

# UACM

Universidad Autónoma  
de la Ciudad de México

*Nada humano me es ajeno*

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

MAESTRÍA EN CIENCIAS GENÓMICAS

“Identificación y caracterización del metaloproteoma de  
*Trichomonas vaginalis*”

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA

**CARLOS ALBERTO GALICIA SILVA**

Directora de tesis

**Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez**

México, D.F. enero 2014.

## 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. 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

**Dra. Mavil López Casamichana**

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 la Dra. María Elizabeth Alvarez Sánchez y bajo la asesoría de la Dra. Rosalia Lira Carmona, Dra. Itzel Quintas Granados y Dra. Mavil López Casamichana.

El proyecto fue financiado con fondos del Instituto de Ciencia y tecnología del Distrito Federal (ICyTDF) con numero de convenio ICyTDF/221/2011 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: 430864

Así también agradezco a la Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga ya que durante el primer semestre de la maestría conté con el apoyo bajo el proyecto del CONACyT-CB-2007-01-79293.

# Agradecimiento

Principalmente agradezco a Dios de quien proviene la bendición y quien me ha ayudado hasta este momento, quien por medio de su palabra y de la gente que ha puesto en mi camino, me ha aconsejado e infundido aliento en los momentos más difíciles. "... no tengan miedo, pues yo soy su Dios y estoy con ustedes. Mi mano victoriosa les dará fuerza y ayuda; mi mano victoriosa siempre les dará su apoyo" (Is. 41.10).

A mi esposa quien ha sido una joya que Dios ha puesto en mi camino, por soportar mis tonterías y todos este tiempo apartado el uno del otro, te amo Itzel. "... ¡Qué difícil es hallar una esposa extraordinaria! ¡Hallarla es como encontrarse una joya muy valiosa!" (Pr. 31.10).

A mis padres que siempre han sido el motor y los pilares que mueven y sostienen mi vida. "...Querido jovencito: Atiende a tu padre cuando te llame la atención, y muestra respeto cuando tu madre te enseñe. Sus enseñanzas te adornarán como una corona en la cabeza, como un collar en el cuello" (Pr. 1.8-9).

A mis profesores quienes se desprendieron incalculablemente de su sabiduría para hacerla llegar a mí. Agradezco enormemente a todos los profesores del posgrado porque cada uno tuvo siempre una palabra ó algún consejo que darme. En especial quiero agradecer a la Dra. Liz y a la Dra. Elisa quienes creyeron en mi y me permitieron formar parte de sus laboratorios y quienes me iniciaron en este camino tan emocionante de la ciencia y la investigación. Agradezco a mis revisores la Dra. Rosalía, la Dra. Mavil, la Dra. Minerva y al Dr. Pepe por sus oportunas correcciones a esta tesis. "...Quien con sabios anda a pensar aprende" (Pr. 13.20).

".... El amigo siempre es amigo, y en los tiempos difíciles es más que un hermano" (Pr. 17.17). Agradezco a cada uno de los que supo darme la mano, su apoyo y mas aún su confianza en mi camino en esta maestría: A Itzel López quien desde un principio me tendiste la mano y a quien podía acudir para cualquier duda; A Olguita quien también me supo orientar durante mi paso por el laboratorio 1; A Helios que siempre fue generoso al transmitir el conocimiento de lo que es aprender a hacer CIENCIA; A Joch que admiro por su perseverancia y carácter que jamás decaen aún en los momentos difíciles, siempre tienes buena cara al mal tiempo hermano. "Nadie me puso alas, pero aprendí a volar. No detuve vuestras balas, pero aprendí a esquivar. Me quisisteis evitar y eliminar, dejándome como un naufrago perdido en la inmensidad del mar" -- Nach

Realmente creo que es injusto esto de los agradecimiento ya que una hoja no es suficiente espacio para agradecer a todos mis demás amigos y compañeros que aun por poco que sea, pude aprender algo de ustedes, sin embargo, créanme cuando digo que les llevo en mi corazón y en mi mente.

¡¡¡¡Gracias por todo a todos!!!!

## *Dedicatoria*

*A Tzel quien has sido mi ayuda idónea, quien me ha alentado a seguir adelante. Que de ti he aprendido a ser fuerte y por sobre todo que ahora me daras el privilegio de saber lo que es ser padre.*

*A mis padres y mi hermano, que si no fuera por su apoyo y palabras de aliento no se hubiera culminado este proyecto de vida, una vez más agradezco a Dios por ponerme en ese núcleo familiar.*

*A mi tía Laura, quien siempre será como una segunda madre para mi. A mi tía Jo y mis primos Caro y Memo quienes en estos cuatro años me han aguantado y apoyado, no tengo como agradecerles, mas que compartiendo este éxito que me han ayudado a lograr en mi vida, también es de ustedes.*

## Indice

Indice	6
Lista de abreviaturas	8
Índice de figuras	12
Índice de tablas	12
Índice de gráficas	12
Resumen	16
1. Introducción	18
1.1 Trichomonas vaginalis (T. vaginalis).	18
1.2. Reproducción y ciclo de vida.	18
1.3. Epidemiología de Trichomonas vaginalis.	21
1.4. Signos y síntomas.	26
1.5. Factores microambientales y su participación en la patogenicidad de T. vaginalis.	30
1.5.1. Hierro.	30
1.5.1.1. El hierro modula proteínas con función dual (adhesión y metabolismo) en el parásito T. vaginalis.	30
1.5.1.2. El hierro confiere resistencia al complemento en el parásito T. vaginalis.	33
1.5.1.3. El hierro regula de manera negativa la expresión de CP's.	33
1.5.1.4. El hierro modula mecanismos de regulación génica en T. vaginalis.	34
1.5.2. Poliaminas.	34
1.5.2.1. El metabolismo de poliaminas está involucrado en la adhesión y citotoxicidad de T. vaginalis.	35
1.5.3. Zinc (Zn <sup>2+</sup> ).	35
1.5.3.1. La división celular de T. vaginalis se ve afectada por concentraciones subletales de Zn <sup>2+</sup> .	36
1.5.3.2. El Zn <sup>2+</sup> modula el proteoma de T. vaginalis.	36
1.5.3.3. El Zn <sup>2+</sup> disminuye la actividad de cisteinproteasas.	37
1.6. Proteasas.	38
1.6.1. Proteasas: Factores que degradan componentes de matriz extracelular en sus huéspedes.	38
1.6.1.1. Matriz Extracelular.	38
1.6.1.2. Interacción Huésped-Parásito.	40
1.7. Proteasas en T. vaginalis.	43
1.8. Metaloproteasas.	48

1.8.1. El motif HExxH y sus variantes.	48
1.8.2. Metaloproteasas Co-catalíticas.	51
1.8.3. Metaloproteasas en el genoma del parásito <i>T. vaginalis</i> .	51
1.8.4. Metaloproteasas descritas experimentalmente en <i>T. vaginalis</i> .	54
1.9. Importancia de seguir con el estudio de las metaloproteasas en <i>T. vaginalis</i> .	55
2. Justificación.	57
2.1. Justificación.	57
2.2. Objetivo general.	57
2.3. Objetivos particulares.	57
3. Metodología.	59
3.1. Análisis in silico del metaloproteoma de <i>T. vaginalis</i> .	59
3.2. Cultivo de <i>T. vaginalis</i> .	59
3.3. Extracción de proteasas para ensayos de actividad en 1D.	59
3.4. Inhibidores.	60
3.5. Ensayos de Actividad en 1D.	60
3.6. Cuantificación de la actividad mediante el programa Image J 1.47v.	60
3.7. Ensayos de Actividad en 2D.	61
3.8. Western blot en 2D (WB-2D)	61
3.9. Análisis mediante PDQuest 2-D Analysis Software™.	62
4. Resultados.	64
4.1. Obtención y análisis in silico del metaloproteoma de <i>T. vaginalis</i> .	64
4.2. Proteómica de la actividad diferencial del metaloproteoma de <i>T. vaginalis</i> en aislados de hombre y mujer en geles de sustrato.	69
4.3. Obtención del inmunometaloproteoma de <i>T. vaginalis</i> .	82
4.4. Posibles metaloproteasas candidatas presentes en los aislados HGMN01 y CNCD147.	87
5. Discusión.	91
6. Bibliografía	96
7. Apéndice.	102
Actividades realizadas durante la maestría 2011-2013	113
Jurado evaluador	114

## Lista de abreviaturas

ATP	Adenosin trifosfato
$\beta$ HPP	proteínasa procesadora hidrogenosomal subunidad $\beta$
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
$\text{Ca}^{2+}$	Calcio
c.b.p	Cuanto baste para
cDNA	Acido desoxirribonucleico complementario
CNCD147	Aislado de <i>Trichomonas vaginalis</i> obtenido de mujer
$\text{CO}_2$	Bioxido de carbono
$\text{Co}^{2+}$	Cobalto
CPs	Cisteín proteinasas
D	Ácido aspartico
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Acido desoxirribonucleico
DNAg	DNA genómico
dNTPs	Deoxinucléotidos tri-fosfatados
DU-145	Línea celular de cancer de prostata
E	Ácido glutámico
E-64	L-trans-epoxisuccinil-leucil-amido (4 guanidino) butano
ECM	Matriz extracelular
EDTA	Ácido etilén diaiminotetra acético
EGTA	Ácido etilen glicol tetra acético

ETS	Enfermedades de transmisión sexual
FN	Fibronectina
g	Gramos
GAG	Glicosaminoglicanos
GTP-BP	Proteína de unión a GTP
H	Histidina
H <sub>2</sub>	Hidrogeno
HCl	Ácido clorhídrico
HGMN01	Aislado de <i>Trichomonas vaginalis</i> obtenido de hombre
h	Horas
Inr	Regulador del inicio de la transcripción
IPTG	Isopropil-β-D- tiogalactopiranosido
ITS	Infecciones de transmisión sexual
IREs	Elemento de respuesta a hierro
IRPs	Proteínas reguladora por hierro
K	Lisina
kDa	Kilodaltones
LC/MS/MS	Liquid chromatography-mass spectrometry-mass spectrometry
LB	Medio Luria –Broth
M	Molar
Mb	Megabases
MEC	Componentes de matriz extracelular

Mg <sup>2+</sup>	Magnesio
Mn <sup>2+</sup>	Manganeso
µg	Microgramos
µl	Microlitros
ml	Mililitros
mM	Milimolar
nm	Nanómetros
MP	Metaloproteasas
MS	Espectrometría de masas
OMS	Organización mundial de la salud
O.D.	Densidad Óptica
O.N.	Toda la noche
ORF	Open Reading Frame (Marco abierto de lectura)
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Bueffer salino de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDI	Proteína Disulfuro Isomerasa
PDM	Peptidasa de procesamiento mitocondrial
PG	Proteoglicanos
pH	Potencial de hidrogeno
pI	Punto isoeléctrico
PM	Peso molecular

PSA	Persulfato de amonio
RNA	Acido ribonucleico
RNAm	Acido ribonucleico mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa retrotranscriptasa
SDS-PAGE	Duodecil sulfato de sodio-gel de poliacrilamida
SC	Suero de caballo
SPI	Suero preinmune
T.A.	Temperatura ambiente
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina
TLCK	Tosil lisil clorometil cetona
TvMP50	T. vaginalis Metaloproteinasa de 50 kDa
TvMP50r	T. vaginalis Metaloproteinasa de 50 kDa recombinante
TYM	Tripticasa-extracto de levadura y Maltosa
UTR	Región no traducida
V	Volts
VECs	Células del epitelio vaginal
X	Cualquier aminoácido
Zn <sup>2+</sup>	Zinc
ZnCl <sub>2</sub>	Cloruro de zinc
2-DE	Electroforesis en doble dimensión

## Índice de figuras

	<b>página</b>
Figura 1.	20
Figura 2.	23
Figura 3.	29
Figura 4.	47
Figura 5.	50
Figura 6.	66
Figura 7.	68
Figura 8.	71
Figura 9.	74
Figura 10.	77
Figura 11.	79
Figura 12.	81
Figura 13.	84
Figura 14.	86

## Índice de tablas

	<b>página</b>
Tabla 1.	32
Tabla 2.	42
Tabla 3.	45
Tabla 4.	53
Tabla 5.	88
Tabla 6.	88

## Índice de gráficas

	<b>página</b>
Gráfica 1.	25

*Resumen*

---

## Resumen

*Trichomonas vaginalis* es un parásito protozoario causante de la tricomonosis. Éste parásito se encuentra bajo la presión de diferentes factores microambientales presentes en el tracto urogenital femenino y masculino. *T. vaginalis* cuenta con un repertorio de 123 genes que codifican para diferentes metaloproteasas (MP). Hasta el momento se han descrito experimentalmente 5 MP. El objetivo de este trabajo fue identificar y caracterizar el metaloproteoma de este parásito en dos aislados; masculino (HGMN01) y femenino (CNCD147). **Metodología:** Se realizó un análisis *in silico* que nos ayudó a obtener las características de las 123 metaloproteasas reportadas en el genoma. Para identificar el número de proteasas activas en *T. vaginalis* se realizaron ensayos de actividad en 1- y 2D mediante geles de sustrato, así también para saber cuáles de estas podían ser inmunoreconocidas con el suero de un paciente con tricomonosis se realizaron ensayos de western blot en 2D (WB-2D). Por último se realizó un ensayo comparativo entre los resultados del análisis *in silico* y los experimentales. **Resultados:** El análisis *in silico* permitió obtener un mapa proteómico con los pesos moleculares y puntos isoelectrónicos de las 123 MP. Los ensayos de actividad en 1D demostraron que sólo una proteasa de 247 kDa era diferencialmente activa entre los dos aislados, y que sólo una proteasa de 53 kDa compartida fue inhibida por EDTA. El ensayo de actividad en 2D mostró que dos spots de actividad fueron compartidos en ambos aislados, mientras que para el aislado HGMN01 tuvo seis spots de actividad propios y el aislado CNCD147 sólo 1. Además con el ensayo de WB-2D mostró que ninguna MP fue inmunoreconocida por el suero. Sin embargo, el análisis comparativo permitió sugerir que las proteasas que se obtuvieron en 2D pertenecían a las familias M49, M8, M16, M20 y M67 agrupadas en los clanes M-, MA, ME, MH y MP respectivamente de acuerdo a sus puntos isoelectrónicos y pesos moleculares, las cuales forman parte de membrana y citoplasma. El análisis de EST's demostró que la expresión de algunas de estas proteasas ya ha sido observada en otras condiciones. **Conclusiones:** Se concluyó que la actividad de metaloproteasas se encuentra modulada de acuerdo al microambiente en el que se encuentre, así como del aislado que se está trabajando.

# *Introducción*

---

## 1. Introducción

### 1.1 *Trichomonas vaginalis* (*T. vaginalis*).

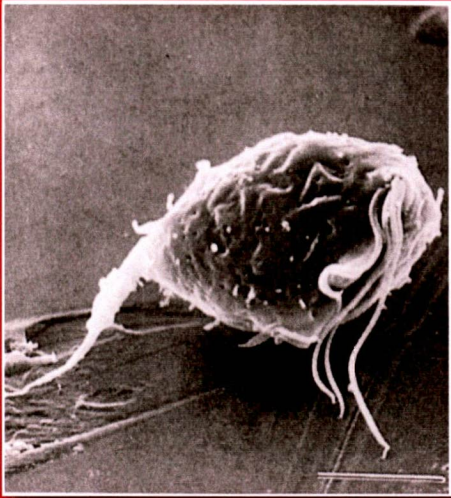
*Trichomonas vaginalis* es el agente causante de la tricomonosis humana, infección que ocupa el lugar número uno dentro de las enfermedades de transmisión sexual (ETS) (OMS, 1995). La clasificación taxonómica de este parásito es la siguiente; reino: *Protista*; filo: *Metamonada*; clase: *Parabasalia*; orden: *Trichomonadida*; género: *Trichomonas*; especie: *Trichomonas vaginalis*. Este parásito tiene una forma de pera en cultivo (**Figura 1A**), sin embargo, en contacto con células del epitelio vaginal (VEC's) adopta una forma ameboide (**Figura 1B**) (Harp y Chowdhury 2011), y en células prostáticas tiene apariencia similar a la de cultivo (**Figura 1C**) (Vazquez-Carrillo y cols. 2011). Éste tiene una longitud 10  $\mu\text{m}$  y un ancho de 7  $\mu\text{m}$  (Petrin y cols. 1998). *Trichomonas* se encuentra de manera extracelular con respecto al epitelio del tracto genitourinario con un estilo de vida anaeróbico, y para que la infección ocurra, éste tiene que superar la barrera mucosa (Lehker y Sweeney 1999), y así colonizar el epitelio vaginal.

El parásito contiene cinco flagelos en total, cuatro se encuentran en la porción anterior, y el quinto flagelo está adosado a la membrana ondulante del parásito. Estos en conjunto dan al parásito una motilidad temblorosa característica. También contiene un axostilo que puede cumplir tres funciones: (1) es una entidad de apoyo; (2) participa en la división celular, proveyendo constricción de el núcleo durante la cariocinesis (Benchimol 2004); y (3) participa en el anclaje de *T. vaginalis* a las células VEC's (Petrin y cols. 1998).

### 1.2. Reproducción y ciclo de vida.

El ciclo de vida de tricomonas sucede en un único hospedero (humano), por lo que la transmisión generalmente ocurre de hombre a mujer. Este parásito se reproduce por fisión binaria (Schwebke y Burgess 2004). En 2008 se reportó evidencia de genes conservados que participan en meiosis, lo que sugiere una posible reproducción sexual de éste patógeno (Malik y cols. 2008).

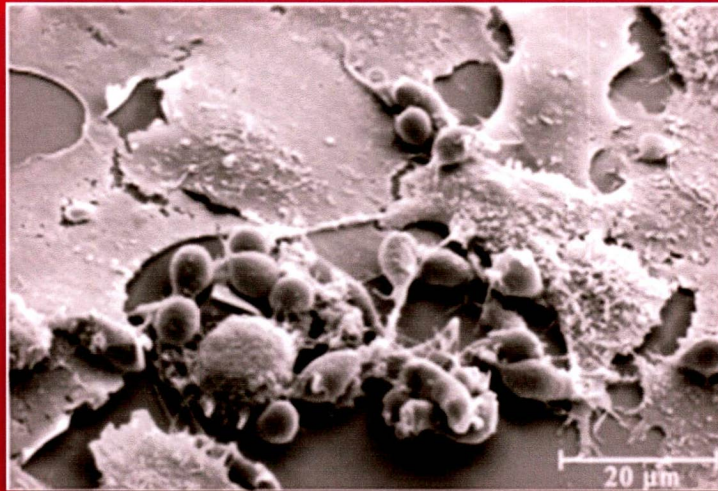
A



B



C



Aunado a lo anterior se reportan trabajos en donde existe la contaminación y transmisión del parásito por fomites (Crucitti y cols. 2011), así como de una transmisión de la madre al feto, la cual trae consecuencias respiratorias al neonato (Carter y Whithaus 2008).

