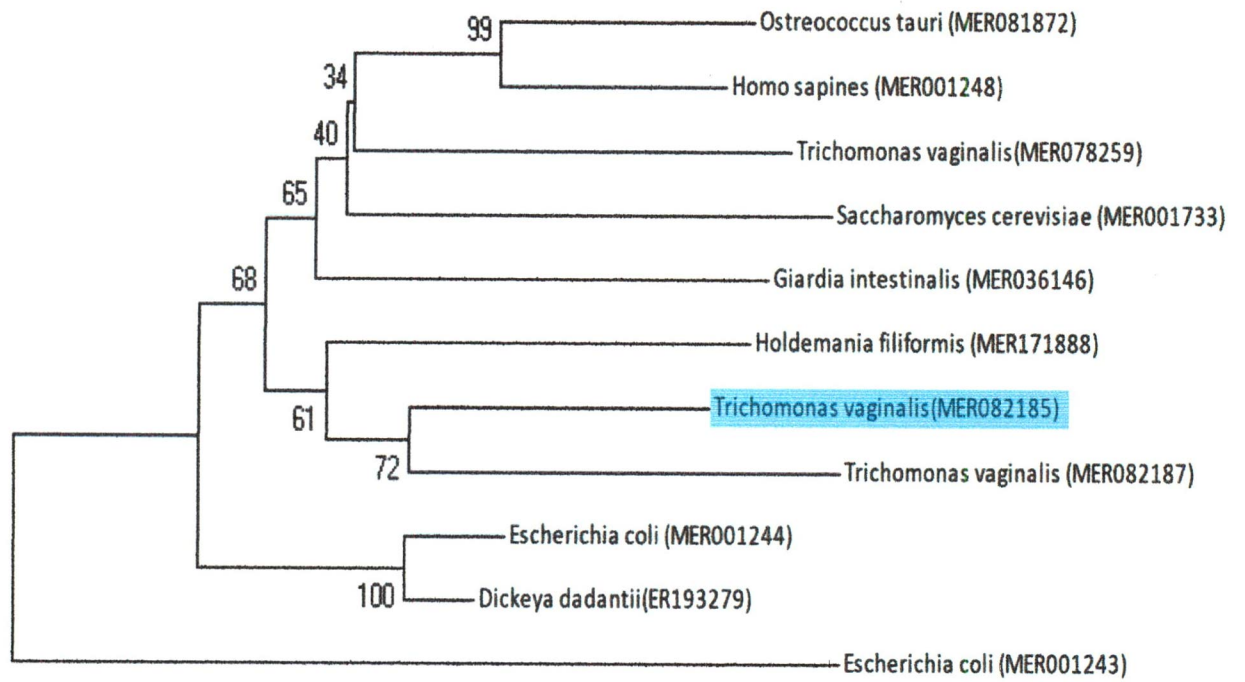
**Figura 5. Representación esquemática del ORF que codifica para TvMP50.**

En el locus TVAG\_403460 identificamos un gen denominado *mp50* que codifica para la proteína TvMP50 (centro), adyacentes a este ORF identificamos dos genes, el primero en la región 5' que codifica para una proteína de unión a lípidos dependiente de calcio (izquierda) y al extremo 3' el gen que codifica para una proteína hipotética (derecha). Las flechas indican el sentido de la transcripción de cada ORF.

TVAG\_403460



**Figura 6. Árbol filogenético construido con la TvMP50 y metaloproteinasas de distintos organismos.** El cladograma fue generado utilizando el algoritmo Neighbor-joining con valores de Bootstrap de 1000 replicaciones y se realizó utilizando el programa MEGA 4.0.2. Las secuencias fueron obtenidas desde la base de datos MEROPS: *Trichomonas vaginalis* TvMP50 (resaltada con un sombreado azul claro), (MER082185), (MER078259 y (MER082187) *Saccharomyces cerevisiae* (MER001733), *Ostreococcus tauri* (MER081872), *Giardia intestinalis* (MER036146), *Homo sapiens* (MER001248), *Holdemania filiformis* (MER171888), *Dickeya dadantii* (MER193279) *Escherichia coli* (MER001243) y (MER001244).



0.1

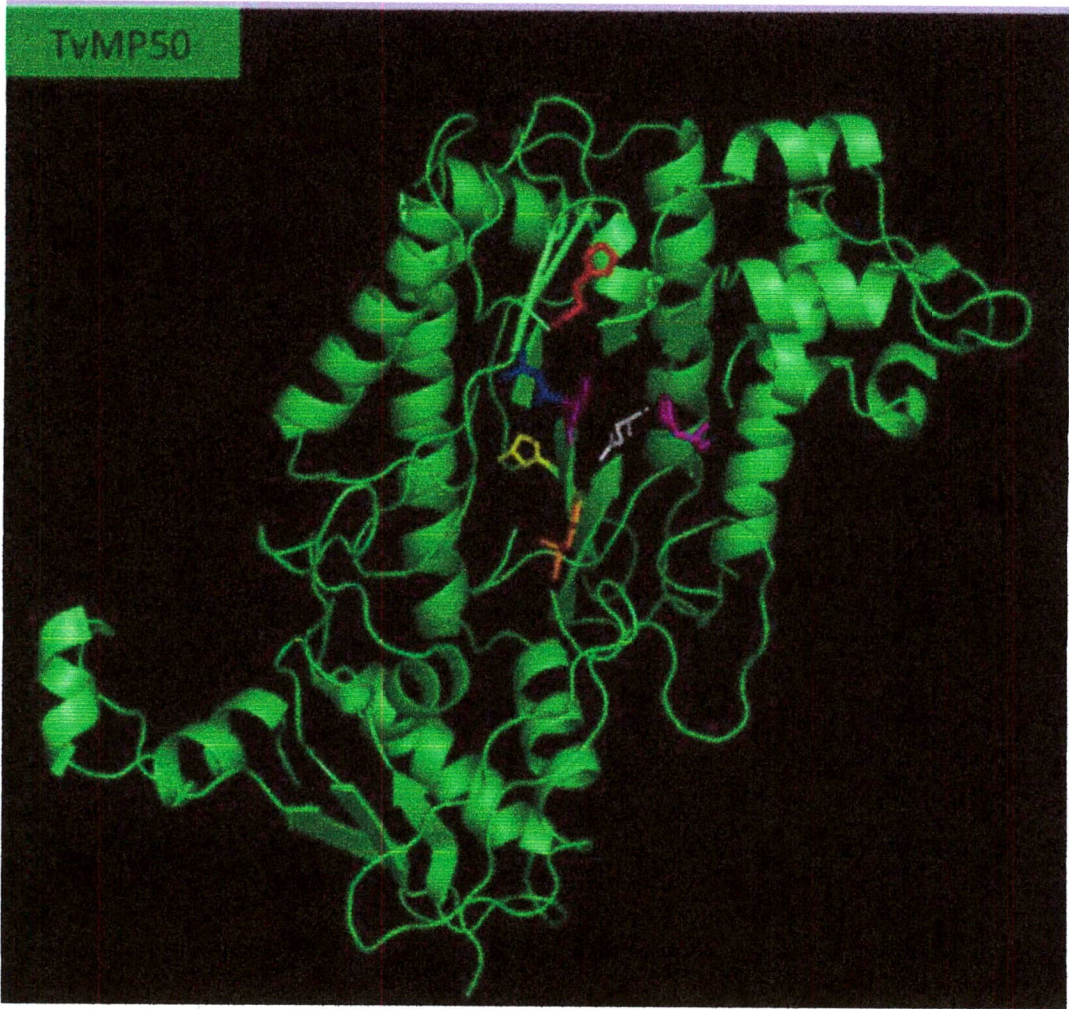
**Figura 7. Identificación *in silico* del sitio catalítico de TvMP50.** Alineamiento de secuencias de aminoácidos obtenidas de la base de datos MEROPS de organismos como: *Homo sapiens* (MER001248), *Escherichia coli* (MER001244); y la TvMP50 con el número de acceso de (MER082185). Ácido aspártico (D), Histidina (H) y Ácido glutámico (E) con un sombreado azul claro.

<i>H. sapiens</i>	MER001248	MAAATGPSFWLGNELKVPLALFALNRQRLCERLRKNP AVQAGSI VVLOGGEETQRYCTD
<i>E. coli</i>	MER001244	.....MSEI SRQEFORRRQALVEQVQ.....PGSAALI FAAPEVTR SAD
TvMP50	MER082185	.....MSGDEFRLHRKNLEVFQNS...DHGII VFKGAE LRLEPFAG
consensus		-----vs--eF-l-Rq-LvE-lr-n-----gsi vvl-gaee--r--ad
<i>H. sapiens</i>	MER001248	TGVLFRQESFFHWAFFVTEPGCYGVI DVDTG...KSTL FVPRLPASHATWVGKHSKEHF
<i>E. coli</i>	MER001244	SEYPYRQNSDFWYFTGFNEPEAVLVLIKSDDTNHNSVLFNRVRDLTAEI WGRRLGQDAA
TvMP50	MER082185	SDYHFYQEGMFYWMSGWKPKDAASIDLATG...QSTLYIEKYGDREYI WTGPIPTPESI
consensus		sey-frQes-Fww-tGf-ePea-lvi dv-tg---StLfv-r---s-ei W-Gki-s-e--
<i>H. sapiens</i>	MER001248	KEYAVDDVQYVDEIASVLT SQPSVLLTLRGVNTDS GSVCREASF DGI SKFEVNNTL L
<i>E. coli</i>	MER001244	PEKLGVDRALAFSEI NQQLYQLL NGLD VVYHAQGEYAYADVI VNSALEKLRKGRQLTA
TvMP50	MER082185	KEVTGVDNVKFI DDLKHDIQGKD.....VYGALDOI KMHDQALPS
consensus		kEk-gVD-v-yvdei---l-----v-l---g-----g-v-v-aal d-irk-e-nnl--
<i>H. sapiens</i>	MER001248	HPETVFCR...VFKTDVLEVLRYTNKISSEAHREVVKAVKVGKYELESLFEHY
<i>E. coli</i>	MER001244	PATMIDWRPVVHEMRLFKSPEEIVLRRAGEITAMAHTRAVEKCRPGMFEYHLEGEIHHE
TvMP50	MER082185	AAGIARR.....AKTPYEIEQIKKAAELTSEAIHVWKNIKPGWSEQQVDAEFTYY
consensus		-a-lve-r-----vfKtp-Eievlrrageit seAh--vMk-vkpGr-Ey-legef-hy
<i>H. sapiens</i>	MER001248	CYSRGGMRHSSYTICIGSGENS AVLHYGHAGAPNDRTIQNGDVCLFDMGGEYYCFASDI T
<i>E. coli</i>	MER001244	FN-RHGARYPSYNTIVGSGENGLIHY...-TENE CFMRGDLVLI DAGCEYKGYAGDI T
TvMP50	MER082185	G-FKNGAREKSFLTI AASGQDAVYLHN...-SANE GVCKDGLLL DCGFFWNHYAGDI T
consensus		---r-GaR--Sy-tl-gSGeng-vLHy---t-Ne--lr dGDI vLI D-G-ey--yAGDI T
<i>H. sapiens</i>	MER001248	CSFPANGKFTADQKAVYEAVLRSSRAVMGAMKPGVWAPDMHRI ADRI HLEFLAHMGI LSG
<i>E. coli</i>	MER001244	RTFPVNGKFTQAQREIYDILESLLETSRLRYRPGTSILEVVTGEVVRI MVSGLVKLGL LKG
TvMP50	MER082185	RTFPVNGKFSVIQRNVYSILLEKQIELCNMKPGLTFAEMNKTMF KYMYQCLEAIGLIKK
consensus		rtFPvNGKft--Qr-vYei vLes---vm-lrkPGvsw-em-r-v-ri ml--L--nrGi l kg
<i>H. sapiens</i>	MER001248	--SVDAMVOAHLGAVFMHGLGHFLGI DVHDVGGYPEGVERIDEPLRLSRLTARHLQPGM
<i>E. coli</i>	MER001244	--DVDELI AQNAHRPFFMHGLSHWLGLDVHDVGVYGGQ.....DRSRI LEPGM
TvMP50	MER082185	ENTVDEKNQNEI ARVFTPHSLTHHVGCNVHDVNYEKSDLI KDTN.....DEARTCRPGN
consensus		--sVDerivqq-lgrvF-pHgLSHf l Gi dVHDVg-y---v-r-----d-aR-l-PGM
<i>H. sapiens</i>	MER001248	VLTVEPGLIYFDHLLDEALADPAR--ASF LNREVLORFRGFGGVRIEEDVVVTDSGTE
<i>E. coli</i>	MER001244	VLTVEPGLIYAP.....DAEVPEQYRGI G IRI EDDIVTETGNEN
TvMP50	MER082185	LVTEPGLYFHKTRIQKIMAEKSAPYYEFVDWQWALKLADFEVGGIRI EDDMLVETEGNQ
consensus		vlTvEPGLIYf---l---lad-----evl--frgi Ggi RI EdDvvvtetG--n
<i>H. sapiens</i>	MER001248	LLTCVPRTVEEIEACMAGCDKAFTPFSGPK
<i>E. coli</i>	MER001244	LTASVVKKPEEIEALMVAARKQ.....
TvMP50	MER082185	RLSPCPKSCDEIEQIMASRVL.....
consensus		llt-vpkt-eEIEalMag--k-----

**Figura 8. Estructura secundaria de la TvMP50.** A) Alineamiento de secuencias de aminoácidos obtenidas de la base de datos MEROPS correspondientes a: *Homo sapiens* (MER001248), *Escherichia coli* (MER001243) y (MER001244); y TvMP50 (MER082185). B) Correspondencia de la estructura secundaria con la estructura terciaria.



**Figura 9. Modelaje de la estructura terciaria de TvMP50 de *Trichomonas vaginalis*.** El modelo de la estructura terciaria se basó en la proteína cristalizada Xaa-pro dipeptidasa de *Homo sapiens* y se destaca los aminoácidos que conforman la sitio catalítico con estructuras de líneas.

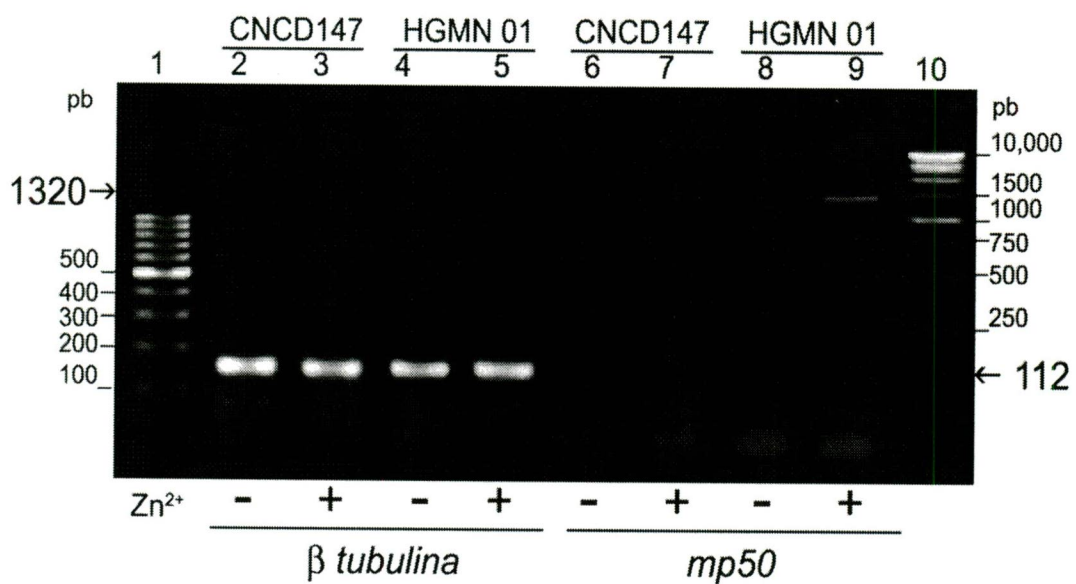


#### 4.2 Análisis del transcrito de *mp50* en cultivos de *T. vaginalis*.

A partir de RNA total de parásitos de los aislados de *T. vaginalis* de mujer (CNCD147) y hombre (HGMN01) crecidos en ausencia y presencia de 1.6 mM de  $Zn^{2+}$  se sintetizó cDNA y se realizó la RT-PCR. El aislado CNCD147 no mostró ningún amplicón en ausencia de  $Zn^{2+}$  (Fig. 10, carril 6), sin embargo, el transcrito de *mp50* se encuentra presente en este mismo aislado cuando se crece en presencia de 1.6 mM de  $Zn^{2+}$  (Fig. 10, carril 7). En el aislado HGMN01 se observó la amplificación del transcrito de *mp50* tanto en ausencia como en presencia de 1.6 mM de  $Zn^{2+}$  (Fig. 10, carriles 8 y 9); sin embargo, en presencia de  $Zn^{2+}$  *mp50* se sobreexpresó (Fig. 10, carril 9). Como control de carga se utilizó el amplificado del gen de  $\beta$ -tubulina de 112 pb en presencia y ausencia de  $Zn^{2+}$  (Fig. 10, carriles 2-5), mostrando que este gen se expresa constitutivamente y no se afectó su expresión en presencia y ausencia de  $Zn^{2+}$  lo que demuestra el efecto del  $Zn^{2+}$  de manera específica. El análisis densitométrico de este experimento se realizó obteniendo las bandas de 2 ensayos con resultados similares, observando que en ausencia de  $Zn^{2+}$  el aislado de CNCD147 no presentó amplicón del gen *mp50*, sin embargo en presencia de 1.6 mM de  $Zn^{2+}$  si se presentó un amplicón del gen de *mp50*, el cual es tomado como tomado con un 100% de intensidad de la banda. El amplicón de gen de *mp50* se presentó en el aislado HGMN01 crecido en ausencia de  $Zn^{2+}$  presentando también un 100% de intensidad de la banda. Se destaca que en este mismo aislado la expresión de *mp50* se incrementó hasta un 50% más en presencia de 1.6 mM de este catión en comparación con este aislado en ausencia de  $Zn^{2+}$  (HGMN01) y el aislado de CNCD147 en presencia de  $Zn^{2+}$  (Fig. 11).

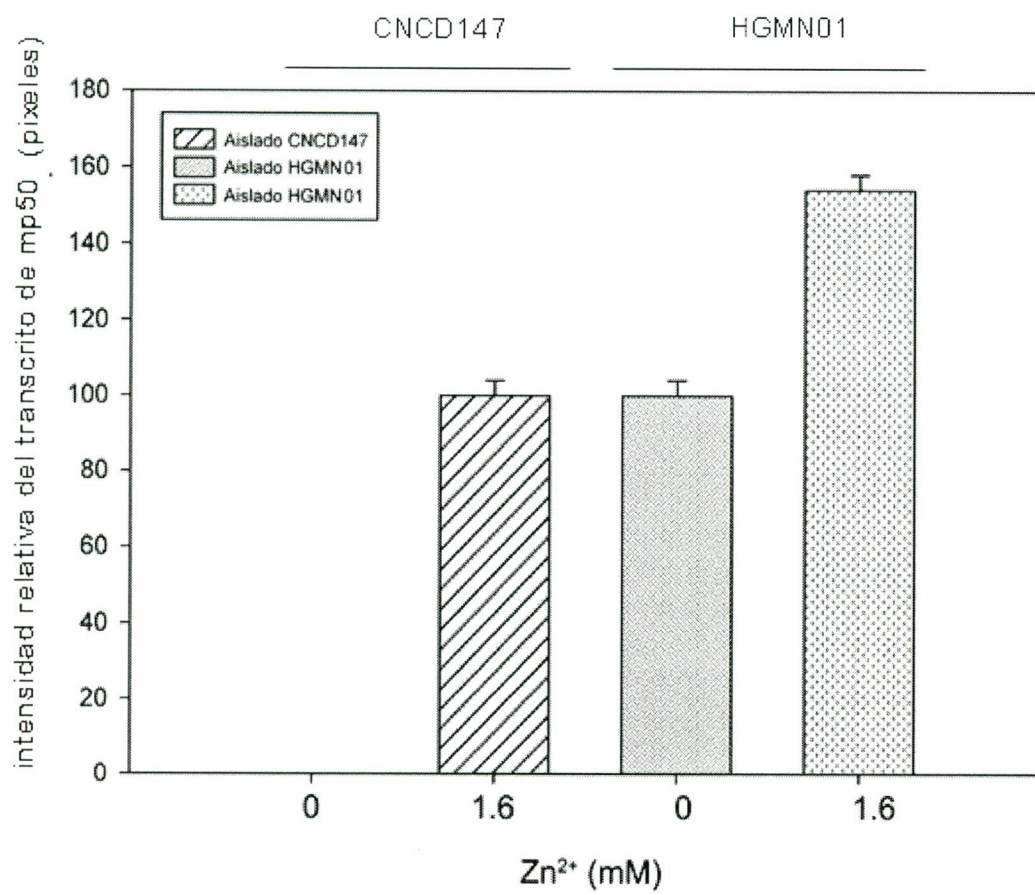
**Figura 10. Expresión diferencial del transcrito de *mp50* en presencia y en ausencia de 1.6 mM de  $Zn^{2+}$  en dos aislados diferentes de *T. vaginalis*.** Productos de la RT-PCR utilizando cDNA proveniente de parásitos de los aislados CNCD147 (mujer) (carriles 2, 3, 6, 7) y HGMN01 (hombre) (carriles 4, 5, 8, 9) crecidos en presencia (carriles 3, 5, 7, 9) y ausencia (carriles 2, 4, 6, 8) de 1.6 mM  $Zn^{2+}$  para amplificar a *mp50* (carriles 6 - 9) y un fragmento de 112 pb de  $\beta$ -*tubulina* (control de carga) (carriles 2 - 5). Las flechas indican el tamaño de los amplicones de *mp50* (1320 pb) y  $\beta$ -*tubulina* (112 pb). Marcadores de tamaño molecular de 100 pb (carril 1) y 1 kb (carril 10).

### Aislados



**Figura 11. Análisis densitométrico de *mp50* en los aislados de *T. vaginalis* CNC147 y HGMN01 en presencia y ausencia de  $Zn^{2+}$ .**

La densitometría de las bandas observadas en la figura 8 fue realizada utilizando el programa Quantity-One (BioRad). Los valores de intensidad relativa fueron calculados dividiendo la intensidad de *mp50* / intensidad de  *$\beta$ -tubulina* para cada condición analizada. Las barras indican el error estándar obtenido de dos experimentos independientes.



### 4.3 Expresión y purificación de TvMP50r.

Después de la identificación *in silico* del gen *mp50* se llevó a cabo el diseño de oligonucleótidos específicos con sitios de reconocimiento para *BamHI* en el extremo 5' y *HindIII* en el extremo 3' para la amplificación del gen completo *mp50* (Tabla 1). A partir del RNA total de parásitos crecidos en presencia de 1.6 mM de  $Zn^{2+}$  se sintetizó cDNA y usando los iniciadores específicos para *mp50* se llevó a cabo una RT-PCR, obteniéndose un amplificado de 1320 pb. Este inserto se clonó en el vector pCR 2.1 TOPO (Invitrogen) obteniéndose 20 clonas positivas y fueron seleccionadas 5 clonas fueron utilizadas para el análisis de restricción seleccionando solo una clona positiva y fue denominada como T2. El DNA plasmídico (DNAp) de la construcción TOPO-*mp50* se digirió con *HindIII*, el DNAp se linealizó obteniéndose un tamaño esperado de 5251 pb (Fig. 12 carril 3) el cual corresponde al vector pCR TOPO 2.1 + inserto *mp50*. El inserto se liberó con la doble digestión enzimática con *BamHI/HindIII*, liberando un fragmento correspondiente a 1320 pb (*mp50*) y mostrando una banda de mayor tamaño de 3931 pb correspondiente al vector pCR 2.1 TOPO 2.1 linealizado (Fig. 12, carril 2). El DNAp de la clona T2 fue secuenciado y se obtuvo la secuencia de nucleótidos que fue traducida a aminoácidos y esta fue comparada con la secuencia encontrada en la base de datos TrichDB. El alineamiento mostró que la secuencia reportada en esta base de datos con respecto a la secuencia de la clona T2 presenta en su totalidad la conservación de los aminoácidos (Fig. 13). El inserto de *mp50* se subclonó en el vector de expresión pQE-80L (4751 pb) (Fig. 14). A partir del DNAp de la clona T2 (TOPO-*mp50*) se realizó la doble digestión con enzimas de restricción *BamHI* y *HindIII* y el inserto *mp50* de 1320 pb se liberó y se ligó al vector pQE-80L; ambos se purificaron previamente usando el kit de purificación de la marca QIAGEN (Fig. 15).

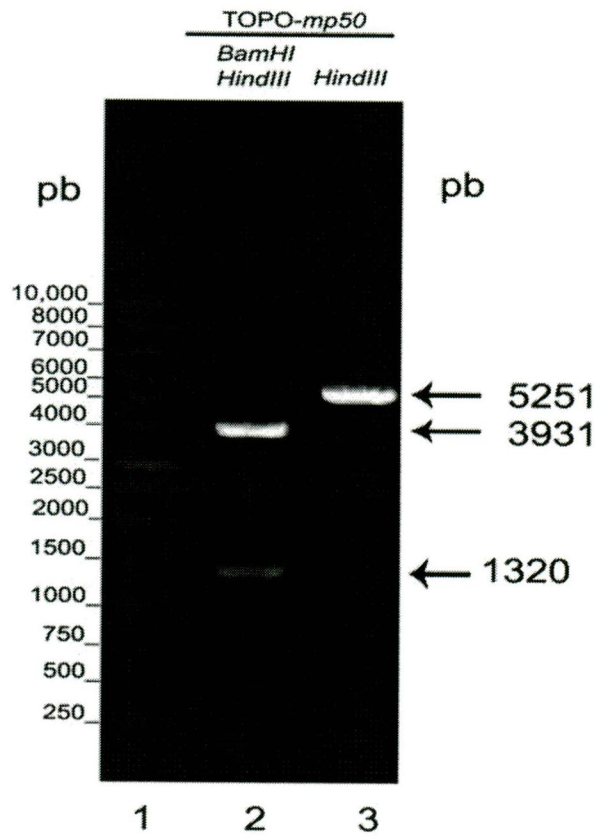
Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos empleados para amplificar *mp50*

oligonucleótido	Secuencia
<b>F-<i>mp50</i></b>	5' <u>GCCGGATCC</u> ATGTCAGGTGACGAATTC-3' <i>Bam</i> HI
<b>R-<i>mp50</i></b>	5' <u>CGCAAGCTT</u> TCAA ACTACTCTTGAAGC 3' <i>Hind</i> III

<sup>a</sup>Subrayados se muestran los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III para el oligonucleotidos F-*mp50* y R-*mp50* respectivamente.

**Figura 12. Análisis de restricción de la clona T2 (TOPO-mp50).**

Análisis de restricción enzimática del DNAp de la clona T2 (TOPO-mp50) con la enzimas *HindIII* (carril 3) y la doble restricción con *BamHI* y *HindIII* (carril 2). Marcador de tamaño molecular 1 kb (carril 1) (Promega). Con flechas se muestra el tamaño molecular de la clona TOPO-mp50 (5251 pb), el tamaño del inserto liberado (1320 pb) y del vector TOPO linealizado (3931 pb).



**Figura 13. Alineamiento del gen *mp50* de la clona T2 (TOPO-*mp50*) reportada en la base de datos TrichDB.**

El DNAp de la clona T2 (TOPO-*mp50*) se secuenció y se obtuvo la secuencia de *mp50* que se tradujo a aminoácidos (Fig. 7, TvMP50\_T2, línea 2), asimismo se alineó con la secuencia del locus TVAG\_404360 reportada en la base de datos TrichDB (Fig. 11, TvMP50\_TrchDB) con el programa Clustal W en el servidor "Biology Workbench 3.2". Los asteriscos (\*) indican los aminoácidos idénticos.