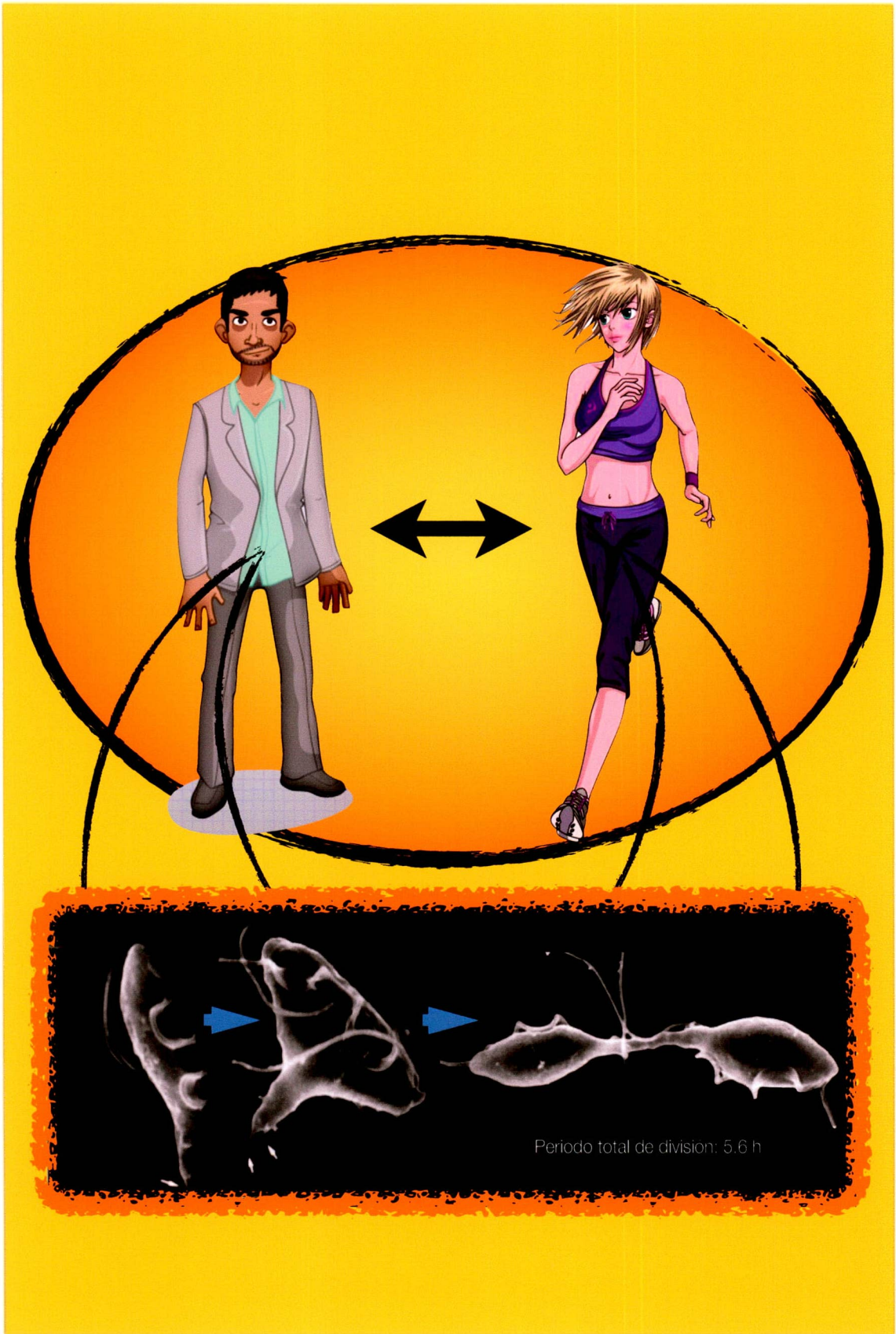
En condiciones de cultivo se ha observado que este parásito se divide en un promedio de 5.6 horas (Gelbart y cols. 1990) (**Figura 2**).

### **1.3. Epidemiología de *Trichomonas vaginalis*.**

De acuerdo con los datos publicados por la OMS, anualmente se reportan cerca de 120-180 millones de nuevos casos en todo el mundo (OMS, 2001). En México hasta la semana 36 del 2013 se reportaron 68,609 casos en todo el país, de los cuales 66,726 son mujeres y 1,883 son hombres. Sin embargo, en la semana 36 del año 2012 se reportaron 76,875 casos, la variación que existe se puede deber a que en nuestro país no existe como tal un programa epidemiológico bien establecido para la captura de todos los pacientes que presenten esta enfermedad. Es importante recordar que los varones son portadores asintomáticos, por lo que, pasan desapercibidos en esta recopilación epidemiológica. Los estados con mayor incidencia son México, Puebla y Veracruz que en conjunto reúnen un total de 23,204 casos representando cerca del 30% del total (SUIVE, 2013) (**Gráfica 1**).

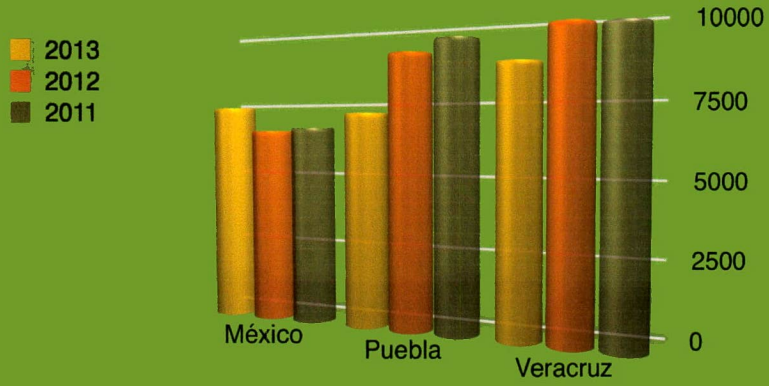
Otros países como los Estados Unidos de Norteamérica tienen un correcto programa epidemiológico para enfermedades de transmisión sexual, realizado por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades en inglés Center for Disease Control and Prevention (CDC), en febrero del 2013, éste centro publicó un boletín, en el cual estiman que cada año aparecen cerca de 20 millones de nuevos casos de ETS, en donde la tricomonosis ocupa un 13% infectando mayormente a mujeres y hombres de más de 25 años.

Se sabe que este tipo de enfermedades tiene repercusiones en el ámbito económico con un estimado de \$16 mil millones de dolares en costos médicos directos (CDC, 2013).



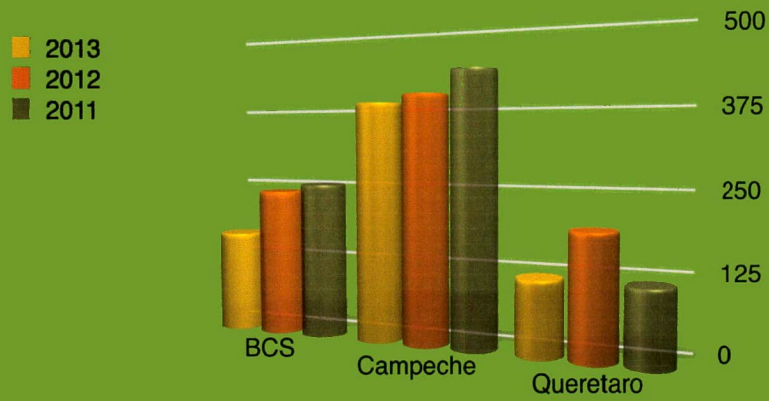
A

Número de casos reportados en México, Puebla y Veracruz del 2011 al 2013.



B

Número de casos reportados en Baja California Sur, Campeche y Querétaro del 2011 al 2013.



En México no existe como tal un reporte completo como éste, por lo que se sugiere el pronto desarrollo de un programa epidemiológico correcto para la enfermedad.

#### **1.4. Signos y síntomas.**

La infección por tricomonas se da a nivel del epitelio escamoso en el tracto genital. El periodo de incubación es de 4 a 28 días en el 50% de individuos infectados. De acuerdo con la severidad de la infección, la tricomonosis puede ser clasificada en aguda, crónica o asintomática (Petrin y cols. 1998).

Los signos y síntomas de la tricomonosis en la mujer son: flujo vaginal, irritación, prurito. Donde los signos de la infección incluyen secreción vaginal (42%), mal olor (50%) y edema o eritema (22 a 37%). La descarga vaginal es clásicamente descrita como espumosa (**Figura 3A**), pero la realidad es que solo 10% de los pacientes presentan esta característica. El color de la secreción puede variar, por lo general, es amarillo-verdosa.

El signo típico de la tricomonosis es el cervix de fresa (colpitis macularis) que lo presenta el 2% de las pacientes (**Figura 3B**), sin embargo, esta es detectada solamente con especificidad por colposcopia y en raros casos durante un examen de rutina o papanicolau.

Otras características que se incluyen son elevado pH, disuria y dolor en el abdomen. La uretra suele también ser infectada en la mayoría de las mujeres.

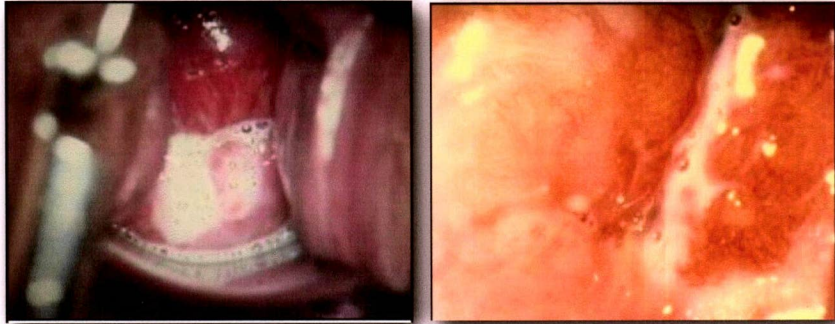
La gravedad de los síntomas puede estar determinada por la misma respuesta inmune del huésped. Los factores que influyen en la respuesta inflamatoria del huésped no se entienden bien aún, pero pueden incluir los niveles hormonales, la flora vaginal coexistente, la cepa del microorganismo y relativa concentración de los organismos presente en la vagina.

El varón participa como portador asintomático en la infección. Sin embargo, cuando hay síntomas de por medio, como por ejemplo la uretritis, las descargas suelen ser menos profusa y purulenta que la observada en una infección gonococcal, así

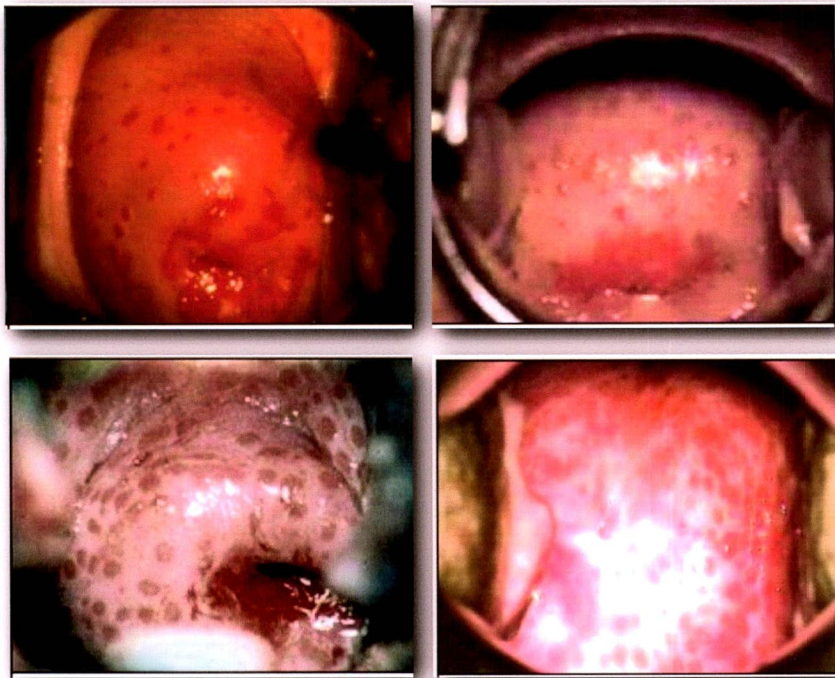
también puede haber presencia de disuria. Se ha observado que *T. vaginalis* es la causa del 11% de todos los casos de uretritis no gonococcal en hombres (Krieger 1995). Además se demostró la presencia de éste parásito dentro de la glándula prostática (Gardner y cols. 1986).

Este parásito tiene una manera de infectar diferencialmente a sus huéspedes. De tal manera que podemos pensar que algo en el microambiente del aparato genitourinario de ambos huéspedes está modulando dicha infección. Por lo que más adelante se describirán algunos de los factores microambientales que han sido estudiados experimentalmente.

A



B



## **1.5. Factores microambientales y su participación en la patogenicidad de *T. vaginalis*.**

### **1.5.1. Hierro.**

#### **1.5.1.1. El hierro modula proteínas con función dual (adhesión y metabolismo) en el parásito *T. vaginalis*.**

El hierro es un micronutriente esencial para una variedad de procesos biológicos, incluyendo el transporte de oxígeno, síntesis de DNA y transporte de electrones (Sehgal y cols. 2012). En *T. vaginalis* se ha encontrado que éste catión es capaz de modificar la expresión de proteínas relacionadas con el hidrogenosoma (Beltran y cols. 2013).

Este organelo participa en el metabolismo de carbohidratos, donde después de ciertas reacciones enzimáticas que sufre la glucosa, se obtienen como productos finales; glicerol, lactato y etanol (en el citosol), así como, ATP, H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, y acetato (producidos en el hidrogenosoma) (Muller y cols. 2012). Diversos farmacos han sido desarrollados contra la tricomonosis utilizando a este organelo como blanco terapéutico, tal es el caso del metronidazol, este entra por difusión pasiva y es activado en el hidrogenosoma, aquí el grupo nitro del metronidazol es reducido anaerobicamente por la piruvato-ferredoxin oxidoreductasa (PFO), liberando así radicales nitro tóxicos que rompen la doble cadena de DNA. (Petrin y cols. 1998). La enzima PFO tiene una actividad dual, además de participar en el metabolismo también se localiza en la membrana y ha sido identificada como una adhesina (AP120). Además en el hidrogenosoma también se localizan otras cuatro proteínas: AP65, AP51, AP33 y AP23 (enzima málica, las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la succinil-CoA sintetasa respectivamente). Aunque no existe evidencia experimental, se sugiere que la AP23 se trata de otra enzima metabólica, como la triosafosfato isomerasa (Figuroa-Angulo y cols. 2012). Todas estas enzimas han mostrado ser reguladas por Fe<sup>2+</sup>, presente en el microambiente femenino (**Tabla 1**).

Proteína	Factor de virulencia	Propiedad de virulencia	Regulación			
			Hierro	Contacto	PA	Zinc
AP23	Adhesina	Citoadherencia	+	ND	ND	+
AP33	Adhesina Subunidad- $\alpha$ de la succinil CoA sintasa	Citoadherencia	+	+	ND	+
AP51	Adhesina Subunidad- $\beta$ de la succinil CoA sintasa	Citoadherencia	+	+	ND	+
AP65-1	Adhesina Enzima Malica	Citoadherencia	+	+	ND	+
AP120	Adhesina Piruvato:ferredoxin oxidoreductasa	Citoadherencia	+	ND	ND	ND
BspA-like	Adhesina	Citoadherencia Evasión de respuesta inmune	+/-	+	ND	ND
Calpain-like CP	Proteasa	ND	ND	ND	ND	ND
CDF (Cell-detaching factor)	Glicoproteína 200 kDa	Actividad citolítica	ND	+	ND	ND
CP (30 kDa)	Proteasa	Disrupción del citoesqueleto	ND	+	ND	ND
Gp63-like	Metaloproteasa	Degradación de proteínas	ND	+	ND	ND
Lectinas	Endocitosis VIH	Endocitosis	ND	ND	ND	ND
M17-like	Adhesina	Adherencia	ND	ND	ND	ND
P230	Molécula de membrana	Variación fenotípica	ND	ND	ND	ND
P270	Molécula de membrana	Variación fenotípica	-	ND	ND	ND
Fosfolipasa A2	Lipasa	Citotoxicidad	ND	ND	ND	ND
Pmp	Adhesina	Citoadherencia Evasión de respuesta inmune	ND	ND	ND	ND
Proteínas formadoras de poro (PFPs)	Proteína transmembrana	Actividad citolítica	ND	ND	ND	ND
SAPLIP (Trichoporos)	Proteína Saposin-like	Actividad citolítica	ND	ND	ND	ND
Serin proteasa	Proteasa	ND	ND	ND	ND	ND
TvCP4	CP superficie	Hemolisis	+	ND	ND	ND
TvCP12	CP superficie	Citotoxicidad	-	ND	ND	ND
TvCP30	CP superficie	Citoadherencia	-	ND	ND	ND
TvCP39	CP superficie	Citotoxicidad Degradación de Ig's	-	ND	+	-
TvCP62	CP superficie	Citoadherencia	ND	ND	ND	ND
TvCP65	CP superficie	Citotoxicidad	-	ND	+	-
CP2, CP3, CP4 y CPT	CPs secretadas	Apoptosis	-	ND	ND	ND
TvENO-1	Enolasa receptor de plasminogeno	Citoadherencia	ND	+	ND	ND
TvF	Efector citolítico de 250 kDa	Actividad citolítica	ND	+	ND	ND
TvGADPH	Proteína de unión a Fn Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Citoadherencia	+	ND	ND	ND
TvLEGU-1	CP superficie	Citoadherencia	+	ND	ND	ND
TvLIP	Triacilglicerol lipasa	Hemolisis	+	+	ND	ND
TvLPG	Lifosfoglicanos	Citoadherencia Citotoxicidad	ND	+	ND	ND
VSP-like	Adhesina	Citoadherencia	ND	ND	ND	ND

La expresión de éstas se ha demostrado experimentalmente en altas concentraciones de hierro (250  $\mu\text{M}$ ), las cuales son necesarias para su óptimo metabolismo y multiplicación en cultivo. (Lehker y cols. 1991, Figueroa-Angulo y cols. 2012). Existen otras proteínas que se muestran en la **tabla 1**, las cuales también participan en la adhesión del parásito y que son positivamente reguladas en presencia de hierro.

#### **1.5.1.2. El hierro confiere resistencia al complemento en el parásito *T. vaginalis*.**

Ha sido observado que *T. vaginalis* es rápidamente lisado por la activación alternativa del sistema del complemento, sin embargo los parásitos han logrado evadir esta vía de defensa empleada por el huésped. La resistencia al complemento ha mostrado ser dependiente de la concentración de hierro presente en el microambiente. El pretratamiento de parásitos con altas concentraciones de hierro los cuales han sido resistentes a la lisis por el factor C3 del complemento, y a los cuales posteriormente se les adicionó inhibidores para cistein proteasas (CP's), rápidamente mostraron ser degradados por dicha activación. En este proceso ha sido sugerido que el hierro está involucrado modulando positivamente a las proteasas que juegan un papel importante en la resistencia al complemento (Alderete y cols. 1995).

#### **1.5.1.3. El hierro regula de manera negativa la expresión de CP's.**

*Trichomonas vaginalis* al encontrarse en un ambiente rico en hierro es capaz de sobreexpresar adhesinas, las cuales están involucradas en la adhesión del parásito hacia sus células blanco, así también el hierro le confiere resistencia al complemento mediante la sobreexpresión de CP's. Álvarez Sánchez y colaboradores demostraron que el hierro es capaz de reducir la actividad proteolítica, expresión y transcripción de CP65, afectando negativamente la citotoxicidad *in vitro* (Alvarez-Sanchez y cols. 2007). Del mismo modo ocurre con otros genes y CP's que participan en citotoxicidad, como lo es CP39 (Hernandez-Gutierrez y cols. 2003), los cuales se ha demostrado que se hallan subexpresados por este micronutriente (**Tabla 1**).

Es así que el hierro juega un papel importante en la interacción huésped-parásito, promoviendo la citoadherencia y resistencia al complemento, pero reduciendo la citotoxicidad frente a las células del huésped.

#### **1.5.1.4. El hierro modula mecanismos de regulación génica en *T. vaginalis*.**

La regulación transcripcional bajo condiciones donde en el medio existe hierro es mediada por un elemento promotor encontrado en el extremo 5' de la región no traducida (UTR) del gen *ap65*, el cual es regulado positivamente por hierro (Tsai y cols. 2002), así como dominios de unión a proteínas MYB (Ong y cols. 2006). La regulación posttranscripcional es mediada por un sistema IRE/IRP-like. Este involucra elementos de respuesta de tallo-burbuja (stem-loop iron regulatory elements: IRE) encontrados en los extremos 5' o 3'-UTR del RNAm blanco, y las proteínas reguladoras de hierro (IRP-1/IRP-2-like proteins) que específicamente se unen a las estructuras de tallo-burbuja en bajas concentraciones de hierro (Torres-Romero y Arroyo 2009). Dependiendo de la localización del IRE, estas interacciones pueden bloquear la síntesis de proteínas o estabilizar el RNAm. Ejemplos de este mecanismo de control son observados en la regulación positiva del RNAm de *tvcp4*, el cual tiene un elemento IRE en su 5'-UTR; y el RNAm de *tvcp12* el cual es regulado negativamente y muestra una estructura IRE en su 3'-UTR.

#### **1.5.2. Poliaminas.**

Las poliaminas alifáticas o como comúnmente se les conoce "poliaminas" (PA) son una familia de moléculas policatiónicas derivadas de la descarboxilación del aminoácido ornitina que comprende tres moléculas: putrescina, espermidina y espermina. Estas se encuentran involucradas en varios procesos celulares, como por ejemplo: estabilización de DNA, expresión génica y proliferación celular. (Ramani y cols. 2013).

En secreciones vaginales de mujeres sanas, los niveles de putrescina y diaminas son indetectables. Sin embargo, durante la tricomonosis los fluidos vaginales muestran altas concentraciones de putrescina (>2 mM), sugiriendo que tricomonas produce

putrescina durante la infección la cual es sintetizada a partir de espermidina que se encuentra en el huésped. (Yarlett y cols. 2000).

*Trichomonas vaginalis* carece de la capacidad de sintetizar poliaminas *de novo*, por lo que este adquiere espermidina de los eritrocitos y VEC's. La biosíntesis de poliaminas en este parásito comienza con la síntesis de ornitina por la arginina hidrolasa y la putrescina se sintetiza por la ornitina descarboxilasa (ODC). De tal modo que estas aminas policationicas se encuentran participando en la regulación de las propiedades de virulencia del parásito.

#### **1.5.2.1. El metabolismo de poliaminas está involucrado en la adhesión y citotoxicidad de *T. vaginalis*.**

La citoadherencia es un proceso crítico para la sobrevivencia de *T. vaginalis* debido a que tiene que entrar en contacto con las células del epitelio vaginal para poder establecerse y posteriormente mantener la infección.

La inhibición de la síntesis de poliaminas, mostró que *T. vaginalis* incrementaba su adhesión hacia las VEC's, pero en cambio reducía su capacidad de citotoxicidad. Estos experimentos pueden explicar lo que sucede *in vivo* al inhibir la síntesis de putrescina, se produce la disminución en la expresión de las cisteinproteasas CP65 y CP39 las cuales le confiere propiedad de citotoxicidad al parásito (Alvarez-Sanchez y cols. 2008).

Es así que este tipo de moléculas presentes en el microambiente femenino son indispensables para la viabilidad del parásito y su biología.

#### **1.5.3. Zinc (Zn<sup>2+</sup>).**

El Zn<sup>2+</sup> es el segundo micronutriente más abundante en el cuerpo humano después del hierro. Éste ayuda a catabolizar reacciones que tienen que ver con el plegamiento de proteínas, así como a regular la expresión genética. Principalmente es utilizado como un cofactor para muchas proteínas, entre ellas las proteasas. (Saper y Rash 2009).

La deficiencia de este micronutriente trae como consecuencias: hipogonadismo, mal funcionamiento del sistema cognitivo e inmune (Prasad 2009). El  $Zn^{2+}$  se encuentra en el microambiente masculino en concentraciones que van de los 4.5 a los 7 mM, lo que le permite participar como una de las primeras barreras de defensa contra patógenos (Krieger y Rein 1982). Este tiene un amplio espectro antimicrobiano que incluye bacterias, hongos y virus (Krieger y Rein 1982). Sin embargo, se ha encontrado que la baja concentración de  $Zn^{2+}$  (~0.8 mM) que existe en pacientes con prostatitis bacteriana crónica no es tricomonocida (Fair y cols. 1976). Un estudio en el que utilizaron diferentes concentraciones de  $Zn^{2+}$ , llevó a revelar la mínima concentración tricomonocida, la cual fue de 3.2 mM de  $Zn^{2+}$ , por lo que los parásitos podían crecer sin problema en 1.6 mM de  $Zn^{2+}$ . (Krieger y Rein 1982).

#### **1.5.3.1. La división celular de *T. vaginalis* se ve afectada por concentraciones subletales de $Zn^{2+}$ .**

Vazquez Carrillo y colaboradores utilizando la concentración mínima tricomonocida de  $Zn^{2+}$  (1.6 mM), evaluaron el desarrollo del parásito mediante curvas de crecimiento, encontrando que aquellos parásitos crecidos en presencia de este catión en dicha concentración sólo se dividían una vez en 24 h. En cambio aquellos crecidos libres de  $Zn^{2+}$ , su división era de cuatro veces en 24h (Vazquez-Carrillo y cols. 2011).

#### **1.5.3.2. El $Zn^{2+}$ modula el proteoma de *T. vaginalis*.**

En 2009 Huang K., y colaboradores analizaron el proteoma de *T. vaginalis* por proteómica en doble dimensión (2D), donde obtuvieron 247 spots en el estadio de trofozoito. Por otro lado, Vazquez-Carrillo y colaboradores en 2011, actualizaron los perfiles proteómicos en 2D, en presencia y ausencia de 1.6 mM de  $Zn^{2+}$ . Observando que en ausencia del catión el proteoma obtenido incluía 170 spots en comparación de los 150 spots obtenidos en presencia de  $Zn^{2+}$ . Estos spots iban en un rango de pH de 4 a 7 y de peso molecular de 20 a 250 kDa. Sin embargo, también hubo algunos spots que se sobreexpresaban en la condición estudiada. Entre ellos se encontró una metaloproteasa (MP) del tipo aminopeptidasa P-like, con

un peso molecular de 50 kDa y con número de acceso en la base de datos MASCOT (gi|123445672).

Por lo que sugirió que el  $Zn^{2+}$  puede modular la expresión de genes de manera positiva y/o negativa en este parásito.

### **1.5.3.3. El $Zn^{2+}$ disminuye la actividad de cisteinproteasas.**

La actividad de cisteinproteasas, se ha analizado mediante ensayos de ligando proteasas con una línea celular de próstata (DU-145) en geles de actividad (zimogramas). Cinco CP's (TvCP70, TvCP65, TvCP39, TvCP25 y TvCP20) interaccionaron con las células DU-145, sin embargo, la actividad proteolítica de éstas disminuyó en presencia de 1.6 mM de  $Zn^{2+}$  (Vazquez-Carrillo y cols. 2011).

TvCP65 y TvCP39 son dos cisteinproteasas involucradas en la citotoxicidad, y dado que su expresión se ve disminuida bajo la condición de  $Zn^{2+}$ , esto podría apoyar la hipótesis de la asintomatología en los varones al momento de ser infectados con *T. vaginalis*.

## **1.6. Proteasas.**

Como se describió en la sección anterior, uno de los factores de virulencia importantes en *T. vaginalis* son las proteasas. Se define "proteasa" como aquella enzima capaz de degradar proteínas por la escisión hidrolítica de enlaces peptídicos. De acuerdo al mecanismo catalítico, pueden pertenecer a una de las cinco clases que existen (aspartico, cisteín, metalo, serin o treonin). Además estas podrán realizar cortes proteolíticos de manera endopeptidasa o exopeptidasa (amino- ó carboxipeptidasa) en la secuencia aminoacídica de las proteínas. Las proteasas son importantes actores para lograr el perfecto control celular de procesos biológicos en todos los organismos vivos, a través de la hidrólisis altamente específica de enlaces peptídicos de algún tipo de sustrato.

Las proteasas, a través de su acción irreversible, regulan el destino y la actividad apropiada de muchas proteínas mediante el control de su localización intra- ó extracelular; como el transporte de proteínas hacia la superficie celular, la activación o inactivación de proteasas y otras enzimas.

Es por ello que las proteasas inician, modulan y culminan un amplio repertorio de funciones celulares importantes, tales como la replicación del DNA, la progresión del ciclo celular, la proliferación celular, la evasión de la respuesta inmune y la apoptosis. (Lopez-Otin y Overall 2002).

### **1.6.1. Proteasas: Factores que degradan componentes de matriz extracelular en sus huéspedes.**

#### **1.6.1.1. Matriz Extracelular.**

La matriz extracelular (MEC) es una estructura compleja que rodea a las células en todos los tejidos del cuerpo. Su composición bioquímica exacta varía un poco de tejido a tejido. Esta proporciona propiedades de andamiaje a las células. Entre las funciones principales que lleva a cabo son: llenar el espacio que existe entre célula y célula, proporciona una barrera que aísla a los tejidos entre sí, proporciona las

señales que guían a las células migratorias, y también señales que alteran el comportamiento de la célula. (Badylak 2002).

Los componentes de MEC son dos principales clases de macromoléculas: proteoglicanos (PG) y proteínas fibrosas. Los PG son compuestos de glicosaminoglicanos (GAG) ligados covalentemente a un core específico de proteínas. Estas cadenas de polisacáridos lineales incluyen al ácido hialurónico, sulfato de dermatán, sulfato de condroitina, heparina, heparán sulfato y sulfato de queratano.

Los GAG pueden interactuar con las proteínas (tales como la fibronectina proteína de adhesión) de la MEC, y a través de esta interacción permitir el anclaje a lugares específicos, afectando así su actividad biológica. Los PG también pueden servir como co-receptores para factores de crecimiento, participar en la señalización celular, y ayudar a regular la actividad de muchas otras moléculas. Esta dinámica le permite a los GAG y PG jugar un papel clave en la adhesión celular y la migración. (Davies J., 2001).

Las principales proteínas fibrosas de MEC son colágeno, elastina, fibronectina y laminina. Siendo el colágeno la proteína fibrosa más abundante dentro de MEC, ocupando cerca del 30% de la masa total de proteína en un animal multicelular. Esta proteína constituye el principal elemento estructural de los tejidos conectivos y también proporciona resistencia, regula la adhesión celular, apoya la quimiotaxis y la migración, y dirige el desarrollo del tejido. Asociado al colágeno se encuentra la elastina, otra de las principales fibras de MEC. La elastina proporciona tensión a los tejidos que se someten a estiramiento repetido. Una tercera proteína fibrosa, fibronectina (FN), está íntimamente involucrado en la dirección de la organización de la MEC intersticial y también juega un papel crucial en la adhesión y función de las células. Además, la FN es importante para la migración celular durante el desarrollo y se ha implicado en la enfermedad cardiovascular y la metástasis del tumor. Por su parte la laminina contiene varios sitios para la unión a receptores en la superficie celular, y para otros componentes de la MEC, tales como colágenos y proteoglicanos.

### 1.6.1.2. Interacción Huésped-Parásito.

Los microorganismos interactúan con sus huéspedes en una gran variedad de formas. Es decir la mayoría de los mamíferos estamos ante un constante peligro por infecciones provocadas por patógenos, tales como virus, hongos, bacterias ó parásitos. La respuesta de los huéspedes hacia estas infecciones esta dada por un sistema inmunológico excelente en reconocer estos agentes extraños (Olano J., 2008) y discriminarlos de aquellos que están dentro de nosotros formando una simbiosis mutualista.

Sin embargo, como defensa muchos parásitos han evolucionado en la forma de contrarrestar la acción del sistema inmunológico del huésped para poder sobrevivir. De tal manera que estos microorganismos emplean un gran repertorio de moléculas de secreción ó ancladas a membrana para poder atacar a las células de los mamíferos. Muchas de estas moléculas son especializadas en poder procesar vías de señalización tanto del huésped como del patógeno mismo (Urban 2013). Entre las principales moléculas que llevan a cabo estos procesos y las cuales son mayormente estudiadas son las “**PROTEASAS**”. Dado que los parásitos invaden, migran y residen en una variedad de tejidos y órganos, las proteasas son empleadas en establecer, mantener y exacerbar la infección en sus huéspedes. Sin embargo el tejido conectivo y membrana basal del huésped representan las principales barreras hacia los parásitos para evitar su invasión, diseminación y acceso a nutrientes esenciales. (Dowse y cols. 2008).

Hasta la fecha se han realizado estudios en la mayoría de parásitos que causan enfermedades en los humanos, en los cuales se han caracterizado proteasas que participan durante la infección. En la **tabla 2** se muestra un listado de estos parásitos así como las proteasas que han sido identificadas, su localización celular y aquellos componentes de matriz extracelular que pueden degradar. De tal modo podemos observar que las proteasas tienen la capacidad de degradar una amplia variedad de sustratos, por lo que hace que la invasión hacia sus huéspedes sea mas fácil si pensamos que estos presentan alguna deficiencia en su mecanismos de defensa (Netea y cols. 2004).

Parasito	Proteasa	Punticada	Gen	Tipo	Substratos MEC			Localización	
					Colágeno	Fibronectina	Lamina Elastina		
<i>Entamoeba histolytica</i>	72 kDa protease	No	ND	ND	I	ND	ND	ND	Extracto EDG
	Major neutral protease (56 kDa)	SI	ND	CP	I	SI	SI	SI	ND
	EhCP112	SI	ND	CP	I	SI	ND	ND	Secretada
	117, 97, y 68 kDa	No	ND	ND	I	ND	ND	ND	EDG
	EhCP5	SI	SI	CP	I	ND	ND	ND	Secretada
	66, 45, 30, y 18 kDa	No	ND	CP	I	ND	ND	ND	Extracto
	145, 96, y 82 kDa	No	ND	CP	I	ND	ND	ND	Secretada
	70-130 kDa	No	ND	SP	ND	ND	ND	SI	Secretada
	12 kDa	SI	SI	SP	I	SI	SI	ND	Secretada
	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	130 kDa	No	ND	SP	I, III	No	No	SI
<i>Acanthamoeba healyi</i>	33 kDa	SI	ND	SP	I, IV	SI	SI	ND	Secretada
<i>Acanthamoeba lugdunensis</i>	33 kDa	SI	ND	SP	IV	SI	SI	ND	Secretada
<i>Naegleria fowleri</i>	30 kDa	SI	ND	CP	I	ND	ND	SI	Secretada
<i>Trichomonas vaginalis</i>	CP30	No	ND	CP	IV	SI	No	ND	Secretada
	CP39	No	ND	CP	I, III, IV, V	SI	ND	ND	Secretada
	CP65	No	ND	CP	IV	SI	No	ND	Secretada
	40 kDa neutral metalloprotease	SI	ND	MMP	SI	SI	SI	SI	Secretada
<i>Trypanozoma brucei</i>	GP63 zinc metalloprotease	SI	SI	MMP	I	ND	ND	ND	Superficie
	Brucpain	SI	SI	CP	I	ND	ND	SI	Lisosoma
	Cathepsin B (tbCatB)	SI	SI	CP	I	ND	ND	ND	Lisosoma
	POP Tb	SI	SI	SP	SI	SI	ND	ND	Liberada en torrente sanguíneo
	GP63 zinc metalloprotease	SI	SI	MMP	I	ND	ND	ND	Superficie

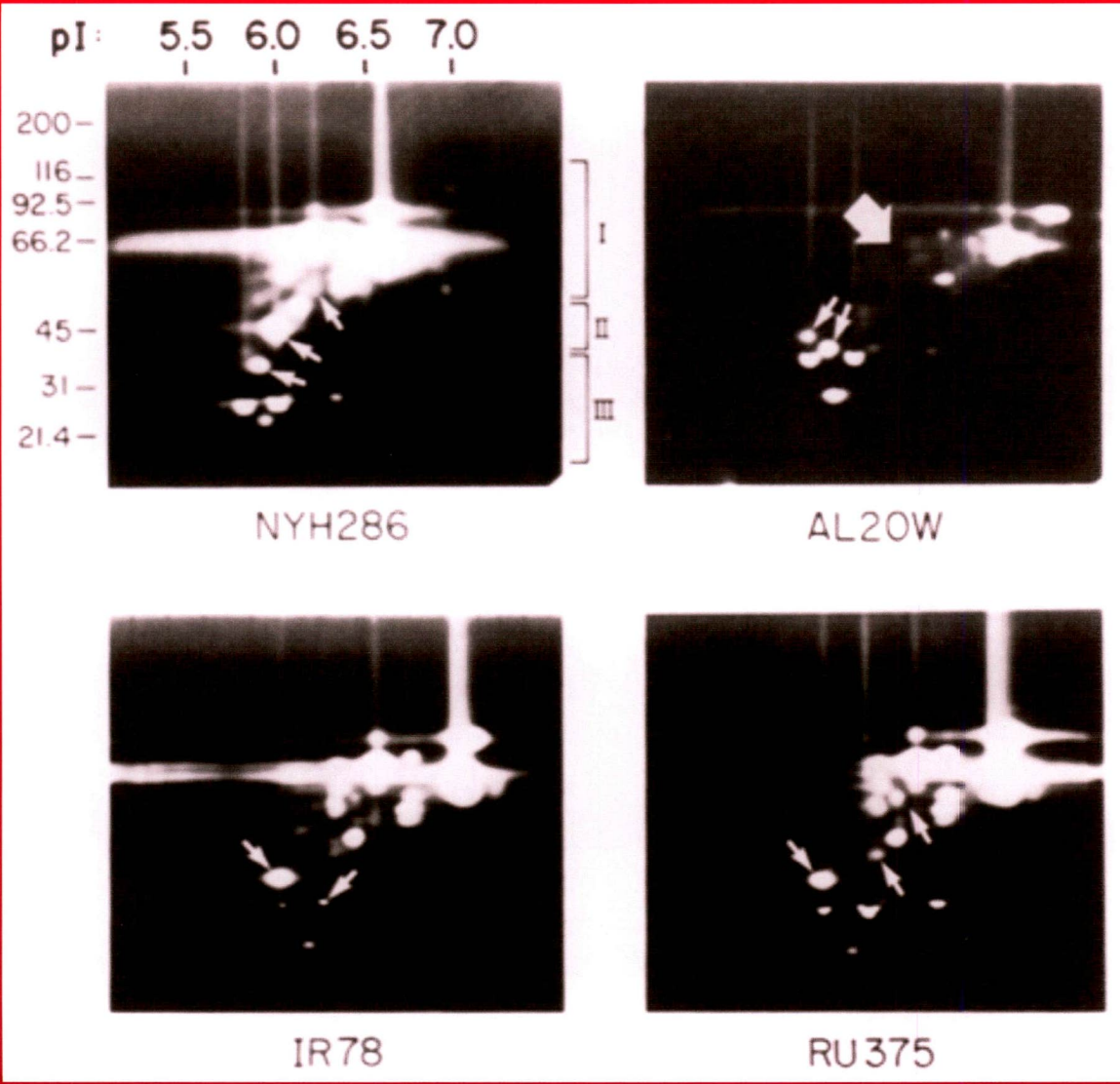
### 1.7. Proteasas en *T. vaginalis*.

En el año 2007 un grupo de investigadores logró reportar el genoma completo de *T. vaginalis* (Carlton y cols. 2007), demostrando que este contenía un tamaño de 160 Mb, siendo un genoma muy grande para un parásito. El número de genes codificantes para proteína es de ~60,000. De manera interesante el degradoma de este organismo está compuesto por 446 genes que codifican para distintos tipos catalíticos de proteasas (Aspartico, Serin, Cistein, Treonin y Metaloproteasas) las cuales se muestran en la **tabla 3**.

Hasta la fecha aquellas proteasas que han sido mayormente estudiadas experimentalmente en este parásito son del tipo cistein. Estas han sido implicadas en procesos biológicos tales como: citotoxicidad y citoadherencia, como se vio en las secciones anteriores. (Ramon-Luing Lde y cols. 2011, Rendon-Gandarilla y cols. 2013). Sin embargo algunas han mostrado ser inmunogénicas lo que sugiere que estas pudieran ser candidatas a posibles biomarcadores (Ramon-Luing y cols. 2010). Además, también se ha encontrado una serinproteasa del tipo de las subtilisinas (Hernandez-Romano y cols. 2010).

De manera interesante podríamos pensar que distintos organismos de una especie, tienen el mismo número y patrón de actividad de algunas proteasas, sin embargo esto no ocurre así, dado que aislados diferentes de la misma especie tienen un patrón de actividad distinto (Neale y Alderete 1990), por lo que el estudio de proteasas se vuelve un poco complicado. (**Figura 4**).

No obstante, las metaloproteasas que ocupan el segundo lugar con mayor número de proteasas en el genoma de *T. vaginalis* han sido poco estudiadas hasta la fecha. Por lo que estas proteasas serán el motivo central de este trabajo, y más adelante se tocarán temas relacionados con su expresión y participación tanto en *T. vaginalis* como en otros organismos.