Alineamiento con el programa Biology Workbench 3.2

```

TvMF50_TrichIE      MSQDEFRLHRRKNLIEVFRQNSIDHGIIVFKGAELELLEPPFAGSDYHFVQEGMIFYWMSQWEK
TvMF50_T2           MSQDEFRLHRRKNLIEVFRQNSIDHGIIVFKGAELELLEPPFAGSDYHFVQEGMIFYWMSQWEK
*****

TvMF50_TrichIE      PDAAISIDIATGQSTLYIEKYGDRYEIDWTGPIPTPESIKEVIGVDNVKPIDDLKHDIQGK
TvMF50_T2           PDAAISIDIATGQSTLYIEKYGDRYEIDWTGPIPTPESIKEVIGVDNVKPIDDLKHDIQGK
*****

TvMF50_TrichIE      DVYGALDQIKMHDQTALPSAAGIARRAKTPYEIEQIKKAAELTSEAIIEVMGNIKPGWSE
TvMF50_T2           DVYGALDQIKMHDQTALPSAAGIARRAKTPYEIEQIKKAAELTSEAIIEVMGNIKPGWSE
*****

TvMF50_TrichIE      QQVDAEFTYYGFRNGAREKSFLLTAAAGQDAVYLHNSANEGVCKDGLLLLDGPFWNHY
TvMF50_T2           QQVDAEFTYYGFRNGAREKSFLLTAAAGQDAVYLHNSANEGVCKDGLLLLDGPFWNHY
*****

TvMF50_TrichIE      AGDITRTFPVNGKPSVIQRNVYSILLEKQIELCNMIEPGLTFAEMNKIMFKWMYQCLEAI
TvMF50_T2           AGDITRTFPVNGKPSVIQRNVYSILLEKQIELCNMIEPGLTFAEMNKIMFKWMYQCLEAI
*****

TvMF50_TrichIE      GLIKKEMIVDEKNQNEIARVPTFHSLETHVGCNVHDVWYEKSDLIKDTNDEARTCRPGNI
TvMF50_T2           GLIKKEMIVDEKNQNEIARVPTFHSLETHVGCNVHDVWYEKSDLIKDTNDEARTCRPGNI
*****

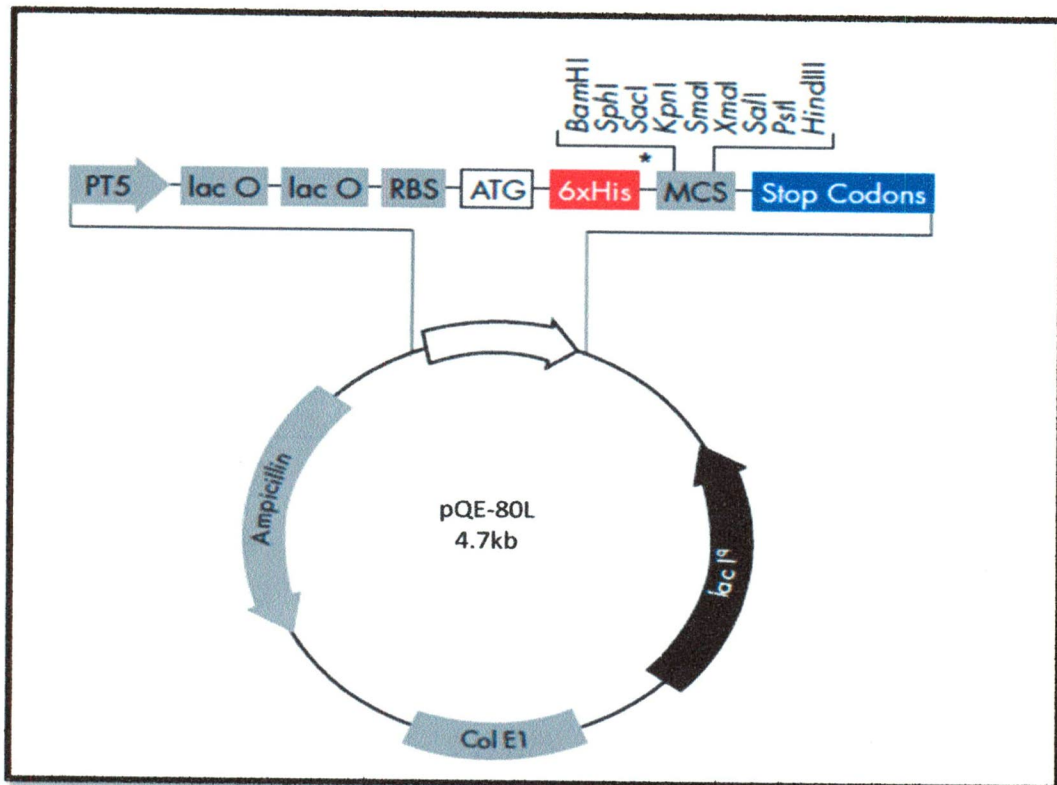
TvMF50_TrichIE      VTIEPGLYFHKTRIQKIMAEKSAPYYEFVDWDLKLADEVGGIRIEDDMLVTETGNQRL
TvMF50_T2           VTIEPGLYFHKTRIQKIMAEKSAPYYEFVDWDLKLADEVGGIRIEDDMLVTETGNQRL
*****

TvMF50_TrichIE      SPCKKSCDEIEQIMASRVL
TvMF50_T2           SPCKKSCDEIEQIMASRVL
*****

```

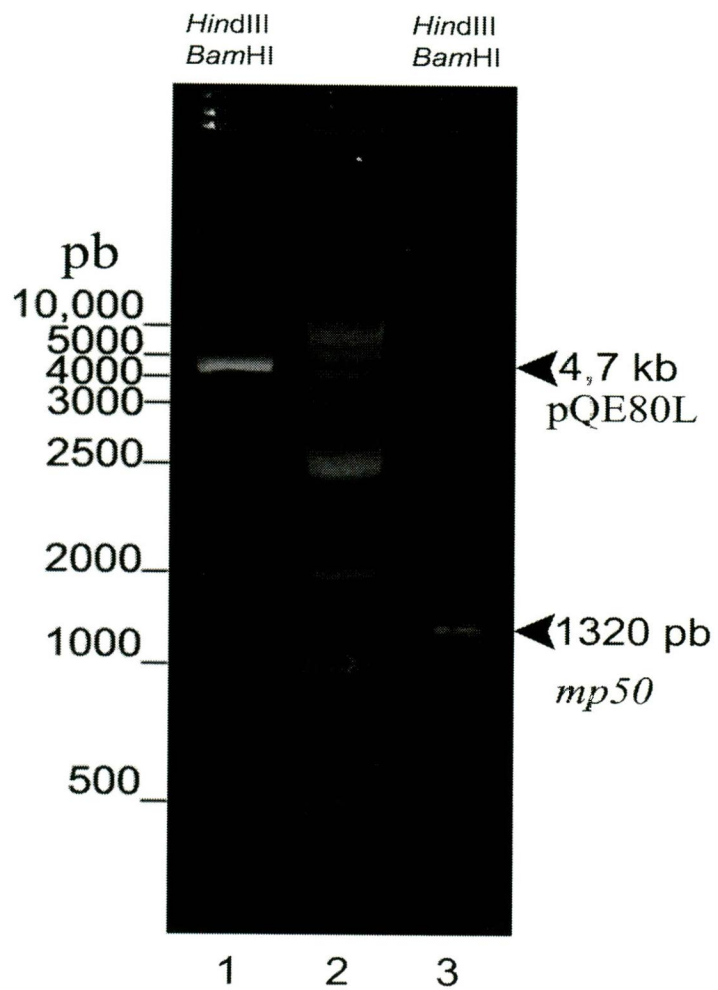
#### **Figura 14. Mapa del vector pQE80L.**

El vector de expresión seleccionado por las siguientes características: PT5: promotor T5, Lac O: operador lac; RBS: sitio de unión al ribosoma; ATG: codón de inicio; 6xHis: Etiqueta de residuos de histidina; MCS: Sitio múltiple de clonación; Stop codons: codones de terminación; Col E1: origen de replicación Col E1; Ampicilin: gene de resistencia a ampicilina



**Figura 15. Subclonación de *mp50* en el vector pQE80L.**

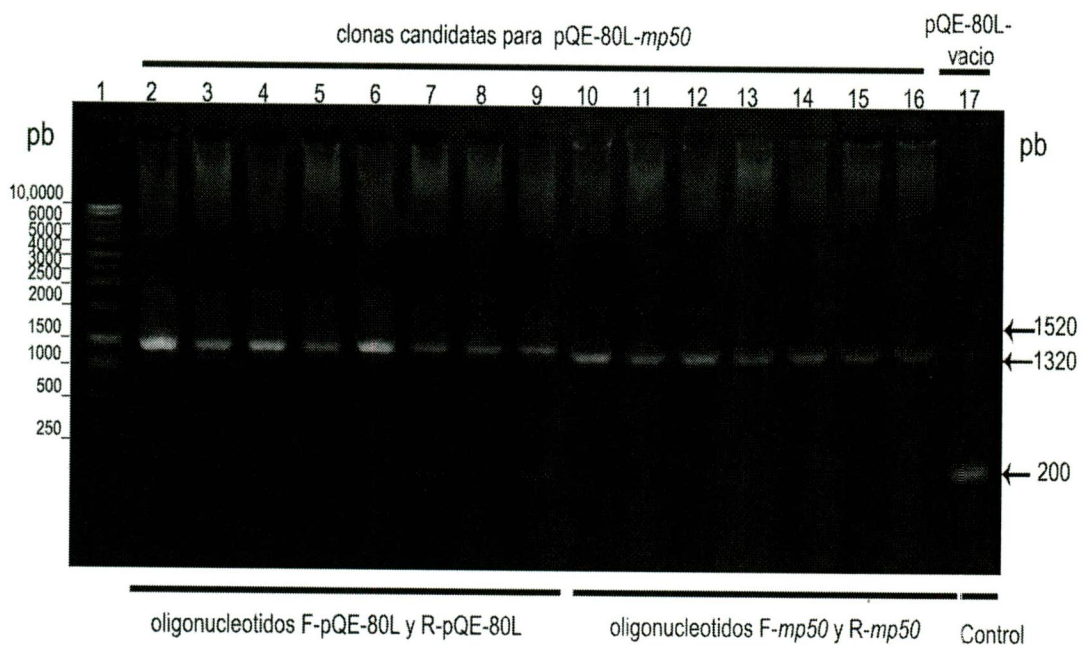
Análisis de la doble restricción enzimática con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III del vector pQE80L (carril 1) y del inserto liberado *mp50* de la clona T2 (TOPO-*mp50*) (carril 3). Marcadores de tamaño molecular de 1 kb (carril 2).



La reacción de ligación de la construcción pQE-80L-*mp50*, se transformó en células de *E. coli* del genotipo DH5 $\alpha$  y se plaqueó en agar LB con 200  $\mu$ g de ampicilina; se fueron obtuvieron 17 colonias, las cuales se analizaron por PCR (Fig.14) utilizando oligonucleótidos del vector pQE-80L (Fig. 14, carriles 2-9) y del inserto *mp50* (Fig.14, carriles10-16), usando como control el amplificado del vector pQE-80L-vacio (Fig.14, carril 17). 6 clonas positivas fueron seleccionadas y cultivadas para la extracción de DNAp por el método de lisis alcalina (Fig. 15). De estas 6 clonas se eligieron 3 positivas que se analizaron por digestión con enzimas *BamHI* (Fig. 16, carriles 1, 4 y 7) y *HindIII* (Fig. 16, carriles 2, 5 y 8) por separado, así como doble restricción enzimática con dichas enzimas (Fig. 16 carriles 3, 6 y 9).El análisis en geles de agarosa mostró una banda de 6071 pb que corresponde al tamaño del vector + inserto. A esta construcción se le denominó "MQ1". El DNAp de esta clona se purificó y se transformó para la obtener la proteína recombinante en células de *E. coli* químicamente competentes del genotipo M15.

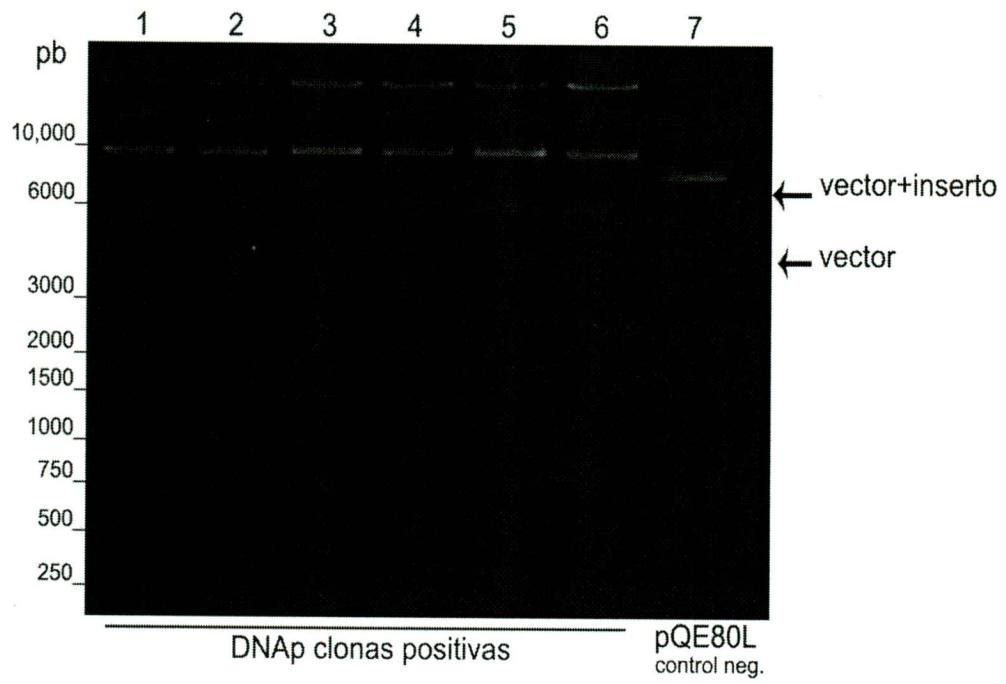
**Figura 16. Selección por PCR de clonas candidatas para la construcción pQE-80L-*mp50*.**

Los amplificados obtenidos son de 1520 pb (carriles 2-9) utilizando los oligonucleótidos del vector F-pQE-80L y R-pQE-80L, y los amplicones correspondientes al inserto de 1320 pb (carriles 10-16) utilizando los oligonucleótidos F-*mp50* y R-*mp50*. El control usado fue el amplificado del vector pQE-80L-vacio (carril 17).

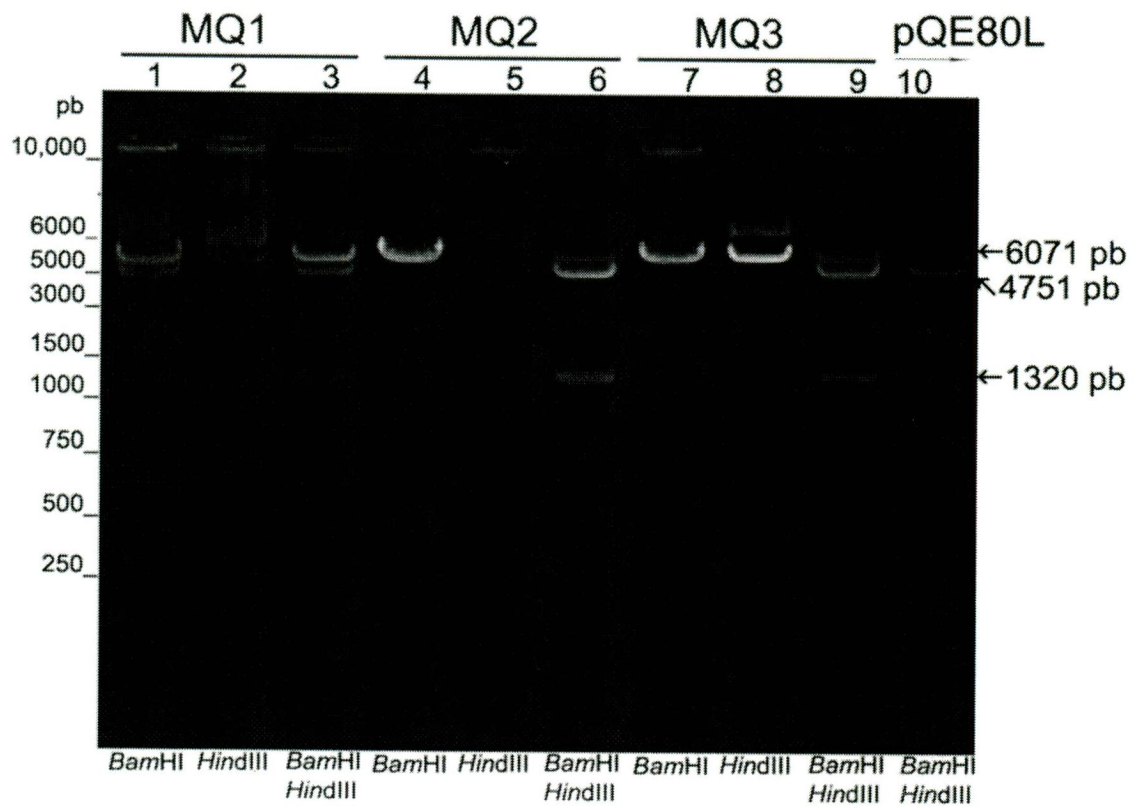


**Figura 17. Clonas candidatas pQE80L-*mp50*.**

Integridad del DNAp de las clonas candidatas MQ1 (carril 1), MQ2 (carril 2), MQ3 (carril 3), MQ6 (carril 4), MQ16 (carril 5), MQ17 (carril 6) y del vector pQE80L (carril 7).