## **1.8. Metaloproteasas.**

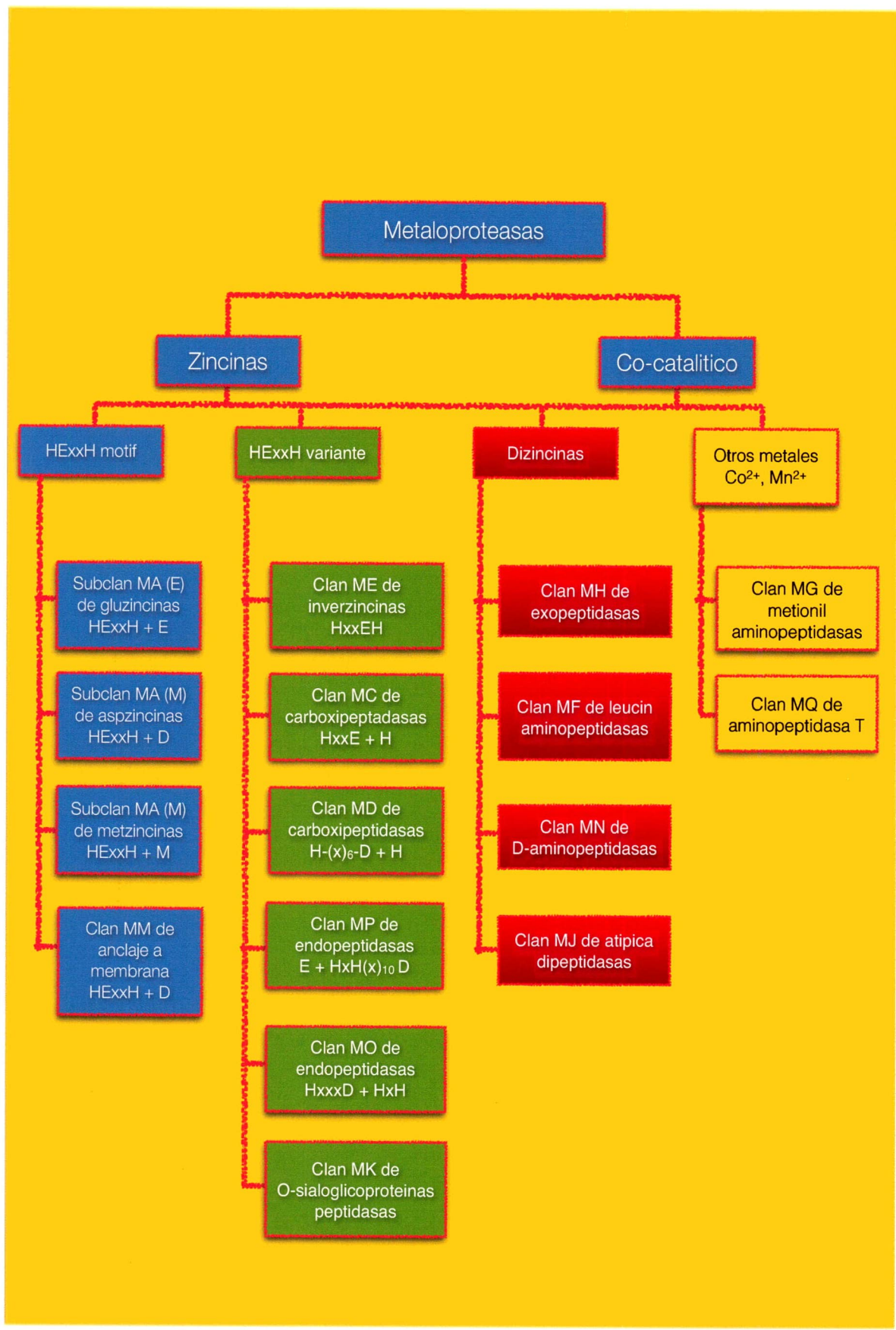
Las metaloproteasas son un diverso grupo de proteasas, las cuales para llevar a cabo su actividad necesitan de un ion metálico ( $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  y otros) y una molécula de agua para hidrólizar los enlaces peptídicos de las proteínas blanco. Estas pueden ser clasificadas de acuerdo a su mecanismo catalítico, substratos y productos o su homología estructural (**Figura 5**). Otra manera de clasificar a las metaloproteasas puede ser respecto a la posición en donde corta su sustrato (endopeptidasa y exopeptidasa, la cual, a su vez, se divide en aminopeptidasa y carboxipeptidasa). Aquellos aminoácidos que coordinan al ion metálico pueden ser: His (H), Glu (E), Asp (D), o Lis (K), y al menos otro aminoácido es requerido para llevar a cabo la catálisis el cual juega un rol electrofílico. Las posiciones de estos cuatro residuos claves suelen estar conservadas entre los miembros de un clan y se pueden deducir a partir de un alineamiento de secuencias o más exacto, a través del estudio de estructuras 3D.

Entre las funciones que realizan estas enzimas, solo por mencionar algunas, son la de regular el ciclo celular (Peer 2011), adhesión celular y degradación de MEC (Pina-Vazquez y cols. 2012).

Estas enzimas pueden ser estudiadas por medio del uso de agentes quelantes, los cuales participarán secuestrando el ion catalítico del sitio de unión a la enzima. Dichos agentes pueden ser el 1,10-fenantrolina, EGTA ó EDTA (Nagase 2001).

### **1.8.1. El motif HExxH y sus variantes.**

El motif de unión a zinc más conservado en metaloproteasas es la secuencia HExxH. En este motif las histidinas participan coordinando al ión y el ácido glutámico actúa como el aminoácido catalítico. En general esta estructura caracteriza al clan MA el cual tiene dos subclanes y cuarenta familias. También este motif se encuentra en el clan MM de metaloproteasas ancladas a membrana, las cuales participan en un sistema de transducción de señales denominado "regulación de proteólisis intramembrana".



denominó inverzincinas. Dentro de este clan existe una familia que se encarga de procesar proteínas de mitocondria, y que de manera interesante se ha encontrado en organismos procariontes (Ugalde y cols. 2010).

### **1.8.2. Metaloproteasas Co-catalíticas.**

Los dos grupos de metaloproteasas mencionados anteriormente se caracterizan por unir un único ion zinc en su centro activo, sin embargo existe otra clase de metaloproteasas denominadas dizincinas capaces de coordinar dos iones zinc. Encontrando agrupados a los clanes MF, MH y MN, los cuales tienen la característica de ser exopeptidasas (Nagase 2001).

Existe también otro grupo de metaloproteasas co-catalíticas, las cuales pueden unir iones diferentes al zinc, tales como,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ , o  $Fe^{2+}$  para su actividad, integrado por los clanes MQ y MG. (Ugalde y cols. 2010).

### **1.8.3. Metaloproteasas en el genoma del parásito *T. vaginalis*.**

De acuerdo con el reporte del genoma de este parásito (Carlton y cols. 2007), se sugiere que contiene 124 genes que codifican para metaloproteasas, y estas integran catorce familias que se encuentran agrupadas en ocho clanes (**Tabla 4**).

La familia con mayor número de proteasas es la familia 8 del clan MA, denominada leismanolisina. Estas metaloproteasas también se encuentran presentes en otros parásitos tales como, *Entamoeba histolytica* (Teixeira y cols. 2012), *Leishmania* (Kulkarni y cols. 2008), y *Trypanosoma cruzi* (Cuevas y cols. 2003). Se le ha dado una función de adhesión, así como que participa en estadios específicos durante la invasión al huésped.

El segundo lugar lo ocupa la familia M24 del clan MG, y el tercer lugar la familia M14 del clan MC. Entre estas tres familias componen cerca del 63% del total de metaloproteasas en *T. vaginalis*.

Tipo catalítico	Clan	Familia	Número	Ejemplo de familia
Metallo	M-	M49	2	
	MA	M1	3	aminopeptidase N
		M3	1	oligopeptidase A
		M8	55	Leishmanolysin-like
		M41	1	FtsH endopeptidase
		M48	3	Ste24 endopeptidase
	MC	M14	11	zinc carboxypeptidase
	ME	M16	8	insulinase
	MG	M24	13	aminopeptidase P
	MH	M18	6	aspartyl aminopeptidase
		M20	10	peptidase T
		M28	1	aminopeptidase S
	MK	M22	1	sialoglycoprotein endopeptidase
	MP	M67	7	Poh1 endopeptidase

#### **1.8.4. Metaloproteasas descritas experimentalmente en *T. vaginalis*.**

Hasta el momento sólo se han descrito experimentalmente cinco metaloproteasas en el parásito protozoario *T. vaginalis*. Dos de alto peso molecular (142 y >220 kDa) reportadas por Bözner en 1990 (Bozner y cols. 1992). La actividad óptima de estas dos proteasas fue a pH de 8. Además se demostró su mecanismo catalítico de metaloproteasa, bajo la presencia de 10 mM de EDTA.

Una metaloproteasa de ~47 kDa detectada mediante inmunotinción, se observó que co-localiza en el hidrogenosoma de *T. vaginalis*, además de encontrarse en ella una subunidad  $\beta$  homóloga a la de la peptidasa de procesamiento mitocondrial (PPM). Sin embargo se ha observado que la PPM necesita de la subunidad  $\alpha$  y  $\beta$  para llevar a cabo el procesamiento proteolítico de sus blancos, mientras que la peptidasa de procesamiento hidrogenosomal (PPH) solo requiere de la subunidad  $\beta$  (Brown y cols. 2007).

En 2010 se describió otra metaloproteasa que pertenece a la familia M8 del clan MA, la cual es del tipo leismanolisina, la cual se sugiere que participa en la citotoxicidad y probablemente en la adherencia del parásito hacia las células del huésped. Se demostró que esta metaloproteasa es altamente expresada y colocaliza en la superficie de dos aislados (T106 y 30236). También se evaluó que su actividad frente a células HeLa es fuertemente inhibida por el agente quelante 1-10 fenantrolina, y no así por el EDTA. Por lo que se sugiere que algunas metaloproteasas presentes en *T. vaginalis* pueden ser diferencialmente inhibidas por diferentes agentes quelantes (Ma y cols. 2011).

Otra metaloproteasa del clan MG, con un peso molecular de 50 kDa fue descrita (Vazquez-Carrillo y cols. 2011); su expresión es modulada por la presencia de 1.6 mM de  $Zn^{2+}$ . Esta es inmunogénica ya que es inmunoreconocida por el suero de pacientes masculinos con la infección, mientras que el suero de pacientes femeninos con tricomonosis y el suero de personas sanas no reconocieron a esta proteasa (Quintas-Granados y cols. 2013). Es importante recalcar que ésta es la primera proteasa que se estudia bajo las condiciones microambientales que están presentes

en la infección masculina. Con estos últimos resultados se puede entender más la biología y el comportamiento que tiene el parásito en el microambiente del huésped.

### **1.9. Importancia de seguir con el estudio de las metaloproteasas en *T. vaginalis*.**

Por lo anterior, las metaloproteasas son enzimas importantes que participan en diversos procesos biológicos. Dado que estas ocupan el segundo lugar en cuanto a número de proteasas en el genoma de *T. vaginalis* y el poco estudio que se ha realizado semejando condiciones del microambiente masculino durante la infección, es importante seguir con el estudio y conocer cuantas metaloproteasas más son expresadas por este parásito.

# *Justificación y objetivos*

---

## **2. Justificación.**

### **2.1. Justificación.**

La tricomonosis ocupa el primer lugar en enfermedades de transmisión sexual no viral en México. La secuenciación del genoma mostró que este parásito posee 123 posibles metaloproteasas, hasta el momento sólo se han descrito cinco experimentalmente.

Dado que las metaloproteasas participan en diferentes procesos biológicos como degradación de proteínas de matriz extracelular, autoactivación de proteasas, reciclamiento de aminoácidos y muchos otros procesos, resulta interesante e importante la caracterización e identificación del metaloproteoma de este parásito y con ello contribuir a dilucidar su papel durante la infección por *Trichomonas vaginalis*.

### **2.2. Objetivo general.**

Identificar y caracterizar el metaloproteoma de *Trichomonas vaginalis*.

### **2.3. Objetivos particulares.**

1. Obtención y análisis *in silico* del metaloproteoma de *T. vaginalis*.
2. Proteómica de la actividad diferencial del metaloproteoma de *T. vaginalis* en aislados de hombre y mujer en geles de sustrato.
3. Obtención del inmunometaloproteoma de *T. vaginalis*.

# *Metodología*

---

### **3. Metodología.**

#### **3.1. Análisis in silico del metaloproteoma de *T. vaginalis*.**

Los accesos a las secuencias de cada una de las 123 metaloproteasas reportadas en el genoma completo de *T. vaginalis*, se utilizaron para introducirlas en la base de datos UniProtKB (<http://www.uniprot.org/help/uniprotkb>). De esta pagina se obtuvieron características de cada una de las metaloproteasas, tales como: clan al que pertenecen, familia, longitud de la proteína, cofactor que une, función molecular, proceso biológico. Esta información se depositó en una hoja de calculo para facilitar la búsqueda de alguna metaloproteasas.

Se complementó también la información con la búsqueda en la base de datos MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>), donde se obtuvo la localización celular para las 14 familias de metaloproteasas presentes en el genoma de *T. vaginalis*.

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

Trofozoitos de *T. vaginalis* aislado masculino (HGMIN01) y femenino (CNCD147) fueron cultivados por 24 h en medio TYM pH 6.2 con 10% de suero de caballo inactivado (Gibco, USA) y suplementado con ó sin 1.6 mM de ZnCl<sub>2</sub> (Sigma).

#### **3.3. Extracción de proteasas para ensayos de actividad en 1D.**

Para la extracción de metaloproteasas se tomaron 20x10<sup>6</sup> parásitos en presencia y ausencia de 1.6 mM de Zn<sup>2+</sup> de ambos aislados. Se lavaron 3 veces con PBS pH 7.0 frío y centrifugados a 14000 xg por 3 minutos a 4°C. La lisis se llevó a cabo con PBS pH 8.0 en presencia de un detergente suave (deoxicolato de sodio al 10%), se dejó incubó por 20 minutos a 4°C. Posteriormente el lisado se colocó sobre un colchón de sacarosa al 10%, y se centrifugó a 14000 xg 30 minutos a 4°C. En seguida se cargó el sobrenadante en columnas cromatograficas Bio-gel P6 Micro Bio-Spin (Bio-Rad). Las proteasas posteriormente fueron eluidas en Tris-HCl, pH 7.5.

### **3.4. Inhibidores.**

Para analizar y determinar la actividad de metaloproteasas se utilizaron inhibidores para cisteinproteasas (E64; 250  $\mu\text{M}/\mu\text{g}$  de proteína), serinproteasas (TLCK; 1mM/ $\mu\text{g}$  de proteína y Leupeptin; 0.5 mM/ $\mu\text{g}$  de proteína), así como agentes quelantes (EDTA; 100 mM y 1,10 fenantrolina; 50 mM) para inhibir la actividad de tipo metaloproteasa. Estos inhibidores se cargaron con 20  $\mu\text{g}$  de proteína en geles SDS-PAGE al 9% co-polimerizados con colágena tipo IV.

### **3.5. Ensayos de Actividad en 1D.**

Los ensayos de actividad se llevaron a cabo con 20  $\mu\text{g}$  de proteína en geles SDS-PAGE al 9% co-polimerizados con 0.15% de colágena tipo IV, estos se corrieron a 110 v por 2 h en un baño de hielo. Después de la corrida el SDS fue removido con dos lavados de 20 minutos cada uno a temperatura ambiente con una solución de Triton X-100 al 2.5% (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, U.S.A.). En seguida uno de los geles fué colocado en 50 ml del buffer de activación para metaloproteasas (Tris-HCl 50mM pH 7.5, 0.15 M NaCl, 0.02%  $\text{NaN}_3$ , y 10 mM de  $\text{ZnCl}_2$ ) por 18 h a 37 °C y otro en 50 ml de buffer de activación para cisteinproteasas (100 mM acetato de sodio pH 4.5, 0.1 % de  $\beta$ -mercaptoetanol) por 12h a 37°C. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie, aquellas bandas claras fueron muestra de actividad de proteasas (Quintas-Granados y cols. 2013).

### **3.6. Cuantificación de la actividad mediante el programa Image J 1.47v.**

La actividad que se obtuvo en los geles se determinó por el uso del programa Image J 1.47v. Primeramente los geles fueron fotografiados en el equipo ChemiDoc™ MP System con el uso de luz blanca. Posteriormente se exportaron las fotos en un formato TIFF de 300 dpi. En seguida se procedió a realizar la cuantificación del numero de pixeles de cada banda de actividad de acuerdo como lo describe el manual de usuario. Por ultimo los datos obtenidos se graficaron en una hoja de calculo (Hu y Beeton 2010).

### **3.7. Ensayos de Actividad en 2D.**

Los ensayos de 2D se llevaron a cabo a partir de  $60 \times 10^6$  parásitos que fueron lisados con 200  $\mu$ l del buffer de 2D (4M de urea, 4% CHAPS, 70mM DTT, 2% IPG pH 4-7, y azul de bromofenol; Bio-Rad), la muestra fue aplicada en tiras de IPG (7cm, pH lineal de 4-7; Bio-Rad), y rehidratada de manera pasiva por 12h. El isoelectroenfoco se llevo a cabo en el sistema Protean IEF (Bio-Rad) con los siguientes pasos: Paso 1- gradiente de 1 a 225 V durante 35 minutos; paso 2- gradiente de 250 a 2479 V por 185 minutos; paso 3- gradiente de 2466 a 15,434 V por 210 minutos. Después la segunda dimensión, las proteínas fueron reducidas (10mg/ml de DTT) y alquiladas (25mg/ml de iodoacetamida) paso por paso, 15 minutos cada uno, en buffer de equilibrio (6M urea, 2% SDS, 300mM Tris-Cl, pH 8,8, 20% glicerol, y 0,002% de azul de bromofenol) a temperatura ambiente. Posteriormente la segunda dimensión se llevó a cabo en geles SDS-PAGE como se describió para los ensayos de actividad en 1D (Quintas-Granados y cols. 2013).

### **3.8. Western blot en 2D (WB-2D)**

La primera dimensión se realizó como se describió en la sección anterior. Para la segunda dimensión las tiras IPG se corrieron en geles SDS-PAGE al 9% a 110 v por dos horas en baño de hielo. Posteriormente las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare, USA). Estas fueron bloqueadas con una solución PBS-leche 5% pH 7 durante toda la noche a 4 °C en agitación constante. Posteriormente se realizaron tres lavados de 15 minutos con PBS y en seguida se agregó el suero de un paciente con tricomonosis en una dilución 1:100 incubando 18 h a 4 °C en agitación constante (Ramon-Luing y cols. 2010). En seguida se dieron tres lavados de 15 minutos con PBS y por ultimo se agregó un anticuerpo secundario anti-IgG de humano acoplado a peroxidasa en una dilución 1:3000, incubando por dos horas a 25 °C. Estas fueron reveladas por quimioluminiscencia mediante el uso de ChemiDoc™ MP System.

### **3.9. Análisis mediante PDQuest 2-D Analysis Software™.**

El análisis para el empalme de las imágenes obtenidas de los ensayos de actividad y westernblot en 2D se realizó con el programa PDQuest 2-D Analysis Software™ de acuerdo como lo describe el manual de usuario.