**Figura 18. Análisis por restricción enzimática de las clonas candidatas pQE80L-mp50 MQ1, MQ2 y MQ3.** Análisis de digestión enzimática con *Bam*HI de las clonas pQE80L-mp50 QM1 (carril 1), QM2 (carril 4), QM3 (carril 7) y con *Hind*III QM1 (carril 2), QM2 (carril 5), QM3 (carril 8) y la doble restricción enzimática con *Bam*HI y *Hind*III QM1 (carril 3), QM2 (carril 6), QM3 (carril 9) y el vector pQE80L (carril 10). Las flechas indican el tamaño molecular del DNAp de las clonas MQ1, 2 y 3 linealizado con *Bam*HI o *Hind*III (6017 pb), se muestra el inserto *mp50* liberado (1320 pb), así como el tamaño molecular del vector pQE80L linealizado con ambas enzimas (4751 pb).

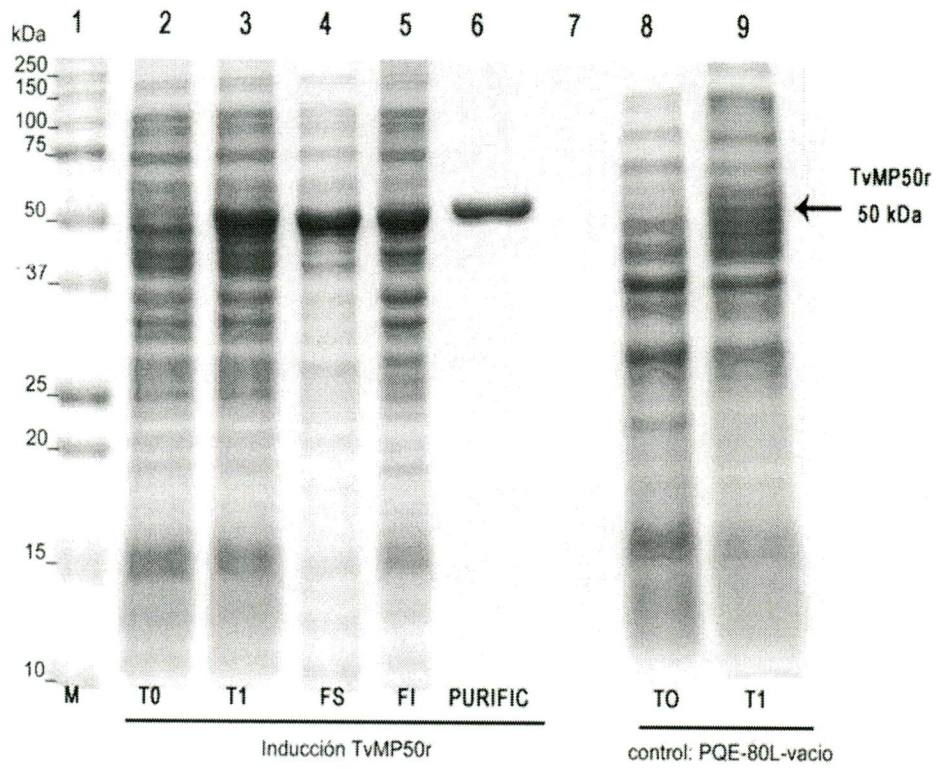


Se utilizó la clona MQ1 para la inducción de la proteína (TvMP50r) TvMP50 recombinante. Siguiendo el protocolo descrito en el manual pQE-vectors 200. La proteína se indujo en medio LB con doble selección de antibióticos (ampicilina 200 µg/ml y 25 µg/ml de kanamicina) con 1 mM de IPTG a una densidad óptica (O.D.) de 0.9 a 37°C, la inducción se realizó durante 1 h de la proteína recombinante. El análisis de la inducción de la proteína recombinante se realizó en geles de SDS-PAGE al 12%. En los geles se observó la TvMP50r a la altura de la banda del marcador de 50 kDa (TvMP50r). Los extractos totales de proteínas utilizados antes de la inducción no mostraron expresión de TvMP50r (Fig. 19, carril 2). La solubilidad de la TvMP50r fue analizada obteniéndose la fracción soluble (Fig.19, carril 4) y en la fracción insoluble (Fig.19, carril 5). Sin embargo, TvMP50r se expresa mayoritariamente en la fracción soluble y a partir de esta fracción la proteína se purificó por cromatografía de afinidad (Fig.19, carril 6). Como controles se utilizó el vector pQE-80L vacío antes de la inducción (Fig. 19, carril 8) y después de la inducción (Fig. 19, carril 9) en donde no se encontró la TvMP50r.

Un gel duplicado del perfil electroforético de la figura 19 se utilizó para los análisis por Western blot. TvMP50r se inmunodetectó específicamente (Fig.20, carril 3), en la fracción soluble (Fig.20, carril 4). En la fracción insoluble (Fig.20, carril 5) y la proteína purificada (Fig.20, carril 6), que no se inmunodetectó antes de la inducción (Fig. 20, carril 2). Los controles fueron el vector vacío antes de la inducción y post-inducción (Fig.20, carriles 8 y 9).

**Figura 19. Perfil electroforético de la inducción y purificación de TvMP50r.**

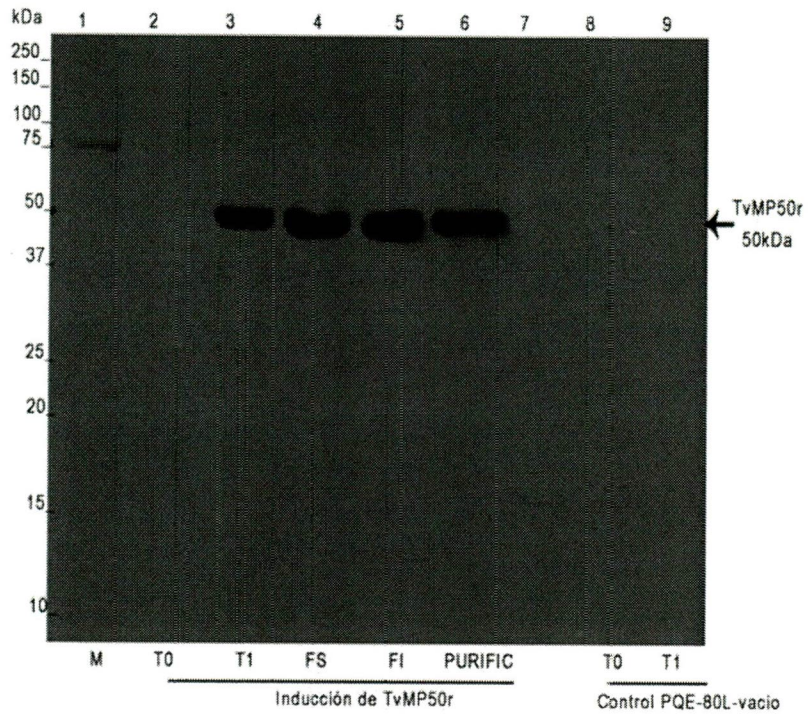
Perfil electroforético antes de la inducción (carril 2) e inducido (carril 3), la fracción soluble (carril 4), la fracción insoluble (carril 5), la proteína TvMP50r purificada (carril 6) y los controles antes de la inducción (carril 8), inducido (carril 9).



## **Figura 20. Inmunodetección de TvMP50r.**

Inmunodetección de proteína TvMP50r sin inducción (carril 2), inducción (carril 3) la fracción soluble (carril 4), la fracción insoluble (carril 5) ,y la proteína TvMP50r purificada (carril 6), los controles antes de la inducción (carril 8) e inducción (carril 9) .

# WB



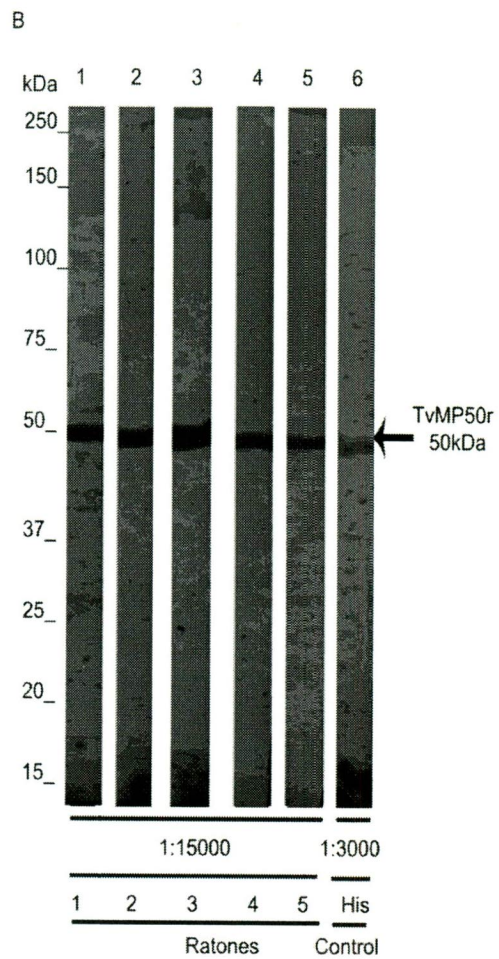
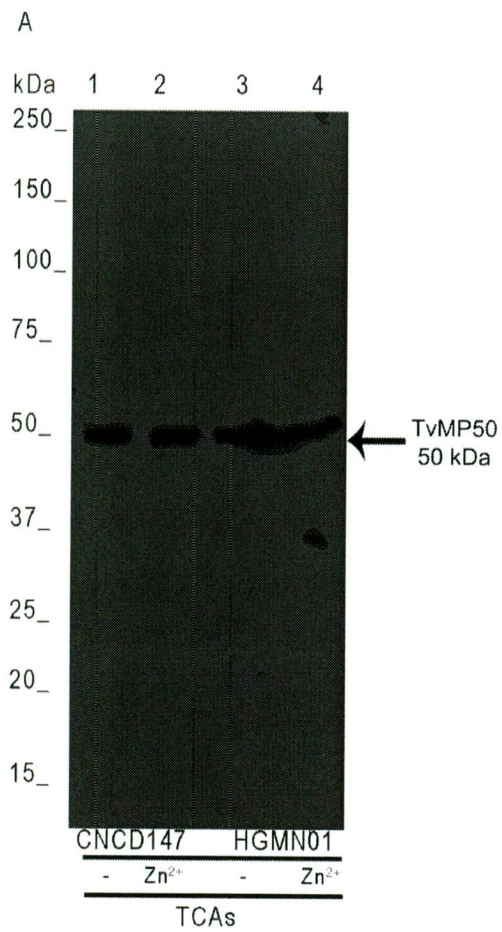
La proteína TvMP50r purificada se utilizó para la producción de anticuerpos anti-TvMP50r. 5 ratones Balb/C machos se inmunizaron con la proteína TvMP50r. Los sueros pre-inmunes de los ratones se analizaron sobre proteínas totales de *T. vaginalis* (TCAs), en donde no se encontró algún reconocimiento hacia proteínas de *T. vaginalis* o hacia TvMP50r.

Los sueros de los ratones con 6 semanas post-inoculación alcanzaron el reconocimiento de TvMP50r en el título de 1:15000 (Fig. 21, panel B carriles 1-5) utilizando como control anticuerpo anti-histidinas en dilución 1:3000 (Fig.21, panel B, carril 6) revelado por quimioluminiscencia (Fig. 21, panel B).

El reconocimiento de la proteína TvMP50 nativa que se obtuvo desde extractos totales de proteína (TCAs) de parásitos crecidos en ausencia y presencia de  $Zn^{2+}$  de los aislados CNCD147 (Fig. 21, carriles 1 y 2) y HGMN01 (Fig. 19, carriles 3 y 4) donde se inmunodetectó una banda específica de 50kDa con sueros anti-TvMP50r (Fig. 21, carriles 1-4).

**Figura 21. Perfil de Inmunodetección de TvMP50 con sueros de ratones anti-TvMP50r.**

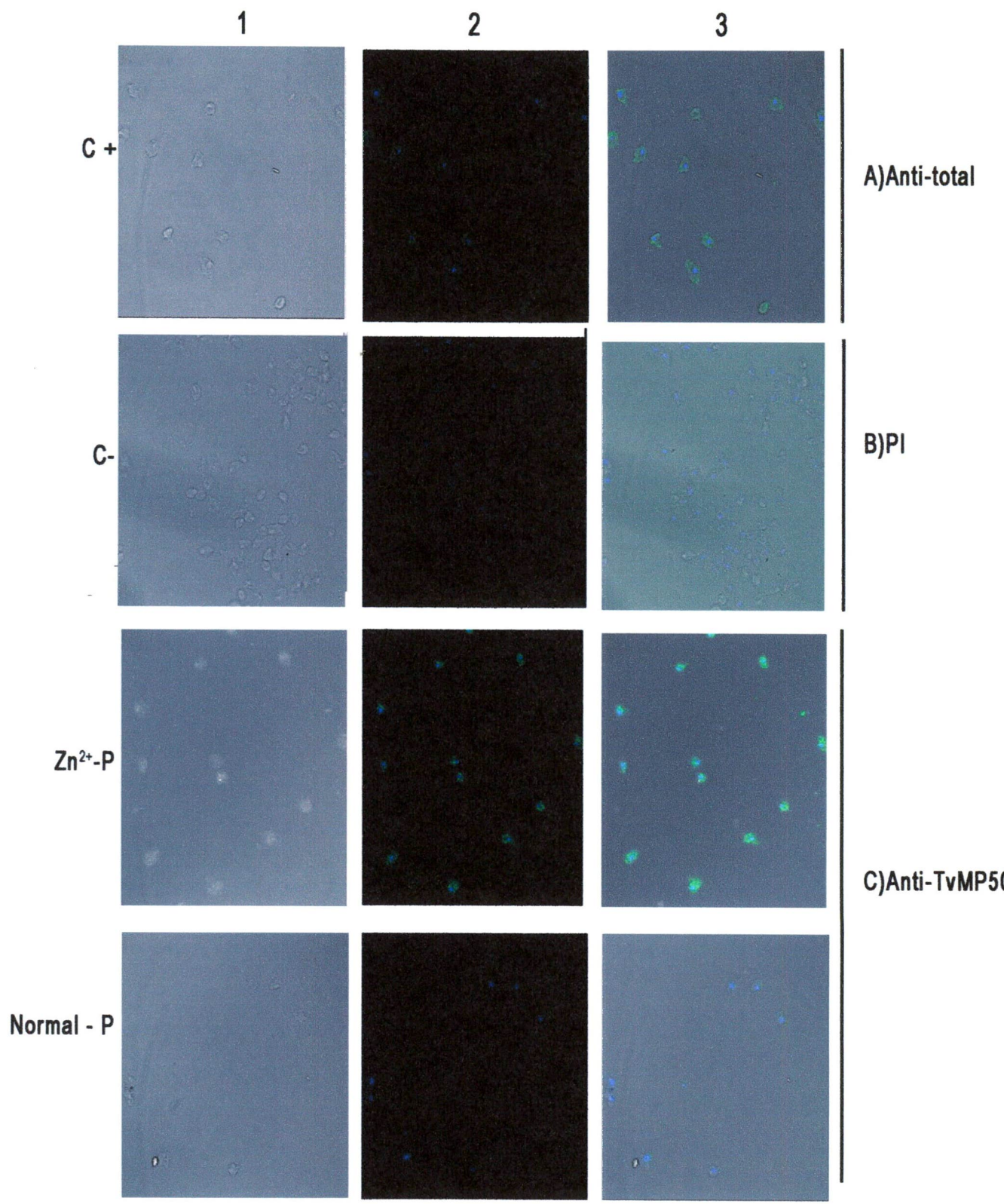
A) Inmunoreconocimiento de TvMP50 con sueros anti-TvMP50r en extractos totales de *Trichomonas vaginalis* (TCAs) de los aislados de mujer (CNCD147) y hombre (HGMMN01) en condiciones de ausencia (carriles 1 y 3) y presencia de  $Zn^{2+}$  (carriles 2 y 4). B) Perfil de Inmunodetección de TvMP50r usando sueros anti-TvMP50r en una dilución de hasta 1:15000 (carriles 1-5) revelado por quimioluminiscencia.



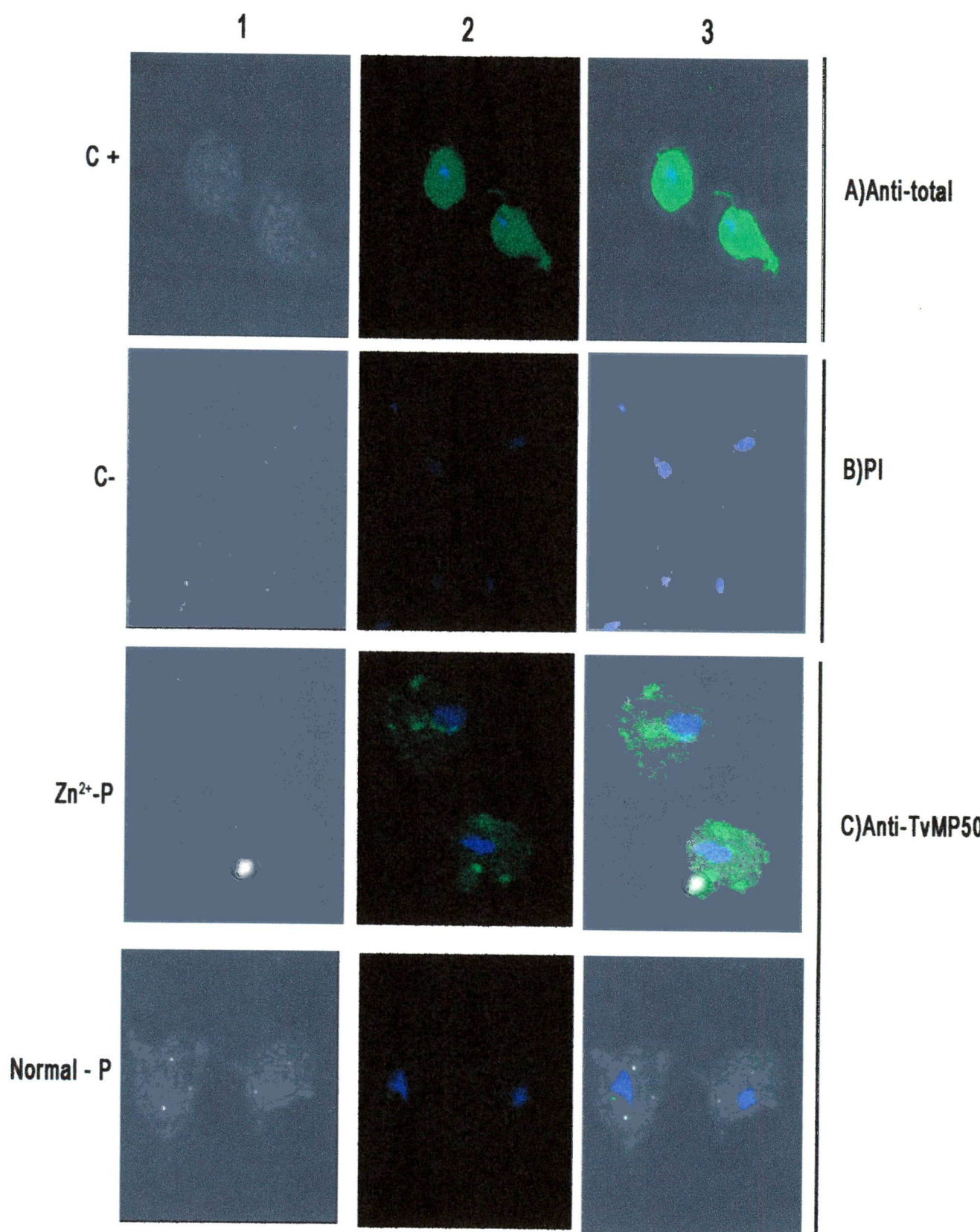
#### 4.4 Inmunolocalización de TvMP50 en *T. vaginalis*

La localización de TvMP50 se llevó a cabo por medio de Inmunofluorescencia indirecta en laminillas de parásitos permeabilizados y no permeabilizados del aislado de HG MN01 crecidos en ausencia y presencia de 1.6 mM  $Zn^{2+}$  utilizando sueros anti-TvMP50r. TvMP50 se encontró en el citoplasma y en la superficie del parásito. En parásitos permeabilizados crecidos en presencia de  $Zn^{2+}$ , se observó un incremento en la intensidad de fluorescencia de TvMP50 en el citoplasma (Fig.22 panel 1-3, inciso C,  $Zn^{2+}$ -P), comparado con parásitos permeabilizados en ausencia de  $Zn^{2+}$ , donde la disminución en la intensidad de fluorescencia (Fig.22 panel 1-3, inciso C, Normal-P). Sin embargo en parásitos no permeabilizados crecidos bajo las dos condiciones (ausencia y presencia de  $Zn^{2+}$ ), se observó a TvMP50 localizado en zonas muy localizadas en forma de parche en la superficie del parásitos con incremento en la intensidad de fluorescencia en los parásitos no permeabilizados en presencia de  $Zn^{2+}$  (Fig. 24, panel 1-3 inciso C,  $Zn^{2+}$ -NP). Los acercamientos se realizaron con un zoom de 5 evidenciando estos resultados de los parásitos permeabilizados en ausencia y presencia de  $Zn^{2+}$  (Fig. 23, panel 1-3, incisos C,  $Zn^{2+}$ -P y Normal-P) y para los parásitos no permeabilizados en ausencia y presencia de  $Zn^{2+}$  (Fig. 25, panel C,  $Zn^{2+}$ -NP y Normal-NP).

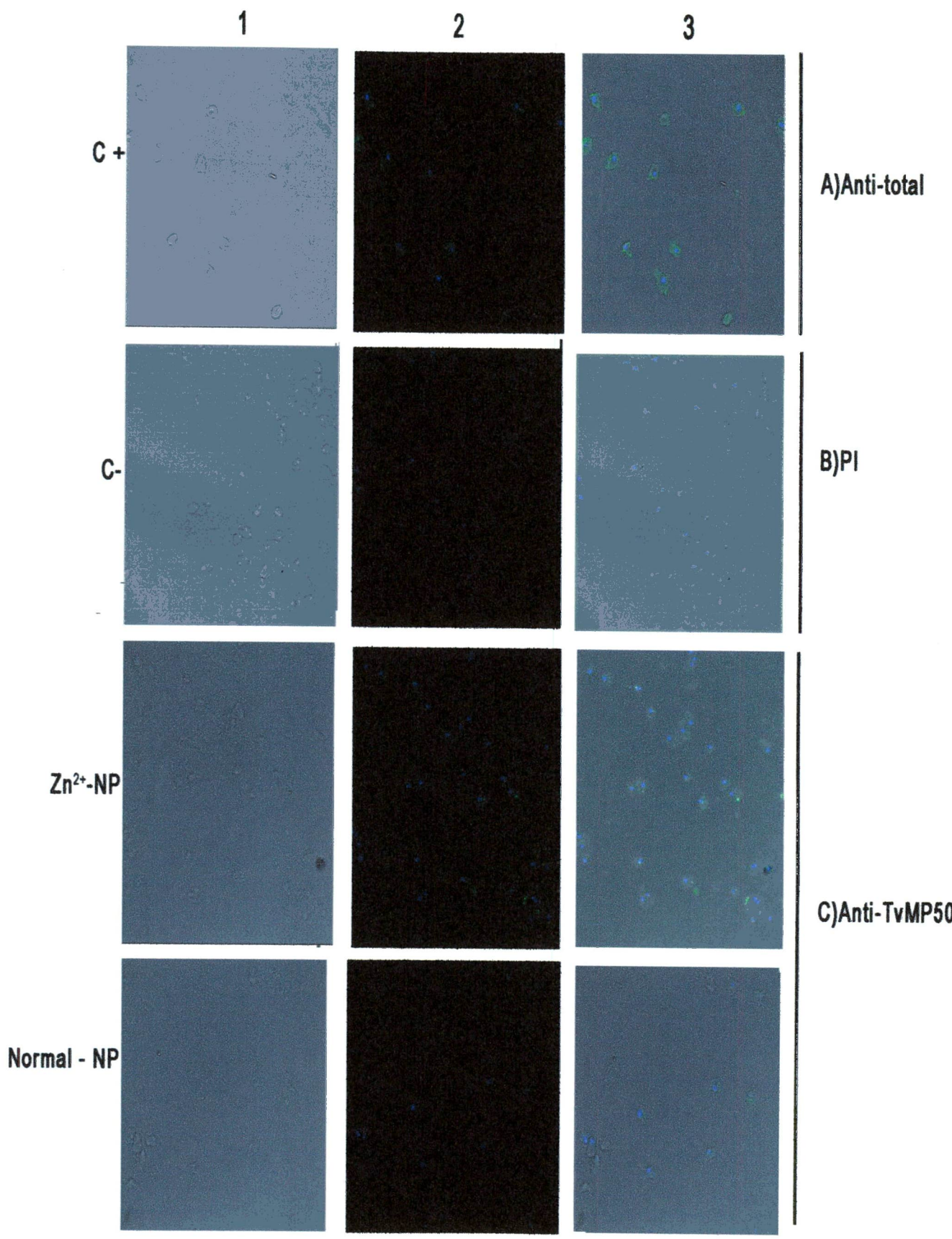
**Figura 22. Inmunolocalización de TvMP50 en parásitos permeabilizados.** Microscopía confocal 60X con parásitos permeabilizados adheridos en laminillas, fijados con paraformaldehído al 4 %. Panel 1) Microscopia de Nomasky. Panel 2) Constraste de fases. Panel 3) Microscopía de Nosmasky en campo oscuro con fluorescencia. A) parásitos incubados con el anticuerpo anti-proteínas totales de *T. vaginalis* (1:150) control positivo B) Parásitos incubados con suero preinmune (1:150) control negativo B) C) parásitos incubados con el anticuerpo anti-TvMP50 (1:150).



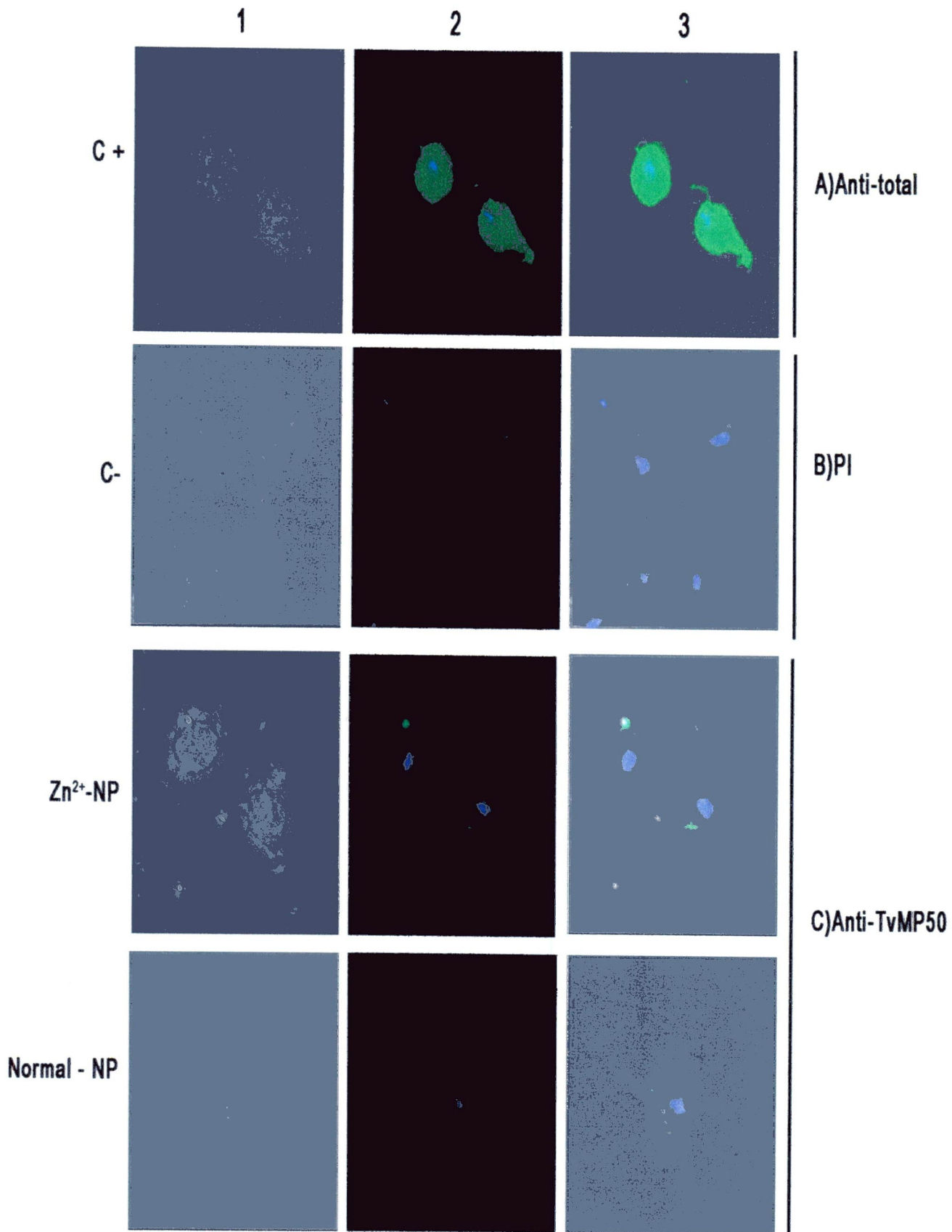
**Figura 23. Inmunolocalización de TvMP50 en parásitos permeabilizados (zoom de 5).** Microscopía confocal 6X con un zoo de 5.0 a parásitos permeabilizados adheridos en laminillas, fijados con paraformaldehído al 4 %. Panel 1) Microscopía de Nomasky. Panel 2) Contraste de fases. Panel 3) Microscopía de Nosmasky en campo oscuro con fluorescencia. A) parásitos incubados con el anticuerpo anti proteínas totales de *T. vaginalis* (1:150) control positivo B) Parásitos incubados con suero preinmune (1:150) control negativo B) C) parásitos incubados con el anticuerpo anti-TvMP50 (1:150).