## 4. Resultados.

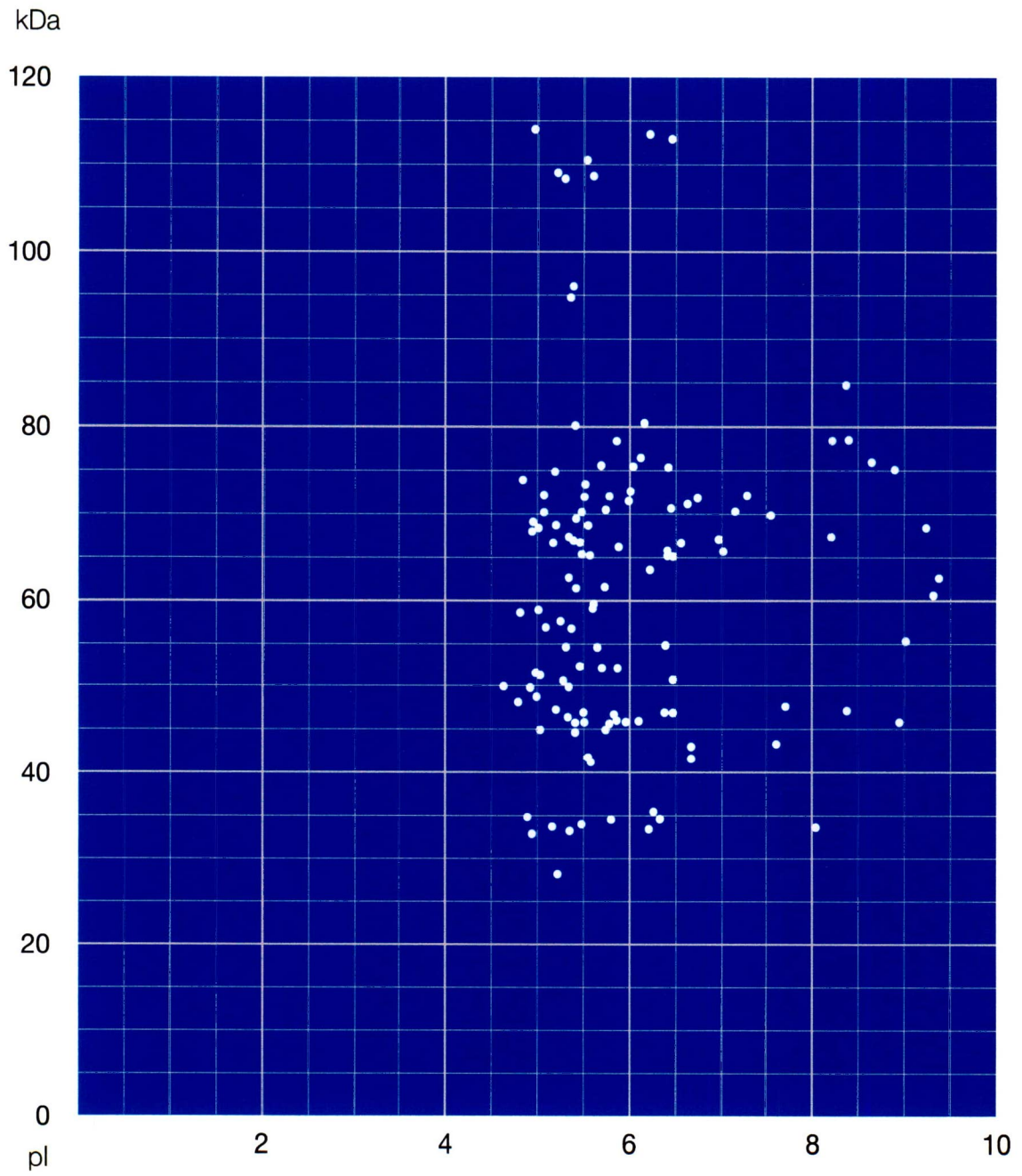
### 4.1. Obtención y análisis *in silico* del metaloproteoma de *T. vaginalis*.

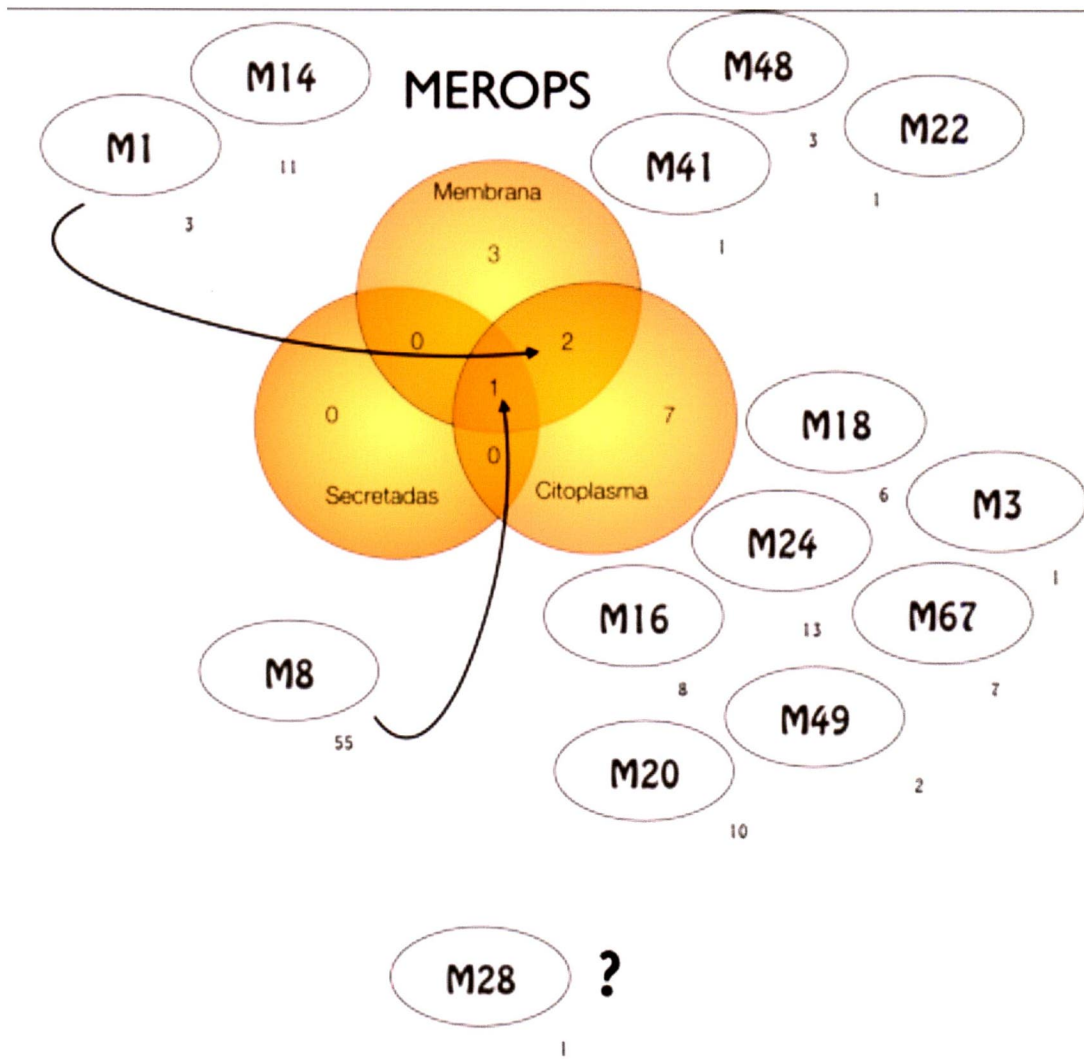
Para cumplir con el primer objetivo de este trabajo, se realizó el análisis *in silico* de las 123 secuencias reportadas en el genoma de este parásito en 2007. En un primer abordaje en la base de datos UniProtKb se obtuvieron características como: clan, familia, longitud de la secuencia de aminoácidos, cofactor, función molecular, componente celular, punto isoelectrico y peso molecular (**Apéndice**).

Se realizó un mapa proteómico con el punto isoelectrico y masa molecular de cada una de las metaloproteasas (**Figura 6**). Este mapa proteómico nos mostró que la mayoría de las metaloproteasas se encuentran agrupadas en un rango de 30 a 80 kDa y en un punto isoelectrico de 4 a 7. También se demostró que cincuenta y ocho metaloproteasas se encuentran en membrana y que sólo tres se localizan de manera intracelular (**Apéndice**).

Para complementar esta información se realizó la búsqueda de la localización celular para las 14 familias de metaloproteasas de *T. vaginalis* en la base de datos MEROPS. En la **figura 7** se muestran los resultados de esta búsqueda siendo que, 10 familias de 14 (**10/14**) se encontraron en citoplasma, **6/14** en membrana y **1/14** es secretada.

Con estos resultados se apoyó la decisión sobre las tiras de pH que fueron utilizadas al momento de correr las electroforesis en 2D.





#### **4.2. Proteómica de la actividad diferencial del metaloproteoma de *T. vaginalis* en aislados de hombre y mujer en geles de sustrato.**

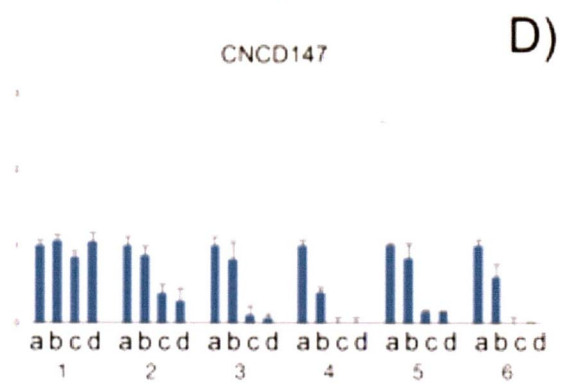
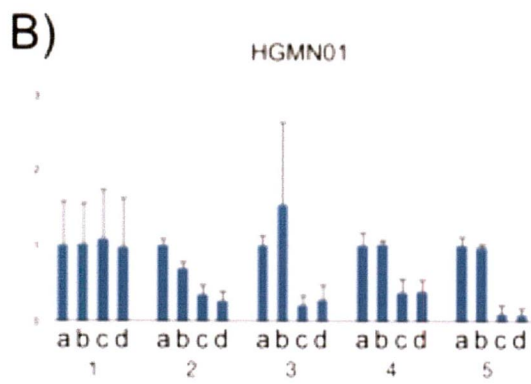
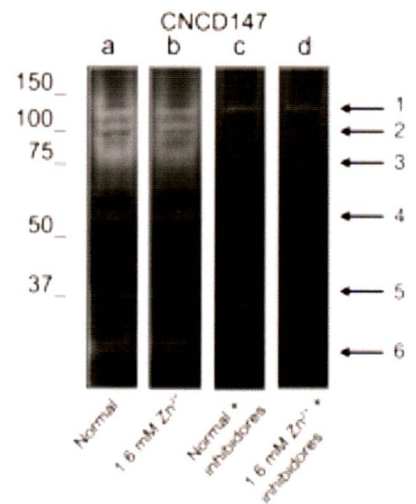
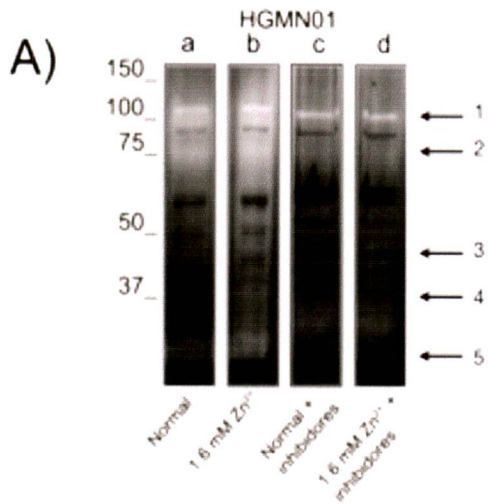
Para cumplir con el segundo objetivo se analizó la actividad de metaloproteasas en los aislados HGMN01 y CNCD147 en presencia y ausencia de  $Zn^{2+}$  en geles de sustrato. Como control se realizó la activación de cisteinproteasas (**Figura 8**).

En la **figura 8A** se muestra la actividad del aislado HGMN01, en los carriles “a” y “b” se observa la actividad de cisteinproteasas en ausencia de los inhibidores de ambas condiciones, donde hubo la actividad de cinco proteasas (**115, 77, 47, 37, 30 kDa**). En los carriles “c” y “d” se observó como la actividad de las cinco proteasas disminuyó en presencia de los inhibidores para cisteinproteasas y serinproteasas (E64, TLCK, Leupeptin). En la **figura 8B** se muestra el análisis semicuantitativo de la actividad en ausencia y presencia de los inhibidores del aislado HGMN01.

En la **figura 8C** se muestra la actividad del aislado CNCD147, en los carriles “a” y “b” se observó la actividad de seis proteasas en ausencia de los inhibidores (**115, 100, 77, 55, 37 y 30 kDa**). En los carriles “c” y “d” en donde existe el uso de inhibidores se observó como disminuyó también la actividad de estas proteasas. En la **figura 8D** se muestra el análisis semicuantitativo de la actividad para el aislado CNCD147.

De manera interesante las proteasas de 115, 77, 37 y 30 kDa fueron activas en ambos aislados. Mientras que la proteasa de 47 kDa fue únicamente activa en el aislado HGMN01, y las proteasas de 100 y 55 fueron únicamente activas en el aislado CNCD147.

También se observó que en presencia de los inhibidores en ambos aislados apareció una banda de actividad de 33 kDa. Además la actividad de la proteasa de 115 kDa se mantuvo en presencia de los inhibidores.



Una vez que se analizó la actividad para cisteinproteasas, se realizó los ensayos para obtener la actividad de metaloproteasas en ambos aislados (**Figura 9**).

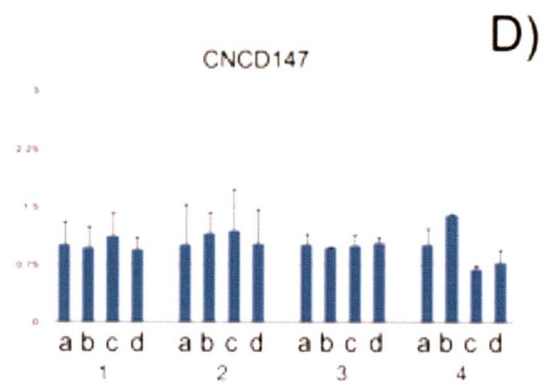
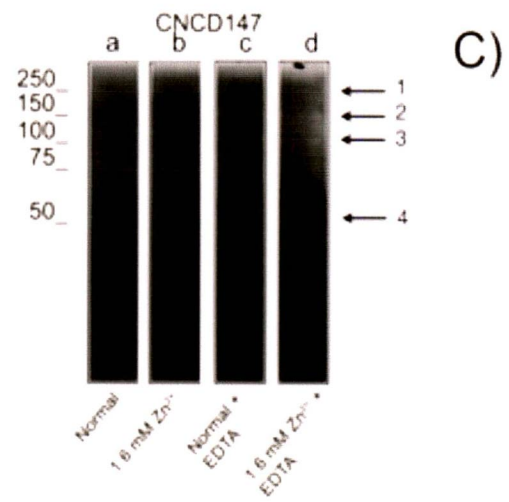
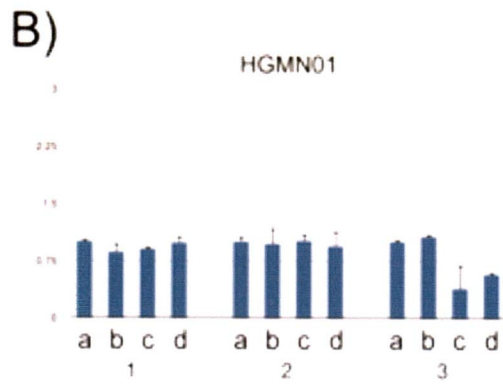
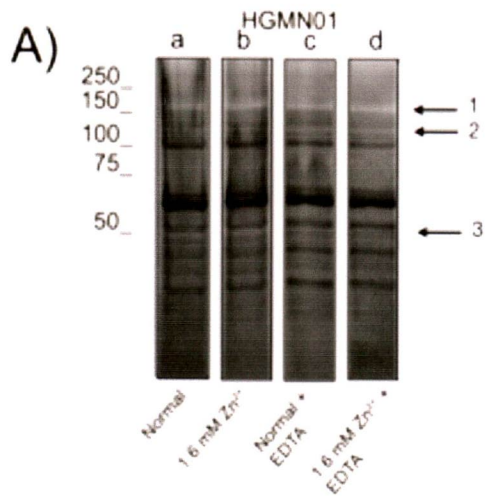
En la **figura 9A** se muestra la actividad en presencia y ausencia de  $Zn^{2+}$  para el aislado HGMN01, donde se observó que la actividad de metaloproteasa no fue tan remarcada como se vio para cisteinproteasas. En los carriles "a" y "b" se muestra la actividad de tres proteasas (**156, 115 y 53 kDa**). Para confirmar la identidad de metaloproteasa se usó el agente quelante mostrado en los carriles "c" y "d", donde la actividad de la proteasa de **53 kDa** se vio disminuida.

En la **figura 9B** se muestra el análisis semicuantitativo para la actividad de estas tres proteasas en el aislado HGMN01. Cabe mencionar que para este ensayo y para el de el aislado CNCD147 en todas las condiciones se usaron inhibidores (E64, TLCK y Leupeptin), esto para obtener sólo la actividad de metaloproteasa, y esta no fuera enmascarada con alguna del tipo cistein.

En la **figura 9C** se muestra la actividad en presencia y ausencia de  $Zn^{2+}$  para el aislado CNCD147. En los carriles "a" y "b" se observa que hubo la actividad de cuatro proteasas (**247, 156, 115 y 53 kDa**). En los carriles "c" y "d" donde se usó el agente quelante se muestra que la actividad de la proteasa de **53 kDa** se vio inhibida. En la **figura 9D** muestra el análisis semicuantitativo para la actividad de las cuatro proteasas en el aislado CNCD147.

Aquellas proteasas que fueron activas en ambos aislados fueron la de 156, 115 y 53 kDa. Mientras que la única proteasa que mostró ser diferencialmente activa fue la de 247 kDa del aislado CNCD147. Es interesante que sólo aquella proteasa de 53 kDa fue inhibida por el agente quelante, mientras que las otras mantuvieron su actividad.

Para tener una mejor resolución de la actividad de estas proteasas se propuso llevar a cabo geles de sustrato en 2D. Por lo que un primer ensayo fue analizar como se comportaba la actividad de cisteinproteasas bajo el protocolo de 2D (**Figura 10**).



En la **figura 10A** se muestra por primera vez el degradoma de cisteinproteasas en presencia de  $Zn^{2+}$  para los aislados HGMN01 y CNCD147. Algunas de estas proteasas concuerdan con el degradoma realizado por Ramón-Luing en 2010. En la **figura 10B** se observa el análisis por PDQuest™ el cual muestra la actividad de 36 proteasas; 12 fueron diferencialmente activas en ambos aislados y 24 fueron compartidas. Además existieron proteasas las cuales aumentaron su actividad de un aislado a otro (**recuadro amarillo 1**), así como, proteasas que en un aislado tuvieron actividad mientras que en el otro no (**recuadro amarillo 2**).

Con estos resultados pudimos observar que la actividad de cisteinproteasa no se vio afectada por el proceso de 2D, por lo que se procedió a realizar el ensayo para metaloproteasas en 2D (**Figura 11**).

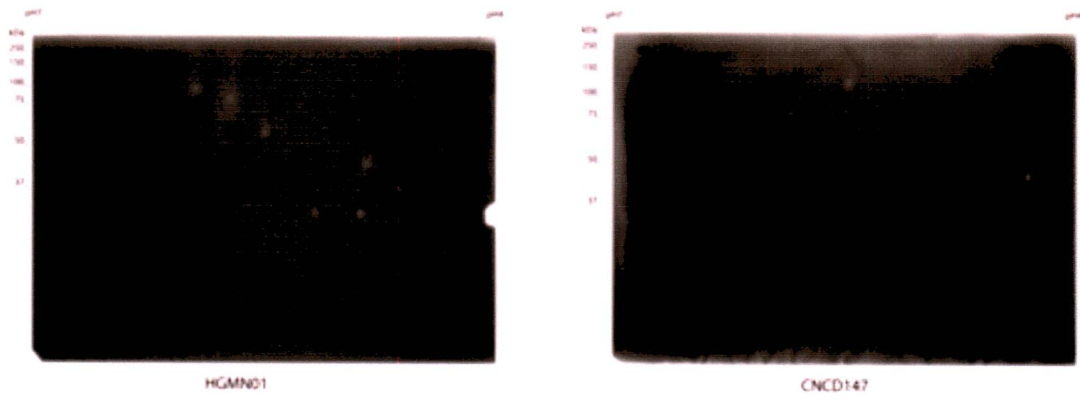
En la **figura 11A** se muestran los geles de actividad para metaloproteasa en 2D de los aislados HGMN01 y CNCD147. Para el aislado HGMN01 se obtuvo un patrón de ocho spots de actividad, y para el aislado CNCD147 tres. De acuerdo con el análisis de PDQuest™ (**Figura 11B**) se obtuvo que dos proteasas son compartidas entre ambos aislados, mientras que para el aislado HGMN01 se obtuvieron seis proteasas diferenciales, y para el aislado CNCD147 se obtuvo una.

Lo siguiente que se realizó fue analizar el mapa proteómico en conjunto con los datos obtenidos de los experimentos de actividad en 2D (**Figura 12**).