**Figura 24. Localización de TvMP50 en parásitos no permeabilizados.** Microscopía confocal 60X con parásitos no permeabilizados adheridos en laminillas, fijados con paraformaldehído al 4 %. Panel 1) Microscopía de Nomasky. Panel 2) Constraste de fases. Panel 3) Microscopía de Nomasky en campo oscuro con fluorescencia. A) parásitos incubados con el anticuerpo anti proteínas totales de *T. vaginalis* (1:150) control positivo B) Parásitos incubados con suero preinmune (1:150) control negativo B) C) parásitos incubados con el anticuerpo anti-TvMP50 (1:150).



**Figura 25. Localización de TvMP50 en parásitos no permeabilizados (zoom de 5).** Microscopía confocal 60X con un zoom de 5.0 a parásitos no permeabilizados adheridos en laminillas, fijados con paraformaldehído al 4 %. Panel 1) Microscopía de Nomasky. Panel 2) Constraste de fases. Panel 3) Microscopía de Nosmasky en campo oscuro con fluorescencia. A) parásitos incubados con el anticuerpo anti proteínas totales de *T. vaginalis* (1:150) control positivo B) Parásitos incubados con suero preinmune (1:150) control negativo B) C) parásitos incubados con el anticuerpo anti-TvMP50 (1:150).



## 5. Discusión de resultados.

*Trichomonas vaginalis* es un protozooario rico en genes de codifican para proteinasas (Carlton y col., 2007), estas se encuentran involucradas en la citoadherencia, destrucción celular (Arroyo y Alderete, 1989; 1995), en la degradación de inmunoglobulinas (Provenzano y col., 1995), en la resistencia al complemento (Alderete y cols. 1995) y apoptosis (Sommer y col., 2005). Actualmente se conoce que *T. vaginalis* contiene 123 genes que codifican para metaloproteinasas (Carlton y col. 2007), de estos solo se reporta la existencia de 2 metaloproteinasas de masa molecular mayor a 220 y 140 kDa, identificadas con ensayos de actividad por zimogramas (Bozner y col., 1991), además se reporta la caracterización de la metaloproteína de 47 kDa denominada  $\beta$ HPP en *T. vaginalis* (Brown, y cols., 2007), por ello, la identificación y caracterización de metaloproteinasas es necesaria debido a que posiblemente estas participan en el desarrollo de la tricomonosis.

El presente trabajo se basó en la caracterización de la proteínasa TvMP50 que se sobreexpresa e inmunodetecta en parásitos en presencia de 1.6 mM  $Zn^{2+}$  (Vazquez-Carrillo y col., 2011). Primero se realizó un análisis bioinformático de TvMP50, se construyó un árbol filogenético donde se determinó la relación filogenética de TvMP50 con metaloproteinasas de otros organismos como: bacterias, plantas, algas, levadura y humano. El árbol filogenético mostró que TvMP50 tiene un origen común de tipo bacteriano correspondiente a metionil aminopeptidasa de *E. coli* (MEROO1243), lo cual coincide con lo observado en el análisis bioinformático de la metaloproteína  $\beta$ HPP de *T. vaginalis* (Brown y cols., 2007), y para la SUB 1 del tipo serín proteasa en *T. vaginalis* (Hernández-Romano y cols., 2010). Este resultado sugirió que de igual manera que los otros proteinasas esta fue adquirida a través de la transferencia bacteriana. Asimismo se observó la presencia de una posible duplicación génica de TvMP50, descrita como un evento característico en el genoma de *T. vaginalis*. Un ejemplo de duplicación génica es el encontrado para los genes de *tveiF5a 1* y *2*, los cuales se expresan en distintas condiciones microambientales y son afectados por la presencia de poliaminas (Carvajal-Gamez y cols., 2010).

Se identificaron los aminoácidos que conforman el sitio activo de TvMP50 y se observó la conservación de histidinas (H), ácidos aspárticos (D) y ácidos glutámicos (E) (<http://merops.sanger.ac.uk/>). Esto era esperado debido a que las metaloproteinasas conforman generalmente su sitio catalítico de H, D y E, lo cual ha sido observado en la metaloproteinasa  $\beta$ HPP de *T. vaginalis* que contiene la sitio catalítico HXXEHX<sub>76</sub>H correspondiente al clan M16 (Brown y cols. 2007). Las posiciones identificadas en TvMP50 están descritas para metaloproteinasas del clan MG, familia M24 y específicamente para la subfamilia B, implicada en el reciclamiento del colágeno (Myara y col. 1994), esto sugiere la posible función de TvMP50. De igual forma el análisis del sitio catalítico evidenció el tipo de proteinasa en la caracterización *In silico* de SUB1 (subtilisine-like serine proteinase of *Trichomonas vaginalis*) (Hernández-Romano y cols., 2010).

Por otra parte el análisis de la estructura secundaria y terciaria de TvMP50 mostró que TvMP50 es rica en  $\alpha$  hélices y hojas  $\beta$ , estas se agrupan a nivel de estructura terciaria en una forma característica “pita bread” (Bazan y col. 1994), conformada de dos  $\alpha$  hélices con dos hojas  $\beta$  antiparalelas. Esto ha sido caracterizado para metaloproteinasas presentes en otros organismo como: *E. coli*, *D. dadantii*, *G. intestinalis*, *S. cerevisiae*, *O. tauri* y *H. sapiens* (<http://merops.sanger.ac.uk/>), igualmente se ha identificado que el plegamiento “pita bread” se presenta comúnmente en aminopeptidasas como: la metionil aminopeptidasa, prolidasa, aminopeptidasa P y creatinasa (Bazan y col., 1994). Hasta el momento se puede sugerir por el análisis *In silico* que TvMP50 pertenece al clan MG, familia M24 y subfamilia B, con una posible función de reciclamiento o procesamiento del colágeno.

Por otra lado, analizamos el nivel de expresión del gen *mp50* en dos aislados de *Trichomonas vaginalis*, uno correspondiente a mujer CNCD147 y el otro correspondiente a hombre HGMN01, en donde obtuvimos una expresión diferencial entre los dos aislados en ausencia y presencia de  $Zn^{2+}$ .

Por ello el análisis mostró que el transcrito de *mp50* es expresado en presencia de 1.6 mM de  $Zn^{2+}$  en ambos aislados. Sin embargo, el aislado de mujer no expresa el transcrito de *mp50* en ausencia de  $Zn^{2+}$ , mientras que el aislado de hombre (HGMN 01) el transcrito de *mp50* si es expresado en ausencia de este catión y es sobreexpresado en presencia de  $Zn^{2+}$ . Esto era de esperarse debido a que las metaloproteinasas del clan MG requieren  $Zn^{2+}$  para el correcto plegamiento y función del sitio activo (Maret y col., 2009). Estos datos sugieren que el parásito es capaz de adaptarse y expresar esta metaloproteinasa que puedan participar en el establecimiento de la infección en un microambiente en presencia de  $Zn^{2+}$ , como en el tracto urogenital del hombre. Por ello, la expresión de TvMP50 probablemente esté funcionando como un factor que colabora con el establecimiento de la infección, esto relacionándolo con la baja expresión de CPs de *T. vaginalis* en condiciones de  $Zn^{2+}$  (Vázquez-Carrillo, tesis de maestría, 2009).

Estudios previos han mostrado que la expresión de CPs (CP65 y CP39) se encuentra regulada negativamente por la presencia de  $Fe^{2+}$  (Álvarez-Sánchez y cols. 2000 y Hernández-Gutiérrez y cols. 2004).

Otras moléculas que existen en el microambiente de la vagina como son las poliaminas también afectan la expresión de CP65 y otras moléculas como TveIF-5A de *T. vaginalis* (Alvarez-Sánchez y col. 2008). Conjuntamente estos estudios y nuestros resultados sugieren que la presencia de cationes en el microambiente afecta directamente la expresión de proteinasas en *T. vaginalis*. TvMP50 fue clonada, expresada y purificada como proteinasa recombinante (TvMP50r) obteniendo una masa molecular de 50 kDa, sin embargo esta no es la primera metaloproteinasa caracterizada.

Recientemente se reportó la existencia de una metaloproteinasa denominada  $\beta$ HPP (Brown y cols., 2007), donde se describe la clonación y expresión de la metaloproteinasa de 47 kDa recombinante de *T. vaginalis*, con la cual se

realizaron ensayos funcionales evidenciando su función proteolítica de péptidos N-terminal hidrogenosomales, además se obtuvieron anticuerpos anti-  $\beta$ HPP recombinante y se localizó la metaloproteínasa en hidrogenosoma (Brown y col.,2007).

El sistema de clonación propuesto para la expresión de TvMP50r fue utilizado en la clonación de la cisteín proteínasa de *Entamoeba histolytica* (EhCP112), el vector de expresión pQE-80L permitió la expresión de EhCP112 recombinante como precursor inactivo en cuerpos de inclusión, los cuales se purificaron en condiciones desnaturalizantes y se continuó con un paso de replegamiento, resultando en la obtención de actividad del precursor de EhCP112 recombinante permitiendo la caracterización bioquímica (Quintas-Granados y col., 2009). Además TvMP50r se utilizó para la obtención de anticuerpos anti-TvMP50r resultando positivamente la especificidad y reactividad del suero de ratones anti-TvMP50r, lo cual permitió inmunolocalizar e inmunodetectar a TvMP50 nativa en *T. vaginalis*. Esto mismo fue realizado para determinar la ubicación celular de otras proteínasas y un caso particular es el de la SUB 1 en *T. vaginalis* (Hernández-Romero y cols., 2010).

En otros reportes también se ha llevado a cabo la inmunolocalización de proteínasas en *T. vaginalis*, como es el caso de CP65, esta no se observa en parásitos crecidos en presencia de  $Zn^{2+}$  (Vazquez-Carrillo, y cols., 2011), mientras que la TvMP50 fue inmunolocalizada en superficie y en citoplasma en *T. vaginalis* en presencia de  $Zn^{2+}$ . Además en parásitos crecidos en presencia del inhibidor DAB y putresina exógena, se muestra la presencia de CP65 presente en superficie, lo cual refleja que la expresión de CP65 es regulada positivamente por la presencia de poliaminas (Alvarez-Sánchez y cols., 2008). En el caso de SUB 1 esta fue localizada en superficie y en pequeñas vesículas en el citoplasma de *T. vaginalis* (Hernández-Romano y col., 2010) mientras que la metaloproteínasa  $\beta$ HPP de *T. vaginalis* fue colocalizada en hidrogenosomas correspondiendo a lo esperado y lo descrito para la proteínasa procesadora mitocondrial (MPP) de organismos eucariontes (Brown y cols., 2007).

Nuestros datos demuestran que la sobreexpresión de TvMP50 en *T. vaginalis* es dependiente de la presencia de  $Zn^{2+}$ , sin embargo la caracterización bioquímica de TvMP50 y la caracterización de los genes de metaloproteinasas en condiciones de  $Zn^{2+}$  permitirá entender la participación de las metaloproteinasas en el establecimiento de la tricomonosis en el hombre.

## 6. Conclusiones

- TvMP50 podría corresponder a una metaloproteinasa del clan MG en la familia M24 en la subfamilia B.
- El transcrito de *mp50* se expresa en presencia de  $Zn^{2+}$  y es sobre-expresado en el aislado de *T. vaginalis* HGMN01 de paciente masculino con tricomonosis.
- TvMP50r es de 50 kDa y es inmunoreconocida por el suero policlonal anti-TvMP50r
- TvMP50 es localizada en citoplasma y en superficie de *T. vaginalis*.

## Perspectivas

- Caracterizar bioquímicamente a TvMP50.
- Determinar la función de TvMP50 durante la tricomonosis en el hombre.
- Estudiar el mecanismo de regulación génica a nivel transcripcional y/o posttranscripcional de TvMP50 en *T. vaginalis*.

## Bibliografía:

- Alderete, J. F., R. Arroyo, and M. W. Lehker. (1995) **Analysis for adhesins and specific cytoadhesion of *Trichomonas vaginalis***. *Methods Enzymol.* 253: 407–414.
- Alderete, J. F., R. Arroyo, D. C. Dailey, J. Engbring, M. A. Khoshnan, and M. W. Lehker. (1992) **Molecular analysis of *Trichomonas vaginalis* surface protein repertoires**. *Mol. Cell Biol. Hum. Dis. Ser.* 1:173–202.
- Alderete, J. F., and G. E. Garza. 1988. **Identification and properties of *Trichomonas vaginalis* proteins involved in cytoadherence**. *Infect. Immun.* 56:28–33.
- Andreini, C., Banci, L., Bertini, I., Rosato, A. (2006) **A Zinc through the three domains of life**. *J. Proteome Res.* 5: 3173.
- Álvarez-Sánchez, M., Ávila-González, L., Becerril-García, C., Fattel-Facenda, L., Ortega-López, J., and Arroyo, R. (2000). **A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity**. *Microb Pathog.* 28: 193-202.
- Alvarez-Sánchez M.E., Solano-González, E., Yañez-Gómez, C., Arroyo R. (2007) **Negative iron regulation of the CP65 cysteine proteinase cytotoxicity in *Trichomonas vaginalis***. *Microb Infect.* 9:1597–605.
- Arroyo, R., J. Engbring, and J. F. Alderete. (1992) **Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis***. *Mol. Microbiol.* 6:853–862.
- Arroyo, R., Alderete, J.F. (1995) **Two *Trichomonas vaginalis* Surface Proteinases Bind to Host Epithelial Cell and Are related to Leves of Cytoadherence and Cytotoxicity**. *ARCH MED RES* 26: 279-285.
- Arroyo, R., and Alderete, J.F. (1989). ***Trichomonas vaginalis* surface proteinasa activity is necessary for parasite cytoadherence**. *Infect Immun* 57: 2991-2997.