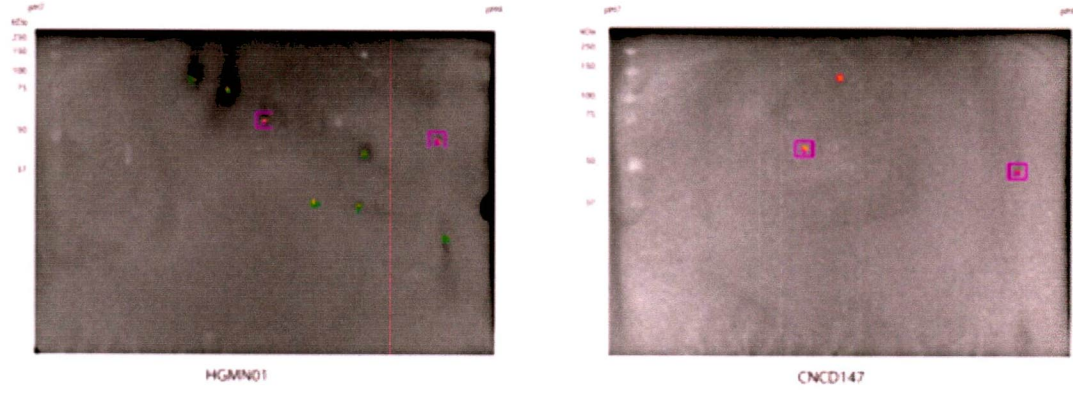
Lo primero que se hizo fue buscar la concordancia de los pesos moleculares y los puntos isoeléctricos del análisis in silico y observar si coincidían con los obtenidos por el análisis de PDQuest™ (**Figura 12A**). Lo que se vió fue que para el aislado HGMN01 seis de los ocho spots coincidían con el mapa proteómico. Para el aislado CNCD147 dos de los tres spots coincidieron también con el mapa proteómico (**Figura 12B**).

***Figura 11. Degradoma de metaloproteasas de los aislados HGMN01 y CNCD147.***

A)

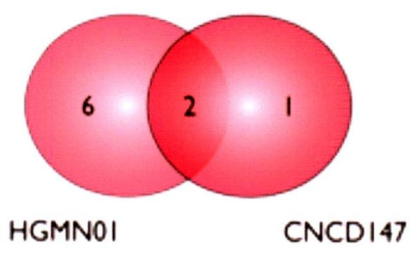


B)



Proteasas activadas en buffer para Metaloproteasas.

HGMN01	8
CNCD147	3

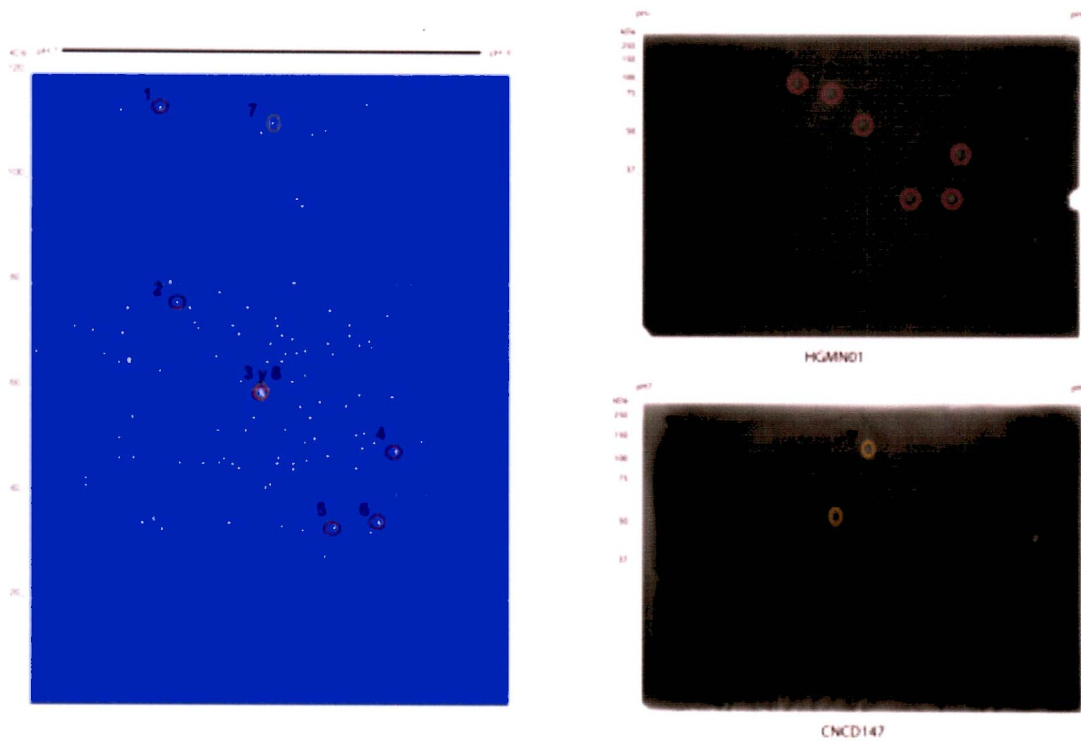


*Figura 12. Análisis comparativo entre los resultados in silico y experimentales utilizando pl y PM.*

A)

Spot	MW	pI
1	113.6	6.22
2	76.45	6.12
3 y 8	59.03	5.6
3 y 8	59.52	5.61
4	48.27	4.79
5	33.83	5.16
6	34.93	4.89
7	110.66	5.54

B)



### 4.3 Obtención del inmunometaloproteoma de *T. vaginalis*.

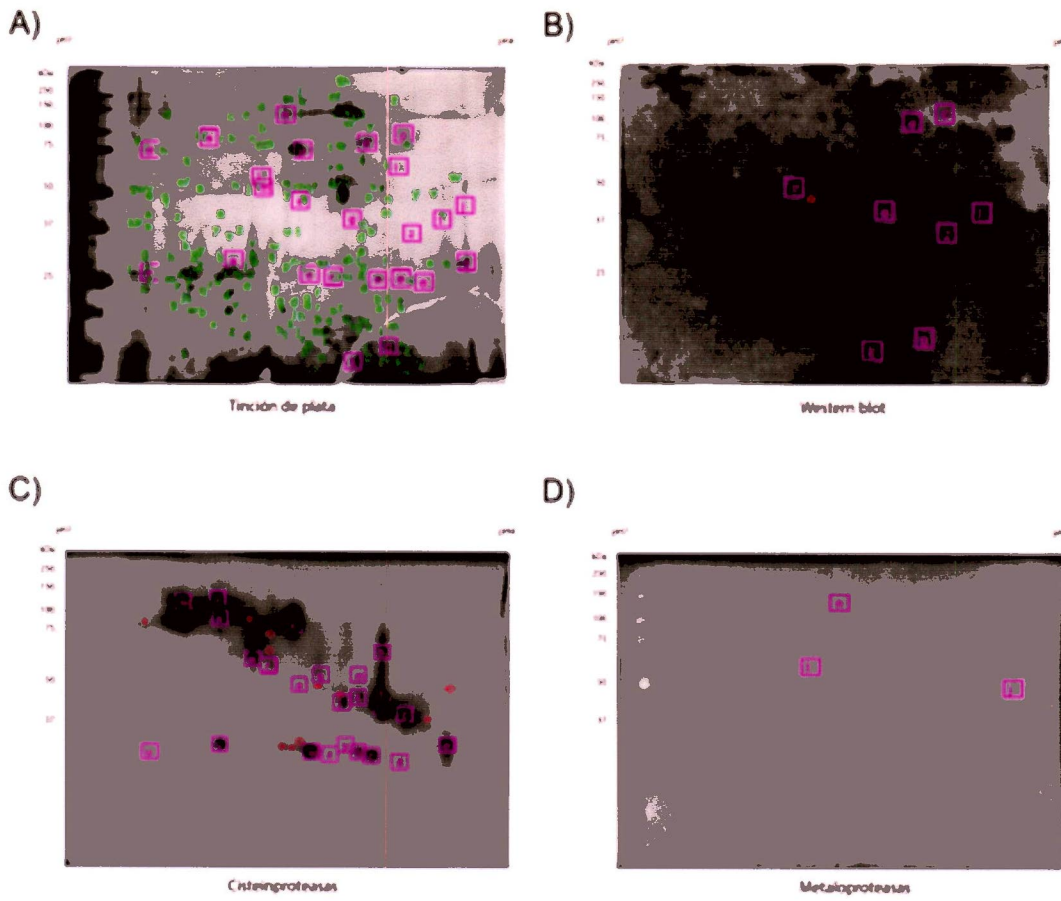
Para cubrir el siguiente objetivo se realizó la electroforesis de proteínas separadas por 2D y su posterior electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa, esto con la finalidad de buscar proteasas del tipo metalo que fueran reconocidas por el suero de un paciente con tricomonosis en los aislados HGMN01 y CNCD147. Posteriormente se realizó el empalme de las imágenes para el análisis por PDQuest™.

En la **figura 13** se muestra el análisis por PDQuest™ del aislado CNCD147. Los resultados que obtuvimos fueron los siguientes: Para los geles teñidos con plata se obtuvo un total de 230 spots (**Figura 13A**); para el western blot 9 spots fueron inmunoreconocidos (**Figura 13B**); para los geles de cisteinproteasas 36 spots tuvieron actividad (**Figura 13C**); y por último en los geles de metaloproteasas 3 spots tuvieron actividad (**Figura 13D**).

En la **figura 14** se muestra el análisis por PDQuest™ del aislado HGMN01. Los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes: Para los geles teñidos con plata se obtuvo un total de 237 spots (**Figura 14A**); para el western blot 15 spots fueron inmunoreconocidos (**Figura 14B**); para los geles de cisteinproteasas 36 spots tuvieron actividad (**Figura 14C**); y por último en los geles de metaloproteasas 8 spots tuvieron actividad (**Figura 14D**).

El empalme de las imágenes para los dos aislados mostró que ninguna metaloproteasa tuvo inmunoreconocimiento por el suero del paciente con tricomonosis. Sin embargo, para el aislado CNCD147 una proteasa de tipo cisteín si fue inmunoreconocida, mientras que para el aislado HGMN01 hubo dos proteasas de tipo cisteín que si fueron inmunoreconocidas.

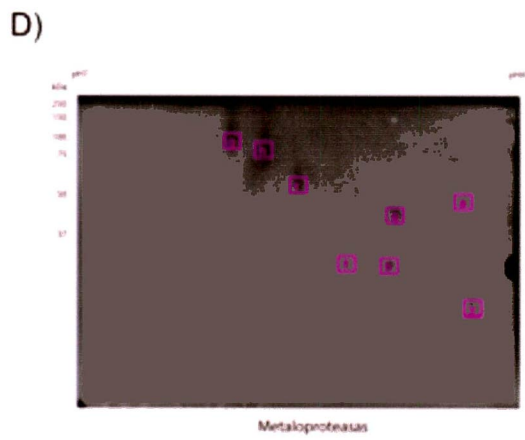
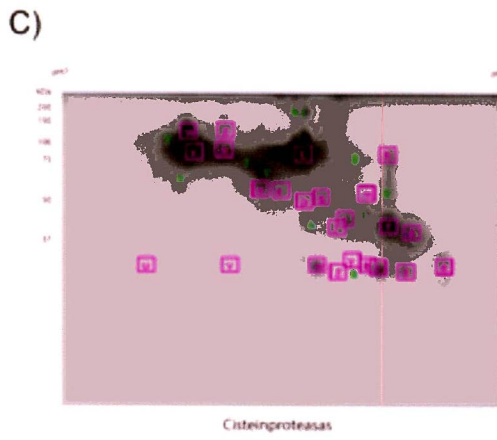
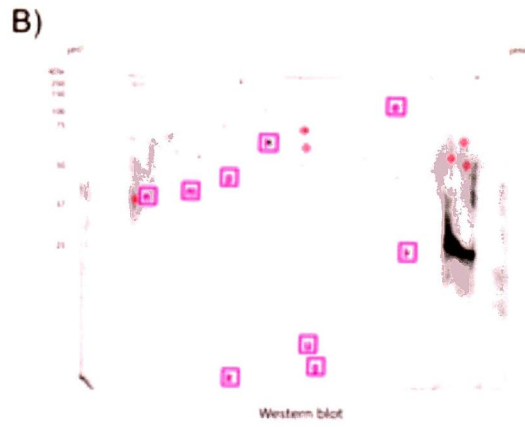
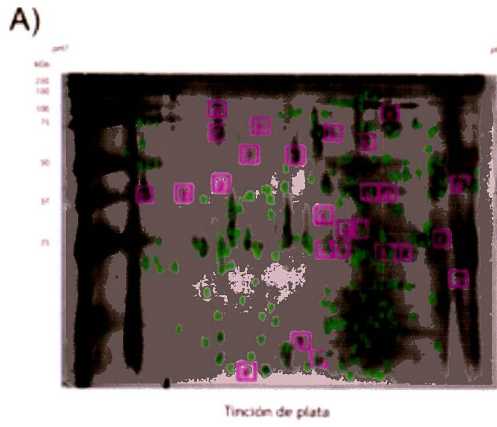
*Figura 13. Análisis por PDQuest™ 2-D Analysis Software del aislado CNCD147.*



CNCD147	
Plata	230
Metaloproteasas	3
Cisteinoproteasas	36
Western blot	9

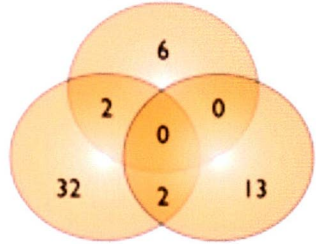


**Figura 14. Análisis por PDQuest™ 2-D Analysis Software del aislado HGMN01.**



HGMIN01	
Plata	237
Metaloproteasas	8
Cisteinproteasas	36
Western blot	15

Proteasas activadas con buffer para Metafos.



Proteasas activadas con buffer para Cistein. WB

#### 4.4. Posibles metaloproteasas candidatas presentes en los aislados HGMN01 y CNCD147.

Aunque el análisis por WB no resultó favorable para la identificación de al menos una metaloproteasa, lo siguiente fué tomar los datos obtenidos del análisis comparativo de los resultados *in silico* y experimentales a partir de los pI y MW de las metaloproteasas que tuvieron actividad.

De acuerdo con esto obtuvimos que dos metaloproteasas (TVAG\_494490, TVAG\_000880) pertenecen al clan MA agrupado en la familia M8, de acuerdo a su localización celular se encuentran en membrana. Otras dos del clan MP pertenecientes a la familia M67 (TVAG\_015750, TVAG\_124160) estas se encuentran en citoplasma. Una más del clan ME agrupada en la familia M16 localizada en citoplasma (TVAG\_484640), todas estas se encuentran presentes en el aislado HGMN01. Aquellas que están en aislado CNCD147 es una metaloproteasa que pertenece al clan ME y a la familia M16 que se encuentra en citoplasma (TVAG\_317610). Sin embargo aquella que es compartida en ambos aislados, como se mencionó anteriormente, se encuentran localizadas dos metaloproteasas que difieren poco con respecto a su pI y PM. Una de ellas pertenece al clan MH y a la familia M20 (TVAG\_433790) y la otra no tiene asignado un clan hasta el momento pero pertenece a la familia M49 (TVAG\_032280). (**Tabla 5**)

A todas estas se les realizó una búsqueda de EST's (expression sequence tags) en la base de datos TrichDB (<http://trichdb.org/trichdb/>) para saber si en alguna condición se había logrado observar el transcrito de dichas proteasas. Los resultados que se obtuvieron se muestran en la **tabla 6**.

Tabla 5. Posibles metaloproteasas candidatas presentes en los aislados HGMN01 y CNCD147

No de spot	No de acceso	Clan	Familia	Localización celular	Peso Molecular	Punto Isoelectrico	Aislado
1	TVAG_484640	ME	M16	Citoplasma	113.6	6.22	HGMN01
2	TVAG_494490	MA	M8	Membrana	76.45	6.12	HGMN01
3 y 8	TVAG_032280	M-	M49	Citoplasma	59.03	5.6	HGMN01 y CNCD147
3 y 8	TVAG_433790	MH	M20	Citoplasma	59.52	5.61	HGMN01 y CNCD147
4	TVAG_000880	MA	M8	Membrana	48.27	4.79	HGMN01
5	TVAG_015750	MP	M67	Citoplasma	34.93	4.89	HGMN01
6	TVAG_124160	MP	M67	Citoplasma	33.83	5.16	HGMN01
7	TVAG_317610	ME	M16	Citoplasma	110.66	5.54	CNCD147

Tabla 6. Análisis de EST's de las metaloproteasas candidatas

No de spot	No de acceso	Clan	Familia	EST's	Estadio de expresión
1	TVAG_484640	ME	M16	0	-
2	TVAG_494490	MA	M8	3	Ameboide Fase G1/S
3 y 8	TVAG_032280	M-	M49	10	Pseudoquiste Desconocido
3 y 8	TVAG_433790	MH	M20	3	Cultivo
4	TVAG_000880	MA	M8	12	Cultivo
5	TVAG_015750	MP	M67	0	-
6	TVAG_124160	MP	M67	9	Pseudoquiste Fase G1/S
7	TVAG_317610	ME	M16	8	Cultivo Fase G1/S Ameboide

## *Discusión*

---

## 5. Discusión.

*Trichomonas vaginalis* es el agente causal de la tricomonosis, la cual provoca cerca de 120-180 millones de nuevos casos en todo el mundo (OMS 2001). Este parásito cuenta con distintos factores de virulencia los cuales le otorgan propiedades tales como, citoadherencia y citotoxicidad. La citotoxicidad es empleada por diversos parásitos para poder obtener los nutrientes necesarios para su supervivencia dentro del huésped, para ello, hacen uso del repertorio de proteasas con que cuentan (Pina-Vazquez y cols. 2012). El genoma de *T. vaginalis* cuenta con 446 genes que codifican distintos tipos catalíticos de proteasas (Carlton y cols. 2007) entre ellas las del tipo metaloproteasas. De acuerdo con los resultados que se obtuvieron después de introducir las 123 secuencias correspondientes a las metaloproteasas en las bases de datos UniProtKB (<http://www.uniprot.org/help/uniprotkb>) y MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>), encontramos que la mayoría de las proteasas se hallan ubicadas en la superficie del parásito y pertenecen a la familia M8 del clan MA denominadas leismanolisinas. Esta familia también ha sido reportada en otros parásitos tales como: *E. histolytica* (Teixeira y cols. 2012), *Leishmania* (Kulkarni y cols. 2006), y *Trypanosoma cruzi* (Cuevas y cols. 2003). Lo que sugiere que su participación es importante durante la patogénesis e invasión al huésped (Isnard y cols. 2012, Olivier y cols. 2012). Sin embargo también con los datos obtenidos como lo fue el punto isoelectrico y el peso molecular de las 123 metaloproteasas se logró construir un mapa proteómico. Esto fue novedoso ya que dentro de la literatura no se encontró reportado algo semejante, es decir no había algún trabajo en el cual se hayan tomado las características del metaloproteoma de algún organismo y mucho menos realizar un mapa como este. Además este mapa resultó también de mucha ayuda al momento de elegir las tiras de pH a utilizar. Proponemos como perspectiva de este objetivo que se incremente dicha tabla y dicho mapa con el resto de las demás proteasas de los distintos tipos catalíticos. Esto nos daría un panorama de la distribución de estas con respecto a su localización celular, así como localización en un perfil proteómico en doble dimensión.

En el segundo objetivo se obtuvo la actividad para cisteinproteasas en 1D lo que de manera interesante se pudo observar que existió la actividad diferencial de proteasas entre ambos aislados, esto concuerda con otros reportes los cuales muestran la actividad diferencial en distintos aislados (Neale y Alderete 1990). Lo cual sugiere una heterogeneidad en la expresión de estas según corresponda a cada aislado. Por otro lado se obtuvo por primera vez el degradoma en 2D de cisteinproteasas para un aislado masculino (HGMMN01) y uno femenino (CNCD147) en presencia de  $Zn^{2+}$ . Esto pudiera complementar un reporte anterior en el cual se realizó el degradoma de cisteinproteasas en condiciones normales del aislado CNCD147 (Ramon-Luing y cols. 2010). Sin embargo se observó que la actividad de cisteinproteasa en 2D obtenida en el aislado CNCD147 en presencia de  $Zn^{2+}$  fue menor que la que presenta en condiciones normales, esto concuerda con el reporte de Vazquez-Carrillo y cols. 2011. Además en comparación con el aislado HGMMN01, este último pareció tener una mayor actividad que la de CNCD147.

Con respecto al degradoma de metaloproteasas se obtuvo que en 1D se compartieron tres (247, 156 y 115 kDa) entre ambos aislados. Su actividad mostró ser sostenida aún en presencia de los diferentes inhibidores y agentes quelantes (E64, TLCK, Leupeptin y EDTA), sin embargo cabe mencionar que no son los únicos inhibidores que existen, por lo que una perspectiva para este punto es realizar nuevos ensayos utilizando diferentes inhibidores para caracterizar a este tipo de proteasas (Overall y Blobel 2007). Por otro lado se encontró que la proteasa de 53 kDa presente en ambos aislados fue inhibida por el uso de EDTA. Existe un reporte de una metaloproteasa de 50 kDa que esta presente en *T. vaginalis* la cual es inmunoreconocida por el suero de pacientes masculinos con la infección y no así por el suero de pacientes femeninos con la infección ni tampoco los sanos (Quintas-Granados y cols. 2013). Por lo que se sugiere que se trate de la misma proteasa.

Los ensayos de actividad en 2D mostraron un cambio con respecto a la actividad de proteasa en 1D, ya que en estos ensayos hubo una diferencia en las manchas de actividad por parte de los dos aislados, esto se puede deber a las condiciones desnaturizantes que lleva el buffer 2D. Recién se publicó un estudio para la

detección de enzimas proteolíticas en hojas de trigo por ensayos de zimogramas en 1- y 2D, en donde se utilizaron dos buffers; 1) desnaturalizante-no reductor, y 2) no desnaturalizante-no reductor. Ellos obtuvieron una actividad reducida en el primer buffer, mientras que en el segundo se observó un incremento en las manchas de actividad (Grudkowska y cols. 2013), por lo que concluyen que esta diferencia se debe a los compuestos de cada uno de los buffers. Es por eso que nosotros sugerimos que el cambio en el patrón de nuestra actividad en los zimogramas en 2D también se vieron afectados por los componentes del buffer que utilizamos. Sin embargo se propone como perspectiva analizar el uso de los buffers reportados por Grudkowska y cols., y evaluar la actividad en nuestras muestras.

Los resultados obtenidos en el tercer objetivo no fueron lo que esperábamos, ya que ninguna metaloproteasa resultó ser inmunoreconocida por el suero de paciente con tricomonosis, esto probablemente puede ser explicado ya que el suero que se utilizó provino de una paciente femenina con la infección, lo que apoyaría el reporte de Quintas-Granados y cols. que habla sobre la inmunodetección de una metaloproteasa con el suero de paciente masculino con la infección. Por otro lado en el aislado HGMN01 fueron inmunoreconocidas dos cisteinproteasas mientras que para el aislado CNCD147 solo una. En el reporte del degradoma también se realizaron incubaciones con sueros de pacientes femeninos donde aquellas cisteinproteasas inmunoreconocidas fueron cuatro del tipo papaina y una del tipo legumaina (Ramon-Luing y cols. 2010), por lo que sugerimos que probablemente aquellas proteasas que estén participando mayormente y siendo reconocidas por el sistema inmune del huésped sean las del tipo cistein, como se observa en otros parásitos (Saravia y cols. 2006).

De acuerdo con el análisis comparativo entre el mapa proteómico y los resultados experimentales pudimos sugerir la identidad de las proteasas que tuvieron actividad en 2D (**Figura 12**). Por lo que se observó que estas pertenecían a las familias M8, M16, M20, M49 y M67 las cuales se agrupan en los clanes MA, ME, MH, M- y MP respectivamente. De acuerdo con el análisis de EST's aquellas familias que presentaron mayor número de EST's fueron la M8, M16, M49, M67. Estas familias

tienen una localización celular tanto en membrana como en citoplasma. Las proteasas de la familia M8 comprenden metaloproteasas del tipo leismanosinas las cuales se encuentran en membrana (Ma y cols. 2011), de hecho estas muestran ser expresadas en presencia de fibronectina (Huang y cols. 2012) y las cuales contribuyen a la adherencia del parásito (Teixeira y cols. 2012). De acuerdo con un análisis transcriptómico bajo condiciones de hierro, ellos observan también la presencia de seis metaloproteasas entre ellas una de la familia M49 (Horvathova y cols. 2012) diferente a la que nosotros obtuvimos, lo que refuerza la posibilidad de que en la condición de  $Zn^{2+}$  también se encuentren expresadas proteasas de esta familia. Otra proteasa que resultó interesante pertenece a la familia M16 la cual se encarga de procesar proteínas citoplasmicas que posteriormente son translocadas al hidrogenosoma como se ha observado para *Giardia* y *Trichomonas* (Dolezal y cols. 2005) lo cual da sustento a nuestro trabajo.

Cabe mencionar que debido a la basta existencia de peptidasas de diferentes especificidades de sustrato y que se expresan en momentos muy diferentes en diversas condiciones ambientales, es difícil establecer patrones y aun observar la actividad de cada una de estas. Sin embargo resulta interesante e importante conocer mas sobre acerca de estas proteasas y así dilucidar su papel dentro de *Trichomonas vaginalis*.

*Bibliografía*

---

## 6. Bibliografía

- Alderete, J. F., D. Provenzano and M. W. Lehker (1995). "Iron mediates *Trichomonas vaginalis* resistance to complement lysis." Microb Pathog 19(2): 93-103.
- Alvarez-Sanchez, M. E., B. I. Carvajal-Gamez, E. Solano-Gonzalez, M. Martinez-Benitez, A. F. Garcia, J. F. Alderete and R. Arroyo (2008). "Polyamine depletion down-regulates expression of the *Trichomonas vaginalis* cytotoxic CP65, a 65-kDa cysteine proteinase involved in cellular damage." Int J Biochem Cell Biol 40(11): 2442-2451.
- Alvarez-Sanchez, M. E., E. Solano-Gonzalez, C. Yanez-Gomez and R. Arroyo (2007). "Negative iron regulation of the CP65 cysteine proteinase cytotoxicity in *Trichomonas vaginalis*." Microbes Infect 9(14-15): 1597-1605.
- Badylak, S. F. (2002). "The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction." Semin Cell Dev Biol 13(5): 377-383.
- Beltran, N. C., L. Horvathova, P. L. Jedelsky, M. Sedinova, P. Rada, M. Marcincikova, I. Hrdy and J. Tachezy (2013). "Iron-induced changes in the proteome of *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes." PLoS One 8(5): e65148.
- Benchimol, M. (2004). "Trichomonads under Microscopy." Microsc Microanal 10(5): 528-550.
- Bozner, P., A. Gombosova, M. Valent, P. Demes and J. F. Alderete (1992). "Proteinases of *Trichomonas vaginalis*: antibody response in patients with urogenital trichomoniasis." Parasitology 105 ( Pt 3): 387-391.
- Brown, M. T., H. M. Goldstone, F. Bastida-Corcuera, M. G. Delgadillo-Correa, A. G. McArthur and P. J. Johnson (2007). "A functionally divergent hydrogenosomal peptidase with protomitochondrial ancestry." Mol Microbiol 64(5): 1154-1163.
- Carlton, J. M., R. P. Hirt, J. C. Silva, A. L. Delcher, M. Schatz, Q. Zhao, J. R. Wortman, S. L. Bidwell, U. C. Alsmark, S. Besteiro, T. Sicheritz-Ponten, C. J. Noel, J. B. Dacks, P. G. Foster, C. Simillion, Y. Van de Peer, D. Miranda-Saavedra, G. J. Barton, G. D. Westrop, S. Muller, D. Dessi, P. L. Fiori, Q. Ren, I. Paulsen, H. Zhang, F. D. Bastida-Corcuera, A. Simoes-Barbosa, M. T. Brown, R. D. Hayes, M. Mukherjee, C. Y. Okumura, R. Schneider, A. J. Smith, S. Vanacova, M. Villalvazo, B. J. Haas, M. Perteza, T. V. Feldblyum, T. R. Utterback, C. L. Shu, K. Osoegawa, P. J. de Jong, I. Hrdy, L. Horvathova, Z. Zubacova, P. Dolezal, S. B. Malik, J. M. Logsdon, Jr., K. Henze, A. Gupta, C. C. Wang, R. L. Dunne, J. A. Upcroft, P. Upcroft, O. White, S. L. Salzberg, P. Tang, C. H. Chiu, Y. S. Lee, T. M. Embley, G. H. Coombs, J. C. Mottram, J. Tachezy, C. M. Fraser-Liggett and P. J. Johnson (2007). "Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*." Science 315(5809): 207-212.
- Carter, J. E. and K. C. Whithaus (2008). "Neonatal respiratory tract involvement by *Trichomonas vaginalis*: a case report and review of the literature." Am J Trop Med Hyg 78(1): 17-19.

- Crucitti, T., V. Jespers, C. Mulenga, S. Khondowe, J. Vandepitte and A. Buve (2011). "Non-sexual transmission of *Trichomonas vaginalis* in adolescent girls attending school in Ndola, Zambia." PLoS One 6(1): e16310.
- Cuevas, I. C., J. J. Cazzulo and D. O. Sanchez (2003). "gp63 homologues in *Trypanosoma cruzi*: surface antigens with metalloprotease activity and a possible role in host cell infection." Infect Immun 71(10): 5739-5749.
- Dolezal, P., O. Smid, P. Rada, Z. Zubacova, D. Bursac, R. Sutak, J. Nebesarova, T. Lithgow and J. Tachezy (2005). "Giardia mitochondria and trichomonad hydrogenosomes share a common mode of protein targeting." Proc Natl Acad Sci U S A 102(31): 10924-10929.
- Dowse, T. J., K. Koussis, M. J. Blackman and D. Soldati-Favre (2008). "Roles of proteases during invasion and egress by *Plasmodium* and *Toxoplasma*." Subcell Biochem 47: 121-139.
- Fair, W. R., J. Couch and N. Wehner (1976). "Prostatic antibacterial factor. Identity and significance." Urology 7(2): 169-177.
- Figueroa-Angulo, E. E., F. J. Rendon-Gandarilla, J. Puente-Rivera, J. S. Calla-Choque, R. E. Cardenas-Guerra, J. Ortega-Lopez, L. I. Quintas-Granados, M. E. Alvarez-Sanchez and R. Arroyo (2012). "The effects of environmental factors on the virulence of *Trichomonas vaginalis*." Microbes Infect 14(15): 1411-1427.
- Gardner, W. A., Jr., D. E. Culberson and B. D. Bennett (1986). "*Trichomonas vaginalis* in the prostate gland." Arch Pathol Lab Med 110(5): 430-432.
- Gelbart, S. M., J. L. Thomason, P. J. Osypowski, A. V. Kellett, J. A. James and F. F. Broekhuizen (1990). "Growth of *Trichomonas vaginalis* in commercial culture media." J Clin Microbiol 28(5): 962-964.
- Harp, D. F. and I. Chowdhury (2011). "Trichomoniasis: evaluation to execution." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 157(1): 3-9.
- Hernandez-Gutierrez, R., J. Ortega-Lopez and R. Arroyo (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 Suppl: 696-698.
- Hernandez-Romano, P., R. Hernandez, R. Arroyo, J. F. Alderete and I. Lopez-Villasenor (2010). "Identification and characterization of a surface-associated, subtilisin-like serine protease in *Trichomonas vaginalis*." Parasitology 137(11): 1621-1635.
- Horvathova, L., L. Safarikova, M. Basler, I. Hrdy, N. B. Campo, J. W. Shin, K. Y. Huang, P. J. Huang, R. Lin, P. Tang and J. Tachezy (2012). "Transcriptomic identification of iron-regulated and iron-independent gene copies within the heavily duplicated *Trichomonas vaginalis* genome." Genome Biol Evol 4(10): 1017-1029.
- Hu, X. and C. Beeton (2010). "Detection of functional matrix metalloproteinases by zymography." J Vis Exp(45).

- Huang, K. Y., P. J. Huang, F. M. Ku, R. Lin, J. F. Alderete and P. Tang (2012). "Comparative transcriptomic and proteomic analyses of *Trichomonas vaginalis* following adherence to fibronectin." Infect Immun 80(11): 3900-3911.
- Isnard, A., M. T. Shio and M. Olivier (2012). "Impact of *Leishmania* metalloprotease GP63 on macrophage signaling." Front Cell Infect Microbiol 2: 72.
- Krieger, J. N. (1995). "Trichomoniasis in men: old issues and new data." Sex Transm Dis 22(2): 83-96.
- Krieger, J. N. and M. F. Rein (1982). "Canine prostatic secretions kill *Trichomonas vaginalis*." Infect Immun 37(1): 77-81.
- Krieger, J. N. and M. F. Rein (1982). "Zinc sensitivity of *Trichomonas vaginalis*: in vitro studies and clinical implications." J Infect Dis 146(3): 341-345.
- Kulkarni, M. M., E. A. Jones, W. R. McMaster and B. S. McGwire (2008). "Fibronectin binding and proteolytic degradation by *Leishmania* and effects on macrophage activation." Infect Immun 76(4): 1738-1747.
- Kulkarni, M. M., W. R. McMaster, E. Kamysz, W. Kamysz, D. M. Engman and B. S. McGwire (2006). "The major surface-metalloprotease of the parasitic protozoan, *Leishmania*, protects against antimicrobial peptide-induced apoptotic killing." Mol Microbiol 62(5): 1484-1497.
- Lehker, M. W., R. Arroyo and J. F. Alderete (1991). "The regulation by iron of the synthesis of adhesins and cytoadherence levels in the protozoan *Trichomonas vaginalis*." J Exp Med 174(2): 311-318.
- Lehker, M. W. and D. Sweeney (1999). "Trichomonad invasion of the mucous layer requires adhesins, mucinases, and motility." Sex Transm Infect 75(4): 231-238.
- Lopez-Otin, C. and C. M. Overall (2002). "Protease degradomics: a new challenge for proteomics." Nat Rev Mol Cell Biol 3(7): 509-519.
- Ma, L., Q. Meng, W. Cheng, Y. Sung, P. Tang, S. Hu and J. Yu (2011). "Involvement of the GP63 protease in infection of *Trichomonas vaginalis*." Parasitol Res 109(1): 71-79.
- Malik, S. B., A. W. Pightling, L. M. Stefaniak, A. M. Schurko and J. M. Logsdon, Jr. (2008). "An expanded inventory of conserved meiotic genes provides evidence for sex in *Trichomonas vaginalis*." PLoS One 3(8): e2879.
- Muller, M., M. Mentel, J. J. van Hellemond, K. Henze, C. Woehle, S. B. Gould, R. Y. Yu, M. van der Giezen, A. G. Tielens and W. F. Martin (2012). "Biochemistry and evolution of anaerobic energy metabolism in eukaryotes." Microbiol Mol Biol Rev 76(2): 444-495.
- Nagase, H. (2001). "Metalloproteases." Curr Protoc Protein Sci Chapter 21: Unit 21 24.
- Neale, K. A. and J. F. Alderete (1990). "Analysis of the proteinases of representative *Trichomonas vaginalis* isolates." Infect Immun 58(1): 157-162.
- Netea, M. G., J. W. Van der Meer and B. J. Kullberg (2004). "Toll-like receptors as an escape mechanism from the host defense." Trends Microbiol 12(11): 484-488.

- Olivier, M., V. D. Atayde, A. Isnard, K. Hassani and M. T. Shio (2012). "Leishmania virulence factors: focus on the metalloprotease GP63." Microbes Infect 14(15): 1377-1389.
- Ong, S. J., H. M. Hsu, H. W. Liu, C. H. Chu and J. H. Tai (2006). "Multifarious transcriptional regulation of adhesion protein gene ap65-1 by a novel Myb1 protein in the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*." Eukaryot Cell 5(2): 391-399.
- Overall, C. M. and C. P. Blobel (2007). "In search of partners: linking extracellular proteases to substrates." Nat Rev Mol Cell Biol 8(3): 245-257.
- Peer, W. A. (2011). "The role of multifunctional M1 metalloproteinases in cell cycle progression." Ann Bot 107(7): 1171-1181.
- Petrin, D., K. Delgaty, R. Bhatt and G. Garber (1998). "Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*." Clin Microbiol Rev 11(2): 300-317.
- Pina-Vazquez, C., M. Reyes-Lopez, G. Ortiz-Estrada, M. de la Garza and J. Serrano-Luna (2012). "Host-parasite interaction: parasite-derived and -induced proteases that degrade human extracellular matrix." J Parasitol Res 2012: 748206.
- Prasad, A. S. (2009). "Impact of the discovery of human zinc deficiency on health." J Am Coll Nutr 28(3): 257-265.
- Quintas-Granados, L. I., J. L. Villalpando, L. I. Vazquez-Carrillo, R. Arroyo, G. Mendoza-Hernandez and M. E. Alvarez-Sanchez (2013). "TvMP50 is an immunogenic metalloproteinase during male trichomoniasis." Mol Cell Proteomics 12(7): 1953-1964.
- Ramani, D., J. P. De Bandt and L. Cynober (2013). "Aliphatic polyamines in physiology and diseases." Clin Nutr.
- Ramon-Luing, L. A., F. J. Rendon-Gandarilla, R. E. Cardenas-Guerra, N. A. Rodriguez-Cabrera, J. Ortega-Lopez, L. Avila-Gonzalez, C. Angel-Ortiz, C. N. Herrera-Sanchez, M. Mendoza-Garcia and R. Arroyo (2010). "Immunoproteomics of the active degradome to identify biomarkers for *Trichomonas vaginalis*." Proteomics 10(3): 435-444.
- Ramon-Luing Lde, L., F. J. Rendon-Gandarilla, J. Puente-Rivera, L. Avila-Gonzalez and R. Arroyo (2011). "Identification and characterization of the immunogenic cytotoxic TvCP39 proteinase gene of *Trichomonas vaginalis*." Int J Biochem Cell Biol 43(10): 1500-1511.
- Rendon-Gandarilla, F. J., L. Ramon-Luing Lde, J. Ortega-Lopez, I. Rosa de Andrade, M. Benchimol and R. Arroyo (2013). "The TvLEGU-1, a legumain-like cysteine proteinase, plays a key role in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence." Biomed Res Int 2013: 561979.
- Saper, R. B. and R. Rash (2009). "Zinc: an essential micronutrient." Am Fam Physician 79(9): 768-772.
- Saravia, N. G., B. Escorcia, Y. Osorio, L. Valderrama, D. Brooks, L. Arteaga, G. Coombs, J. Mottram and B. L. Travi (2006). "Pathogenicity and protective immunogenicity of cysteine proteinase-deficient mutants of *Leishmania mexicana* in non-murine models." Vaccine 24(19): 4247-4259.

- Schwebke, J. R. and D. Burgess (2004). "Trichomoniasis." Clin Microbiol Rev 17(4): 794-803, table of contents.
- Sehgal, R., K. Goyal and A. Sehgal (2012). "Trichomoniasis and lactoferrin: future prospects." Infect Dis Obstet Gynecol 2012: 536037.
- Teixeira, J. E., A. Sateriale, K. E. Bessoff and C. D. Huston (2012). "Control of *Entamoeba histolytica* adherence involves metallosurface protease 1, an M8 family surface metalloprotease with homology to leishmanolysin." Infect Immun 80(6): 2165-2176.
- Torres-Romero, J. C. and R. Arroyo (2009). "Responsiveness of *Trichomonas vaginalis* to iron concentrations: evidence for a post-transcriptional iron regulation by an IRE/IRP-like system." Infect Genet Evol 9(6): 1065-1074.
- Tsai, C. D., H. W. Liu and J. H. Tai (2002). "Characterization of an iron-responsive promoter in the protozoan pathogen *Trichomonas vaginalis*." J Biol Chem 277(7): 5153-5162.
- Ugalde, A. P., G. R. Ordonez, P. M. Quiros, X. S. Puente and C. Lopez-Otin (2010). "Metalloproteases and the degradome." Methods Mol Biol 622: 3-29.
- Urban, S. (2013). "Mechanisms and cellular functions of intramembrane proteases." Biochim Biophys Acta 1828(12): 2797-2800.
- Vazquez-Carrillo, L. I., L. I. Q. Granados, R. Arroyo, G. M. Hernández, A. G. Robles, B. I. C. Gamez and M. E. A. Sánchez (2011). The effect of Zn<sup>2+</sup> on prostatic cell cytotoxicity caused by *Trichomonas vaginalis*.
- Yarlett, N., M. P. Martinez, B. Goldberg, D. L. Kramer and C. W. Porter (2000). "Dependence of *Trichomonas vaginalis* upon polyamine backconversion." Microbiology 146 ( Pt 10): 2715-2722.

*Apéndice*

---

## 7. Apéndice.

Tabla de las 123 metaloproteasas de *T. vaginalis*.