- Arroyo, R., González-Robles, A., Martínez-Palomo, A., and Alderete, JF. (1993). **Signalling of *Trichomonas vaginalis* for amoeboid transformation and adhesin synthesis follows cytoadherence.** *Mol. Microbiol* 7: 299-309.
- Bazan, J.F., Weaver, L.H., Roderick, S.L., Huber, R., and Matthews, B.W. (1994) **Sequence and structure comparison suggest that methionine aminopeptidase, prolidase, aminopeptidase P, and creatinase share a common fold.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 2473-2477.
- Benchimol, M., Andrade, I., Silvar, R., and Burla, J. (2008) ***Trichomonas* adhere and phagocytose sperm cells: adhesion seems to be a prominent stage during interaction.** *Parasitol Res* 102:597-604.
- Boyle, M.C.D., Barton, S.E., Uthayakumar, S., Hays, P. E., Pollock, J. W., Steer, P. J., Smith, J. R. (2003) **Is bacterial vaginosis associated with cervical intraepithelial neoplasia?.** *Int. J. Gynecol Cancer* 13: 159-163.
- Beachey, E.H., Giampap, C.S., and Abraham, S.N., (1988) **Bacterial adherence Adhesin receptor mediated attachment of pathogenic bacterial mucosal surfaces.** *AM Rev Respir. Dis* 138: 545-548.
- Bird, A., Evans-Galea, M. V., Blankman, E., Zhao, H., Luo, H., Winge, D. R., and Eide, D. J. (2000) **Mapping the DNA binding domain of the Zap1 zinc-responsive transcriptional activator.** *J. Biol. Chem.* 275:16160–16166.
- Bird, A. K., McCall, Kramer, M., Blankman, E., Winge, D. R., and Eide, D. J. (2003) **Zinc fingers can act as Zn<sup>2+</sup> sensors to regulate transcriptional activation domain function.** *EMBO J.* 22:5137–5146.
- Bozner, P., and Demes, P.V. (1991). **Proteinases in *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas mobilensis* are not exclusively of cistein type.** *Parasitol.*120:113-115.
- Brugnera, E., Georgiev, O., Radtke, F., Heuchel, R., Baker, E., Sutherland, G. R., and Schaffner, W. (1994). **Cloning, chromosomal mapping, and**

**characterization of the human metal-regulatory transcription factor MTF-1.** *Nucleic Acids Res.* 22:3167–3173.

- Carlton, J., Hirt, R., Silva, J., Delcher, A., Schatz, M., Zhao, Q., Wortman, J., Bidwell, S., Alsmark, C., Besteiro, S., Sicheritz-Ponten, T., Noel, C., Dacks, J., Foster, P., Simillion, C., Van de Peer, Y., Miranda-Saavedra, D., Barton, G., Westrop, G., Müller, S., Dessi, D., Luigi Fiori, P., Ren, Q., Paulsen, I., Zhang, H., Bastida-Corcuera, F., Simoes-Barbosa, A., Brown, M., Hayes, R., Mukherjee, M., Okumura, C., Schneider, R., Smith, A., Vanacova, S., Villalvazo, M., Haas, B., Pertea, M., Feldblyum, T., Utterback, T., Shu, Ch-L., Osoegawa, K., de Jong, P., Hrdy, I., Horvathova, L., Zubacova, Z., Dolezal, P., Malik, Sh-B., Logsdon, J., Henze, K., Gupta, A., Wang, Ch., Dunne, R., Upcroft, J., Upcroft, P., White, O., Salzberg, S., Tang, P., Chiu, Ch-H., Lee, Y-Sh., Embley, M., Coombs, G., Mottram, J., Tachezy, J., Fraser-Liggett, C., and Johnson, P. (2007) **Draft Genome Sequence of the Sexually Transmitted Pathogen *Trichomonas vaginalis*.** *Science.* 315: 207-212.
- Cascales, A.M., Álvarez-Gómez, J.Á.(2010) **Metaloproteinasas, matriz extracelular y cáncer.** *An. R. Acad. Nac. Farm* 76:59-8.
- Chang, P.C., and Lee, Y.H. (1992) **Extracellular autoprocessing of a metalloprotease from *Streptomyces cacaoi*.** *J Biol Chem* 267: 3952-3958
- Donne, M.A. (1836). **Animacules observes dans les matieres purulentes et le produit des secretions des organes genitaux de l'homme et de la femme.** *C. R. Acad. Sci.* 3:385-386
- Cragg, R. A., Christie, G.R., Phillips, S.R., Russi, R.M., Kury, S., Mathers, J.C., Taylor, P.M., and Ford, D. (2002) **A novel zinc-regulated human zinc transporter, hZTL1, is localized to the enterocyte apical membrane.** *J. Biol Chem.* 277:22789-22777.,
- Dalton, T.P., Solis, W.A., Nebert, D.W., and Carvan, M.J. III. (2000) **Characterization of the MTF-1 transcription factor from zebrafish and trout cells.** *Comp. Biochem. Physiol.* 26:325-335.

- De Jesus, J.B., Cuervo, P., Junqueira, M., Britto, C., Silva-Filho, F.C., Soares, M.J., Cupolillo, E., Fermanades, O., Domont, G.B. (2007) **A further proteomics study on the effect of iron in the human pathogen *Trichomonas vaginalis***. *Proteomics* 7: 1961-1972.
- Egeblad Mikala and Werb Zena.(2002). **New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression**. *Nature Reviews Cancer*. 2:161-174
- Evans-Galea, M V., Blankman, E., Myszka, D.G., Bird, A.J., Eide, D.J. and Winge, D.R. (2003) **Multiple regulatory mechanisms maintain zinc homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae***. *J. Nutr.* 133:1532S-1535S.
- Folgueras, R. A., Pendás, M., A. L., and López-Otín, C. (2002). **Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies**. *Int. J. Dev. Biol.* 48: 411-424.
- Freije, J.R.; Bischoff, R. (2006). **Matrix metallo-proteases**. *Drug Discov. Today Tech*, 3: 5-11.
- García, A.F., Benchimol, M., and Alderete, J.F. (2005) ***Trichomonas vaginalis* polyamine metabolism is linked to host cell adherente and cytotoxicity**. *Infect. Inmmu.* 26, 2261.
- García, F.A., and Alderete, JF. (2007). **Characterization of the *Trichomonas vaginalis* surface-associated AP-65 and biding domain interacting with *Trichomonas* and host cells**. *BMC Microbiol.* 7: 116.
- Grotz, N., Fox, T., Connolly, E., Park, W., Guerinot, M. L., and Eide, D. (1998) **Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:7220–7224.
- Guenther, P.C., Secor, E.W., Dezzutti, C.S. (2005) ***Trichomonas vaginalis*. induced Epithelial Monolayer Disruption and Human Ommunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Replication: implications for the sexual transmission of HIV-1**. *Infect and Immun* 7: 4155-4160.

- Hardy, P.H., Hardy, J.B., Nell, E.E., Graham, D.A., Spence, M.R., Rosembaum, R.C. (1984) **Prevalence of six sexually transmitted disease agents among pregnant inner-city adolescents and pregnancy outcome.** *lance.* 333-337.
- Henderson, B.R., Menotti, E., Bonnard, C., Kühn, L.C. (1994) **Optimal sequence and structure of iron-responsive elements.** *J. Biol. Chem.* 269: 17481-17489
- Heuchel, R., Radtke, F., Georgiev, O., Stark, G., Aguet, M., and Schaffner, W. (1994) **The transcription factor MTF-1 is essential for basal and heavy metal-induced metallothionein gene expression.** *EMBO J.* 13:2870-2875.
- Hernández-Gutiérrez, R., Ortega-López, J., and Arroyo, R. (2003). **A 39-kDa Cysteine Proteinase CP39 from *Trichomonas vaginalis*, Which Is Negatively Affected by Iron May Be Involved in Trichomonal Cytotoxicity.** *J. Eukaryot. Microbiol.* 50: 696-698.
- Hernández-Gutiérrez, R., Avila-González, L., Ortega-López, J., Cruz-Talonia, F., Gómez-Gutierrez, G., and Arroyo, R. (2004) ***Trichomonas vaginalis*: characterization of a 39-kDa cysteine proteinase found in patient vaginal secretions.** *Exp Parasitol* 107:125–35.
- Hernández-Romano, P., Hernández, R., Arroyo R., Alderete, J., Villaseñor-López, I. (2010). **Identification and characterization of a surface-associated, subtilisin-like serine protease in *Trichomonas vaginalis*.** *Parasitol.* 137:1621–1635.
- Honigber, B. M., and Brugerolle, G. (1990). ***Trichomonas* parasitic in humans**, springer-verlag *Structure*, 5-35.
- Johnson, P. E., Hunt, C. D., Milne, D. B., and Mullen, L. K. (1993) **Homeostatic control of zinc metabolism in men: zinc excretion and balance in men fed diets low in zinc.** *Am. J. Clin. Nutr.* 57: 557–565.
- Kang, J.H., Song, H.O., Ryu, J.S., Shin, M.H., Kim, J.M., Cho, Y.S., Alderete, J.F., Ahn, M.H., and Mind, Y. (2006). ***Trichomonas vaginalis***

- promotes apoptosis of human neutrophils by activating caspase-3 and reducing Mcl-1 expression.** *Parasite Immunol.* 28:439-446.
- Krieger, J.N., and Rein, M.F. (1982). **Canine Prostatic secretions Kill *Trichomonas vaginalis*.** *Infection and Immunity.* *Infect and Immun* 37: 77-81.
  - Krieger, J.N., Jenny, C., Verdón, M., Siegel, N. (1993). **Clinical Manifestations of Trichomoniasis in Men.** *Ann Intern Med.*118: 844-849
  - Kummer, S., Hayes, G.R., Gilbert, R.O., Beach, D.H., Lucas, J.J., and Singh, B.N. (2008). **Induction of human host cell apoptosis by *Trichomonas vaginalis* cysteine proteases is modulated by parasite exposure to iron.** *Microbial Pathogenesis.*44: 197-203.
  - Laga, M., Zzila, N., Goeman, J. (1991) **The Interrelationship of sexually transmitted disease and VIH infection: implication for the control of both epidemics in Africa.** *AIDSS (Suppl.1)* 555-563.
  - Lagmade, S. J., Ravindra R., Daniels P.J., and Andrews G.K. (2000) **The transcription factor MTF-1 mediates metal regulation of the mouse *ZnT1* gene.** *J.Biol.Chem.* 275: 34803-34809.
  - Laing, L.G., Hall, K.B., (1996) **A model of the iron responsive element RNA hairpinloop structure from NMR and thermodynamic data.** *Biochem.* 35, 13586–13596.
  - Lin, E., Graziano, J.H., Freyer, G.A., 2001. **Regulation of the 75-kDa subunit of mitochondrial complex I by iron.** *J. Biol. Chem.* 276, 27685–27692.
  - Lehker, M.W., and Alderete, J.F., (2000). **Biology of trichomonosis.** *Current Opinion in Infectious Diseases.* 13: 37-45.
  - Lehker, M.W., Arroyo, R., and Alderete, J.F. (1991). **The Regulation by Iron of the Synthesis of Adhesins and Cytoadherence Levels in the Protozoan *Trichomonas vaginalis*.** *J. Exp. Med.* 14:311-318.
  - Liston, D.R., Johnson, P.J. (1998) **Gene transcription in *Trichomonas vaginalis*.** *Parasitol Today* 14: 261-265.

- Liston, D.R., Carrero, J.C., Johnson, P.J. (1999) **Upstream regulatory sequences required for expression of the *Trichomonas vaginalis* alpha-succinyl CoA syntetase gene.** *Mol Biochem. Parasitol* 104, 223-329.
- Liston, D. R., Lau, A. O. T., Ortiz, D., Smale, S. T., Johnson, P. J. (2001). **Initiator Recognition in a Primitive Eukaryote: IBP39, an Initiator-Binding Protein from *Trichomonas vaginalis*.** *Mol. Cell. Biol.* 21: 7872-7882.
- Lowther, W., Todd, and Matthews, W., Brian (2002) **Metalloaminopeptidases: Common Functional Themes in Disparate Structural Surroundings.** *Chem. Rev.* 102: 4581-4607.
- López-Otín, C., and Bond, J. S. (2008) **Proteases: multifunctional enzymes in life and disease.** *J. Biol. Chem.* 283: 31433-31437.
- Maret, W., and Li, Y. (2009) **Coordination Dynamics of Zinc in proteins.** *Chem. Rev.* 109: 4682-47-07.
- Maret, W. (2004) **Exploring the zinc proteome.** *J. Anal. At. Spectrom.* 19:15-19.
- Massova, I., Kotra, P., Lakshmi, F. R., and Mobashery S. (1998). **Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification.** *FASEB J.* 12: 1075–1095.
- Mendoza-López, M.R., Becerril-García, C., Fattel-Facenda, L.V., Avila-Gonzalez, L., Ruíz-Tachiquin, M.E., Ortega-López, J., Arroyo, R. (2000) **CP30, a Cysteine Proteinase Involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence** *Infect. and Immun.* 68:4907-4913.
- Moreno-Brito, V., Yáñez-Gómez, C., Meza-Cervantez, P., Ávila-González, L., Alberto Rodríguez, M., Ortega-López, J., González-Robles, A., and Arroyo, R. (2005). **A *Trichomonas vaginalis* 120 kDa protein with identity to genosome pyruvate:ferredoxin oxidoreductase is a surface adhesin induced by iron.** *Cellular Microbiol.* 7:245-258.

- McCal A. Keith . Huang I. Chih-chin and. Fierke A. Carol.(2000) **Function and Mechanism of Zinc Metalloenzymes**. *J. Nutr.* 130:1437S—144
- McCance, R. A. y Widdowson, E. M. (1942) **The absorption and excretion of zinc**. *Biochem. J.* 36: 692–696
- Myara, I., Cosson, C., Moatti, N., and Lemonnier, A.(1994) **Human kidney prolidase-purification, preincubation properties and immunological reactivity**. *Int J Biochem* 26: 207-214.
- Müller, M., (1990). **Biochmistry of *Trichomonas vaginalis***, In B.M. Honigberg (ed), *Trichomonas vaginalis parasitic in humans*. *Sprinderverlag, New York, N.Y.* 53-83
- Müller, M, Lossick, J.G., and Gorrell, T.E. (1988) **Energy metabolism of protozoa without mitochondria**. *Annu. Rev. Microbiol.* 42: 465-488.
- Nagase, H., Visse, R., Murphy, G. (2006) **Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs**. *Elsevier B.V Cardiovascular Research*. 69:562–573.
- Pantopoulos, K., (2004) **Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system**. An update. *Ann N.Y. Acad. Sci* 1012:1-13.
- Pereira-Neves A., Benchimol, M. (2007) **Phagocytosis by *Trichomonas vaginalis*: new insights**. *Biol. Cell* 99: 87-101.
- Petrin, D., Delgaty, K., Bhatt, R., and Garber, G. (1998). **Clinical and Microbiological Aspects of *Trichomonas vaginalis***. *Clin. Microb. Rev.* 11: 300-317.
- Provenzano, D., and Alderete, J.F. (1995) **Analysis of human immunoglobulin-degrading cysteine proteinases of *Trichomonas vaginalis***. *Infect. Immun.*63:3388-3395.
- Quintas-Granados L. I., Orozco E., Briebe L. G., Arroyo R., Ortega-López J.(2009) **Purification, refolding and autoactivation of the recombinant cysteine proteinase**. *Protein Expression and Purification*. 63:26–32.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J. & Bateman, A. (2010) **MEROPS: the peptidase database**. *Nucleic Acids Res* 38: D227-D233

- Rawlings, N.D., and Barrett, A.J. (1993) **Evolutionary families of peptidases**. *Biochem. J.* 290: 205-218.
- Reeck, G.R., de Haën, C., Teller, D.C., Doolittle, R.F., Fitch, W.M., Dickerson, R.E., Chambon, P., McLachlan, A.D., Margoliash, E., Jukes, T.H. and Zuckerkandl, E. (1987) **'Homology' in proteins and nucleic acids: a terminology muddle and a way out of it**. *Cell.* 50: 667.
- Richardson, J.S. (1985) **Schematic drawings of protein structures**. *Methods Enzymol.* 115: 359-380.
- Schwebke, JR., and Burgess, D. (2004). **Trichomoniasis**. *Clin. Microbiol. Rev.* 17:794-803.
- Rouault, T., Klausner, R. (1997) **Regulation of metabolism in eukaryotes** *curr. Top. Cell regul.* 35: 1-19.
- Sebek, V. (1987) ***Trichomonas pyosalpinx***. *Cesk. Gynecol.* 37: 14-15. (In Czech).
- Sommer, U., Costello ,C.E., Hayes, G.R., Beach, D.H., Gilbert, R.O., Lucas, J.L. and Singh, B.N. (2005) Identification of *Trichomonas vaginalis* cistein proteases that induce apoptisis in human vaginalis epitheal cells. *J. Biol Chem.* 280, 23853-23860.
- Sutcliffe, S., Giovannucci, E., Alderete, JF., Chang, T-H., Gaydos, CA., Zenilman, JM., De Marzo, AM., Willett, WC., and Platz, EA. (2006). **Plasma Antibodies against *Trichomonas vaginalis* and Subsequent Risk of Prostate Cancer**. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 15: 939-945.
- Swygard, H., Seña, AC., Hobbs, MM., and Cohen, MS. (2004). **Trichomoniasis: clinical manifestations, diagnosis and management**. *Sex Transm Infect.* 80:91-95.
- Tuttle, J., Holbrook, T. and Derrick, F. (1977) **Interference of human spermatozoa motility by *Trichomonas vaginalis***. *J. Urol.* 118
- Vázquez-Carrillo, L. Isabel. (2009) **Caracterizacion de la interaccion de *Trichomonas vaginalis* con celulas DU-145**. Tesis de maestría UACM.

- Vázquez-Carrillo, L. Isabel. (2011). **The effect of Zn<sup>2+</sup> on prostatic cell cytotoxicity caused by *Trichomonas vaginalis*.** *JIOMICS*, DOI: 10.5584/jiomics.v2011i2011.56.
- Vincenti, P., Matthew, and Brinckerhoff, E. (2002) **Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors.** *BioMed Central, Arthritis Res*; 4:157-164.
- Westermarck, J., and Hari, V. (1999). **Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion.** *The FASEB Journal*, 13: 0892-6638.
- Yao, J. E., Donelson, M. E., Wilson, Mol. (2003) **The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function.** *Parasitol.* 132: 1.
- Yarlett, N., Martinez, M. P., Goldberg, B., Kramer, D.L., Porter, C.W., (2000) **Depence *Trichomonas vaginalis* upon polyamine backconversion.** *Microbiol.* 146: 2715-2722.
- Zhao, H., and Eide, D. J. (1997) **Zap1p, a metalloregulatory protein involved in zinc-responsive transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Mol. Cell. Biol.* 17:5044–5052.
- Zhang, Z.F., Begg, C.B., (1994) **Is *Trichomonas vaginalis* a cause of cervical neoplasia? Results from a combined analysis of 24 studies.** *Int J Epidemiol* ;23:682-90.
- Zhang, Z.F., Graham, S., Yu, S. Z., Marshall, J. Zielesny, M., Chen, T.X., Sun, M., Tang, S.L., Liao, C.S., Xu, J.L., y cols. (1995) ***Trichomonas vaginalis* and cervical cáncer. A prospective study in china.** *Ann Epidemol.* 5:325-332.

## Libros:

- LEWIN, B. (1997). *Genes VII*. 7ª Edición. Oxford University Press. U.S.A.
- MURRAY, R. (2001). *Bioquímica de Harper* 15ª Edición. Manual Moderno, México, D.F.

## Consultas en línea:

- <http://trichdb.org/trichdb/>
- <http://merops.sanger.ac.uk/>
- <http://workbench.sdsc.edu/>
- <http://www.expasy.ch/>
- <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>
- <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- <http://www.uniprot.org/>
- SUIVE, Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica (2010) [www.dgepi.salud.gob.mx/infoepi/manual\\_not.pdf](http://www.dgepi.salud.gob.mx/infoepi/manual_not.pdf)
- SUIVE, Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica (2011) [www.dgepi.salud.gob.mx/infoepi/manual\\_not.pdf](http://www.dgepi.salud.gob.mx/infoepi/manual_not.pdf)

## 8. Apéndice

### Gel de agarosa al 1%

Agarosa (Gibco BRL)	0.02 g
TAE 1X	20 ml
Red gel	1µl x cada 6 µl de BM2X
Amortiguador de TAE 50X	
Trizma Base (Sigma)	242 g
Acido Acetico glacial	57.1 ml
EDTA (Sigma)	37.2 g

Se afora a 1 litro con H<sub>2</sub>O destilada, se ajusta el pH a 8.5

### Extracción de DNA

#### PBS 1X

NaCl (MERCK)	8 g
KCl	8 g
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.65 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 g

Se ajusto el pH a 7.4 con NaOH o HCl se afora a 1 litro con agua destilada y se esteriliza por autoclave.

### **Amortiguador de lisis**

SDS (Sigma)	0.2 %
NaCl	100 mM
EDTA	100 mM, pH 8.0
Tris-HCl	10 mM, pH 8.0

### **Etanol 70%**

Para 50 ml

Etanol al 100%	35 %
H <sub>2</sub> O destilada	15 %

### **Medio Luria Bertani (LB)**

NaCl	10 g
Tristona	10 g
Extracto de levadura	5 g

Se ajusta el pH a 7.0 y se afora con H<sub>2</sub>O destilada a 1 litro. Por último se esteriliza en autoclave

### **Ampicilina (100 µg/ml)**

Se filtra por 0.22 µm, para esterilizar y se protege de la luz.

### **Kanamicina (25 µg/ml)**

Se filtra por 0.22 µm, para esterilizar y se protege de la luz.

### **Stock de IPTG 100 mM**

Se filtra por 0.22  $\mu$ m, para esterilizar y se protege de la luz.

### **Placas de LB-Ampicilina**

20 g de LB agar bacteriológico, después de haberlo esterilizado por autoclave y a una temperatura de 45 °C se adiciona ampicilina (100  $\mu$ g/ml) y se transfiere a cajas de petri esteriles.

### **Extracción de RNA total**

Etanol al 70 %

Etanol absoluto                      700 ml

H<sub>2</sub>O-DEPC                              300 ml

### **Acrilamida al 30 %/bisacrilamida al 0.8 %**

Acrilamida                              29.2 g

Bisacrilamida                          0.8 g

Disolver en 40 ml de agua destilada. Una vez disuelto aforar hasta 100 ml

Filtrar a través de papel filtro "Whatman" No 1.

Almacenar a 4 °C hasta un mes, previamente protegido de la luz.

### **Tris-HCl 4 x, pH 8.8 (1.5 M Tris-Cl, 0.4 % SDS)**

Tris-base (sigma)                      9.08 g

SDS (Sigma)                              0.2 g

Disolver en 20 ml de agua destilada y ajustar a pH 8.8 con HCl.

Aforar a un volumen final de 50 ml con agua destilada. Filtrar la solución almacenar a 25°C.

### **Tris-HCl/SDS 4x,pH 6.8 (1.5 M Tris-Cl, 0.4 % SDS)**

Tris-base (sigma) 3.025 g

SDS (Sigma) 0.2 g

Disolver en 20 ml de agua destilada y ajustar a pH a 6.8 con HCl.

Aforar a un volumen final de 50 ml con agua destilada. Filtrar la solución almacenar a 25°C.

#### **Persulfato de amonio al 10%**

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

#### **TEMED (Bio Rad)**

0.01 ml (10 µl)

#### **SDS-amortiguador 2x**

Tris-base (sigma) 1.52 g

SDS (Sigma) 2 g

Disolver en 50 ml de agua destilada y ajustar a pH 6.8 . posteriormente

Adicionar:

Glicerol 20 ml

Agua destilada (aforar a 100 ml)

#### **Amortiguador de muestra 1X (BX 1x)**

SDS-amortiguador 2x 500 µl

$\beta$ - mercaptoetanol 5%	50 $\mu$ l
azul de bromofenol	50 $\mu$ l
(stock 10 mg/ml)	
Agua destilada	400 $\mu$ l
Agua destilada (aforar a 100 ml)	

#### **Amortiguador de muestra 2x (BX 2x)**

SDS-amortiguador 2x	400 $\mu$ l
$\beta$ - mercaptoetanol 5%	50 $\mu$ l
azul de bromofenol	50 $\mu$ l
(stock 10 mg/ml)	
Agua destilada	400 $\mu$ l

#### **Amortiguador de electroforesis 5x**

Glicina (sigma)	72 g
Trizma-sigma (Sigma)	15.1 g
SDS (Sigma)	5.0 g

#### **Amortiguador de electroforesis 1x**

Amortiguador de electroforesis 5X	100 ml
Agua destilada	400 ml

#### **Solución colorante de proteínas (AZULBRILLANTE DE Coomassie) 0.05%**

Metanol	500 ml
---------	--------

Acido acético glaciado 100 ml

Agua destilada 400 ml

Azul de Coomassie 0.5 g

Disolver toda la noche. Filtrar con papel filtro "Whatman" No. 1 Almacenar a temperatura ambiente

### **Solución decolorante de geles de poliacrilamida**

Metanol 165 ml

Acido acético glaciado 50 ml

Agua destilada 785 ml

Almacenar a temperatura ambiente.

### **Preparación de gelatina al 9%**

0.0324 g en 10 ml de agua destilada incubada a 37 °C para solubilizar.

### **Gel separador**

4.50 ml poliacrilamida/bisacrilamida al 30%

3.75 4x Tris-Cl/SDS pH 8.8

6.75 ml gelatina al 9 %

50 µl persulfato de amonio al 10%

10 µl de TEMED

### **Gel concentrador**

0.65 ml poliacrilamida/bisacrilamida al 30 %

1.25 ml 4x Tris-Cl/SDS pH 6.8

3.05 ml Agua

25 µl persulfato de amonio al 10%

5 µl de TEMED

Tritón X-100 al 2.5%

Tritón X-100            25 ml

H<sub>2</sub>O destilada    cbp 1000 ml

### **Amortiguador de transferencia**

Trizma-base 25 mM    3.03g

Glicina    190 mM            14.25 g

Metanol    20%                    200 ml

Disolver primero el Trizma y la glicina. Una vez disueltos, agregar el metanol y finalmente, se afora a 1 litro con agua destilada. Enfriar a 4°C hasta su uso.

### **TBS 1x pH 7.0**

Trizma-base 20 mM    2.42 g

NaCl    500mM                29.22 g

Disolver en 500 ml de agua destilada, ajustar el pH a 7.5 y aforar a 1 litro con agua destilada.

Solución reveladora HRP (por color Bio-Rad)

### **Solución A:**

HRP                    7.5 mg

Metanol frio        2.5 ml

### **Solución B:**

TBS 1 x pH 7.5 12.5 ml

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 7.5

Primero se prepara la solución B, se mezcla el TBS 1x con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, posteriormente se prepara la solución A, se mezcla al reactivo HRP (Bio-Rad) en los 2.5 ml de metanol frío y se adiciona a la solución B.

### **Paraformaldehído 4%**

Paraformaldehído 4 g en 100 ml de PBS 1x previamente filtrado, se disuelve a 55°C y se adiciona 4 gotas de NaOH hasta disolver totalmente.

### **PBS 1x**

NaCl (MERCK)	8 g
KCl	8 g
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.65 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 g

Se disuelve en 500 ml de agua destilada y se ajusta pH a pH 7.0, posteriormente se afora a 1 litro y se esteriliza por autoclave, se filtra por membrana de 0.22 µm.

### **NH<sub>4</sub>Cl/PBS 1 x pH 7.0 50 mM**

Se pesa 0.27 g de NH<sub>4</sub>Cl y se disuelven en 90 ml de PBS 1X y despues se afora a 100 ml con PBS 1x.

### **HCl/ PBS 1x pH 7.0 1 M**

Se toman 96.4 ml de PBS 1 x y se agregan 3.6 ml de HCl concentrado.

### **Glicina 0.5 M/PBS 1x pH 7.0**

Pesar 0.375 g disolver en 90 ml de PBS 1x y aforar a 100 ml con PBS 1X.

#### **Suero fetal bovino 1%/ PBS 1x pH 7.0**

Se agrega 1 ml de suero fetal bovino a 99 ml de PBS 1x pH 7.0.

#### **Suero fetal bovino al 0.2%/ PBS 1x pH 7.0**

Se agregan 200  $\mu$ l de suero fetal bovino a 9800  $\mu$ l de PBS 1x pH 7.0

#### **Amortiguadores para purificación en condiciones nativas (desde *E. coli* células transformadas)**

##### **Amortiguador de lisis (1 litro):**

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM          6.90 g    NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (PM 137.99 g/mol)

NaCl          300 mM          17.54 g    NaCl (PM 58.44 g/mol)

imidazole 10 mM          0.68 g    imidazole (PM 68.08 g/mol)

Ajustar pH a 8.0 usando NaOH.

##### **Amortiguador de lavados (1 litro):**

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM    6.90 g    NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (PM 137.99 g/mol)

NaCl    300 mM    17.54 g    NaCl (PM 58.44 g/mol)

imidazole 20 mM    1.36 g    imidazole (PM 68.08 g/mol)

Ajustar pH a 8.0 usando NaOH.

##### **Amortiguador de Elución (1 litro):**

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM          6.90 g    NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (PM 137.99 g/mol)

NaC 300 mM                  17.54 g    NaCl (PM 58.44 g/mol)

Imidazole 250 mM          17.00 g    imidazole (PM 68.08 g/mol)

Ajustar pH a 8.0 usando NaOH.

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 28 de julio del 2011, en la Ciudad de México D.F. para optar al Grado de Maestro en Ciencias Genómicas, al Q.F.B. José Luis Villalpando Aguilar

Dra. María Elizabeth Alvarez Sánchez

---

Dra. Rossana Arroyo Verástegui

---

Dra. Rosalia Lira Carmona

---

Dra. Itzel Quintas Granados

---

Dr. Jesus Eduardo Fandiño Armas

---

---

Coordinación de Certificación y Registro

**UACM**  
Universidad Autónoma  
de la Ciudad de México

---

*Nada Humano me es ajeno*

*Pedro Ahumada*



REP. DE CUBA No. 99 DESP. 23-A  
CENTRO HISTÓRICO MÉXICO, D.F.

**TESIS URGENTES**

PRESUPUESTOS DE 9:30 A.M. A 7:00 P.M.

SABADOS DE 9:30 A.M. A 3:00 P.M.

TEL. 5512-8469

PART. 2619-0742