	Proteins names	Genes names	Sequence length (aa)	Cofactor	Ligand	Biological process	Molecular function	Celular component	pI	MW (kDa)
M-	Clan M-, family M49, dipeptidylpeptidase III-like metallopeptidase	TVAG_106750	679	-	-	Proteolysis	Dipeptidyl-peptidase activity	Cytoplasm	5.69	75.57
	Clan M-, family M49, dipeptidylpeptidase III-like metallopeptidase	TVAG_032280	534	-	-	Proteolysis	Dipeptidyl-peptidase activity	Cytoplasm	5.6	59.03
MA	Clan MA, family M1, aminopeptidase N-like metallopeptidase	TVAG_336080	620	-	-	Proteolysis	Aminopeptidase activity, Metallopeptidase activity, Zinc ion binding	-	5.51	71.97
	Clan MA, family M1, aminopeptidase N-like metallopeptidase	TVAG_311790	833	-	-	Proteolysis	Aminopeptidase activity, Metallopeptidase activity, Zinc ion binding	-	5.39	96.1
	Clan MA, family M1, aminopeptidase N-like metallopeptidase	TVAG_008880	832	-	-	Proteolysis	Aminopeptidase activity, Metallopeptidase activity, Zinc ion binding	-	5.36	94.79
	Clan MA, family M3, oligopeptidase A-like metallopeptidase	TVAG_477180	690	Binds 1 zinc ion	Metal binding, Zinc	Proteolysis	Metal ion binding, Metalloendopeptidase activity	-	5.41	80.15
	Clan MA, family M41, FtsH endopeptidase-like metallopeptidase	TVAG_243780	533	-	ATP binding, Nucleotide binding	Protein catabolic process, Proteolysis	ATP binding, Metalloendopeptidase activity, Nucleoside triphosphatase activity	Membrane	5.01	58.86
	Clan MA, family M48, Ste24 endopeptidase-like metallopeptidase	TVAG_381360	407	Binds 1 zinc ion per subunit	Zinc	Proteolysis	Metalloendopeptidase activity	Membrane	6.47	47.02
	Clan MA, family M48, Ste24 endopeptidase-like metallopeptidase	TVAG_077490	410	Binds 1 zinc ion per subunit	Zinc	Proteolysis	Metalloendopeptidase activity	Membrane	7.7	47.77
	Clan MA, family M48, Ste24 endopeptidase-like metallopeptidase	TVAG_024200	413	Binds 1 zinc ion per subunit	Zinc	Proteolysis	Metalloendopeptidase activity	Membrane	8.37	47.28
	Clan MA, family M8, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_595020	539	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	5.42	61.37
	Clan MA, family M8, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_579240	292	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	5.35	33.33
	Clan MA, family M8, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_562500	713	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	5.86	78.37
	Clan MA, family M8, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_550840	368	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	6.67	41.74
	Clan MA, family M8, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_494490	673	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	6.12	76.45
	Clan MA, family M8, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_493930	674	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	6.04	75.45
	Clan MA, family M8, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_493860	698	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	8.21	78.41
	Clan MA, family M8, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_454520	399	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	5.41	45.87
	Clan MA, family M8, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_453650	604	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	5.55	68.65
	Clan MA, family M8, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_437440	437	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	6.47	50.82
	Clan MA, family M8, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_424820	678	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	6.42	75.34
	Clan MA, family M8, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_407980	570	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	5.19	74.86
	Clan MA, family M8, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_400860	589	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	5.39	66.88

Clan MA, family MB, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_399920	651	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	5.52	73.4
Clan MA, family MB, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_391100	628	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	5.07	70.18
Clan MA, family MB, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_390980	591	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	5.46	66.67
Clan MA, family MB, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_388230	624	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	7.28	72.11
Clan MA, family MB, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_387200	516	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	4.81	58.57
Clan MA, family MB, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_369300	628	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	5.78	72.04
Clan MA, family MB, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_369290	499	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	5.09	56.83
Clan MA, family MB, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_369280	547	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	5.34	62.6
Clan MA, family MB, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_367130	630	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	6.45	70.64
Clan MA, family MB, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_355630	572	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	8.89	75.1
Clan MA, family MB, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_305870	595	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	5.17	66.63
Clan MA, family MB, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_295740	635	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	6.74	71.86
Clan MA, family MB, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_271800	301	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	6.33	34.71
Clan MA, family MB, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_271790	602	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	4.95	69.06
Clan MA, family MB, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_271780	408	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	5.33	46.52
Clan MA, family MB, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_256110	580	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	5.48	65.33
Clan MA, family MB, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_226600	658	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	4.84	73.9
Clan MA, family MB, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_226590	637	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	6.63	71.16
Clan MA, family MB, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_219460	616	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	5.48	70.21
Clan MA, family MB, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_216800	505	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	5.25	57.56
Clan MA, family MB, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_216430	622	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	5.07	72.16
Clan MA, family MB, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_206210	622	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	5.74	70.48
Clan MA, family MB, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_195440	566	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	6.22	63.51
Clan MA, family MB, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_194330	679	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	8.64	75.95

	Cian MA, family M8, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_190000	607	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	5.2	68.67
	Cian MA, family M8, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_160010	587	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	8.2	67.32
	Cian MA, family M8, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_156760	622	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	7.54	69.83
	Cian MA, family M8, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_106650	617	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	5.01	68.34
	Cian MA, family M8, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_104240	651	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	6.01	72.59
	Cian MA, family M8, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_074250	697	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	6.16	80.43
	Cian MA, family M8, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_071360	534	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	5.73	61.51
	Cian MA, family M8, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_064350	639	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	5.99	71.5
	Cian MA, family M8, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_064340	592	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	6.97	67.02
	Cian MA, family M8, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_064330	698	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	8.39	78.49
	Cian MA, family M8, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_053300	359	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	5.58	41.33
	Cian MA, family M8, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_032450	624	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	5.42	69.43
	Cian MA, family M8, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_032440	626	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	7.15	70.28
	Cian MA, family M8, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_030520	435	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	4.92	49.91
	Cian MA, family M8, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_025060	568	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	5.57	65.19
	Cian MA, family M8, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_020900	252	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	5.22	28.26
	Cian MA, family M8, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_018910	455	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	5.87	52.16
	Cian MA, family M8, leishmanolysin-like metallopeptidase	TVAG_000880	429	-	-	Cell adhesion, Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	Membrane	4.79	48.27
MC	Cian MC, family M14, Zinc carboxypeptidase-like Metallopeptidase	TVAG_483870	578	-	-	Proteolysis	Metalloprotease activity, Zinc ion binding	-	7.02	65.64
	Cian MC, family M14, Zinc carboxypeptidase-like Metallopeptidase	TVAG_457210	540	-	-	Proteolysis	Metalloprotease activity, Zinc ion binding	-	9.37	62.54
	Cian MC, family M14, Zinc carboxypeptidase-like Metallopeptidase	TVAG_453960	587	-	-	Proteolysis	Metalloprotease activity, Zinc ion binding	-	5.34	67.31
	Cian MC, family M14, Zinc carboxypeptidase-like Metallopeptidase	TVAG_253610	581	-	-	Proteolysis	Metalloprotease activity, Zinc ion binding	-	6.56	66.62
	Cian MC, family M14, Zinc carboxypeptidase-like Metallopeptidase	TVAG_247150	579	-	-	Proteolysis	Metalloprotease activity, Zinc ion binding	-	6.41	65.74
	Cian MC, family M14, Zinc carboxypeptidase-like Metallopeptidase	TVAG_075740	575	-	-	Proteolysis	Metalloprotease activity, Zinc ion binding	-	5.88	66.16

	Clan MC, family M14, Zinc carboxypeptidase-like Metallopeptidase	TVAG_045700	600	-	-	Proteolysis	Metalloprotease activity, Zinc ion binding	-	9.23	68.36
	Clan MC, family M14, Zinc carboxypeptidase-like Metallopeptidase	TVAG_040480	525	-	-	Proteolysis	Metalloprotease activity, Zinc ion binding	-	9.31	60.56
	Clan MC, family M14, Zinc carboxypeptidase-like Metallopeptidase	TVAG_027310	576	-	-	Proteolysis	Metalloprotease activity, Zinc ion binding	-	6.47	65.07
	Clan MC, family M14, Zinc carboxypeptidase-like Metallopeptidase	TVAG_021370	586	-	-	Proteolysis	Metalloprotease activity, Zinc ion binding	-	4.94	67.94
	Clan MC, family M14, Zinc carboxypeptidase-like Metallopeptidase	TVAG_004620	484	-	-	Proteolysis	Metalloprotease activity, Zinc ion binding	-	9.01	55.25
ME	Clan ME, family M16, insulinase-like metallopeptidase	TVAG_484640	987	-	-	Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	-	6.22	113.6
	Clan ME, family M16, insulinase-like metallopeptidase	TVAG_371040	923	-	-	Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	-	5.61	108.83
	Clan ME, family M16, insulinase-like metallopeptidase	TVAG_317610	962	-	-	Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	-	5.54	110.66
	Clan ME, family M16, insulinase-like metallopeptidase	TVAG_233350	419	-	-	Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	-	5.83	46.84
	Clan ME, family M16, insulinase-like metallopeptidase	TVAG_151080	998	-	-	Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	-	4.97	114.17
	Clan ME, family M16, insulinase-like metallopeptidase	TVAG_119710	418	-	-	Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	-	8.94	45.93
	Clan ME, family M16, insulinase-like metallopeptidase	TVAG_087590	954	-	-	Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	-	5.3	108.52
	Clan ME, family M16, insulinase-like metallopeptidase	TVAG_016860	986	-	-	Proteolysis	Metalloendopeptidase activity, Zinc ion binding	-	6.46	113.06
MG	Clan MG, family M24, aminopeptidase P-like metallopeptidase	TVAG_476160	414	Binds 2 cobalt ions per subunit	Cobalt, Metal binding	Cellular process, Proteolysis	Aminopeptidase activity, Metal ion binding, Metalloexopeptidase activity	-	5.86	46.14
	Clan MG, family M24, aminopeptidase P-like metallopeptidase	TVAG_437930	458	Binds 2 manganese ions per subunit	Manganese, Metal-binding	Cellular process	Aminopeptidase activity, Manganese ion binding	-	5.46	52.37
	Clan MG, family M24, aminopeptidase P-like metallopeptidase	TVAG_410220	413	Binds 2 cobalt ions per subunit	Cobalt, Metal binding	Cellular process, Proteolysis	Aminopeptidase activity, Metal ion binding, Metalloexopeptidase activity	-	5.51	45.92
	Clan MG, family M24, aminopeptidase P-like metallopeptidase	mp50	439	Binds 2 manganese ions per subunit	Manganese, Metal-binding	Cellular process	Aminopeptidase activity, Manganese ion binding	-	5.34	49.99
	Clan MG, family M24, aminopeptidase P-like metallopeptidase	TVAG_386080	458	Binds 2 manganese ions per subunit	Manganese, Metal-binding	Cellular process	Aminopeptidase activity, Manganese ion binding	-	5.7	52.17
	Clan MG, family M24, aminopeptidase P-like metallopeptidase	TVAG_321430	447	Binds 2 manganese ions per subunit	Manganese, Metal-binding	Cellular process	Aminopeptidase activity, Manganese ion binding	-	5.28	50.7
	Clan MG, family M24, aminopeptidase P-like metallopeptidase	TVAG_317020	416	Binds 2 cobalt ions per subunit	Cobalt, Metal binding	Cellular process, Proteolysis	Aminopeptidase activity, Metal ion binding, Metalloexopeptidase activity	-	6.1	46.06
	Clan MG, family M24, aminopeptidase P-like metallopeptidase	TVAG_255940	439	Binds 2 manganese ions per subunit	Manganese, Metal-binding	Cellular process	Aminopeptidase activity, Manganese ion binding	-	4.99	48.88
	Clan MG, family M24, aminopeptidase P-like metallopeptidase	TVAG_227590	383	Binds 2 manganese ions per subunit	Manganese, Metal-binding	Cellular process	Aminopeptidase activity, Manganese ion binding	-	6.67	43.13
	Clan MG, family M24, aminopeptidase P-like metallopeptidase	TVAG_212800	967	-	-	Cellular process	Aminopeptidase activity	-	5.22	109.21
	Clan MG, family M24, aminopeptidase P-like metallopeptidase	TVAG_190580	411	Binds 2 cobalt ions per subunit	Cobalt, Metal binding	Cellular process, Proteolysis	Aminopeptidase activity, Metal ion binding, Metalloexopeptidase activity	-	5.78	45.75

	Clan MG, family M24, aminopeptidase P-like metallopeptidase	TVAG_040850	438	Binds 2 manganese ions per subunit	Manganese, Metal-binding	Cellular process	Aminopeptidase activity, Manganese ion binding	-	4.63	50.07
	Clan MG, family M24, aminopeptidase P-like metallopeptidase	TVAG_013490	383	Binds 2 manganese ions per subunit	Manganese, Metal-binding	Cellular process	Aminopeptidase activity, Manganese ion binding	-	7.6	43.43
MH	Clan MH, family M18, aspartyl aminopeptidase-like metallopeptidase	TVAG_490070	412	-	Metal binding, Zinc	Proteolysis	Aminopeptidase activity, Metallopeptidase activity, Zinc ion binding	-	5.96	45.96
	Clan MH, family M18, aspartyl aminopeptidase-like metallopeptidase	TVAG_467260	421	-	Metal binding, Zinc	Proteolysis	Aminopeptidase activity, Metallopeptidase activity, Zinc ion binding	-	5.5	47.07
	Clan MH, family M18, aspartyl aminopeptidase-like metallopeptidase	TVAG_392410	403	-	Metal binding, Zinc	Proteolysis	Aminopeptidase activity, Metallopeptidase activity, Zinc ion binding	-	5.74	45.05
	Clan MH, family M18, aspartyl aminopeptidase-like metallopeptidase	TVAG_161610	422	-	Metal binding, Zinc	Proteolysis	Aminopeptidase activity, Metallopeptidase activity, Zinc ion binding	-	6.38	47.07
	Clan MH, family M18, aspartyl aminopeptidase-like metallopeptidase	TVAG_115460	402	-	Metal binding, Zinc	Proteolysis	Aminopeptidase activity, Metallopeptidase activity, Zinc ion binding	-	5.41	44.75
	Clan MH, family M18, aspartyl aminopeptidase-like metallopeptidase	TVAG_025960	492	-	Metal binding, Zinc	Proteolysis	Aminopeptidase activity, Metallopeptidase activity, Zinc ion binding	-	6.39	54.77
	Clan MH, family M20, peptidase T-like metallopeptidase	TVAG_475290	398	-	-	Lysine biosynthetic process	Metal ion binding, Succinyl-diaminopimelate desuccinylase activity	-	5.03	45.05
	Clan MH, family M20, peptidase T-like metallopeptidase	TVAG_433790	529	-	-	Proteolysis	Hydrolase activity	-	5.61	59.52
	Clan MH, family M20, peptidase T-like metallopeptidase	TVAG_385820	511	-	-	Proteolysis	Hydrolase activity	-	5.37	56.71
	Clan MH, family M20, peptidase T-like metallopeptidase	TVAG_379940	426	-	-	Peptide metabolic process, Proteolysis	Metallopeptidase activity, Tripeptide aminopeptidase activity, Zinc ion binding	Cytoplasm	5.2	47.39
	Clan MH, family M20, peptidase T-like metallopeptidase	TVAG_370490	474	-	-	-	Hydrolase activity	-	4.98	51.6
	Clan MH, family M20, peptidase T-like metallopeptidase	TVAG_224980	474	-	-	-	-	-	5.03	51.37
	Clan MH, family M20, peptidase T-like metallopeptidase	TVAG_090090	493	-	-	Proteolysis	Hydrolase activity	-	5.31	54.57
	Clan MH, family M20, peptidase T-like metallopeptidase	TVAG_071630	574	-	-	Proteolysis	Hydrolase activity	-	6.41	65.14
	Clan MH, family M20, peptidase T-like metallopeptidase	TVAG_056190	495	-	-	Proteolysis	Hydrolase activity	-	5.65	54.53
	Clan MH, family M20, peptidase T-like metallopeptidase	TVAG_050870	372	-	-	-	Hydrolase activity	-	5.55	41.88
	Clan MH, family M28, aminopeptidase S-like metallopeptidase	TVAG_470700	748	-	-	Proteolysis	Aminopeptidase activity	-	8.36	84.76
MK	Clan MK, family M22, sialoglycoprotein endopeptidase-like metallopeptidase	TVAG_185400	325	-	-	Proteolysis	Metalloendopeptidase activity	-	6.26	35.56
MP	Clan MP, family M67, Poh1-like metallopeptidase	TVAG_472140	296	-	-	-	-	-	4.94	32.97
	Clan MP, family M67, Poh1-like metallopeptidase	TVAG_469140	305	-	-	-	-	-	5.8	34.65
	Clan MP, family M67, Poh1-like metallopeptidase	TVAG_454400	301	-	-	-	-	-	8.03	33.73
	Clan MP, family M67, Poh1-like metallopeptidase	TVAG_159580	300	-	-	-	-	-	6.21	33.54
	Clan MP, family M67, Poh1-like metallopeptidase	TVAG_124160	301	-	-	-	-	-	5.16	33.83
	Clan MP, family M67, Poh1-like metallopeptidase	TVAG_077600	300	-	-	-	-	-	5.48	34.1
	Clan MP, family M67, Poh1-like metallopeptidase	TVAG_015750	311	-	-	-	-	-	4.89	34.93

### **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 %

### **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

β- mercaptoetanol 5% 50 µl

azul de bromofenol 50 µl

(stock 10 mg/ml)

Agua destilada 400 µl

Agua destilada (aforar a 100 ml)

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

SDS-amortiguador 2x 400 µl

β- mercaptoetanol 5% 50 µl

azul de bromofenol 50 µl

(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 glacial 100 ml

Agua destilada 400 ml

Azul de Coomassie 0.5 g

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

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

Metanol 165 ml

Acido acético glacial 50 ml

Agua destilada 785 ml

Almacenar a temperatura ambiente.

### *Actividades realizadas durante la maestría 2011-2013*

***Participante en el Seminario de Investigación Científica y Tecnológica en el X Aniversario de la UACM.***

Del 6 al 8 de abril de 2011.

***Participante en la presentación de proyectos de investigación de la UACM.***

Del 18 de octubre al 8 de noviembre de 2011 en los planteles de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

***4° Diplomado en Ciencias Genómicas impartido por el posgrado en Ciencias Genómicas de la UACM.***

Con duración de septiembre de 2010 a junio de 2011.

***Curso Teórico-Práctico "La tipificación de microorganismos mediante Electroforesis de Campos Pulsantes en minigeles (miniECP)".***

Del 30 de julio al 3 de agosto de 2012, con duración de 40 horas.

***Curso de Farmacogenómica.***

Realizado el 19 de abril de 2012, en las instalaciones del INMEGEN.

***Capacitación en el manejo del fotodocumentador Pharos FX Plus para la adquisición de imágenes y del software Quantity One para el análisis de imágenes realizado en la Universidad de la Ciudad de México.***

México, D.F. el 05 de febrero de 2013. Duración 4 horas.

***Capacitación en el manejo del fotodocumentador ChemiDoc MP realizado en la Universidad de la Ciudad de México, en el laboratorio #1.***

México, D.F. el 22 de febrero de 2013.

***5° Diplomado en Ciencias Genómicas impartido por el posgrado en Ciencias Genómicas de la UACM.***

Con duración de septiembre de 2012 a junio de 2013.

***XXIX Congreso Nacional de Bioquímica del 11 al 17 de Noviembre de 2012 en Oaxaca, Oax.***

Asistencia y participación como co-autor del trabajo: "Identificación por LC/MS/MS de proteínas de *T. vaginalis* inmunoreconocidas reconocidas por el anticuerpo  $\alpha$ -TvMP50".

***Ingreso a la SMB-Sociedad Mexicana de Bioquímica A.C., como miembro estudiante.***

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.

### **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 µl de suero fetal bovino a 9800 µl de PBS 1x pH 7.0

### **Preparación de gelatina al 9%**

0.0324 g en 10 ml de agua destilada incuba 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

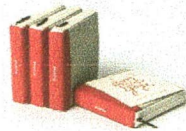
H<sub>2</sub>O destilada    cbp 1000 ml

### **Amortiguador de transferencia**

Trizma-base 25 mM    3.03g

Glicina    190 mM    14.25 g

Pedro Ahumada



**TESIS URGENTES**

REP. DE CUBA No. 99 DESP. 23-A  
CENTRO HISTORICO MEXICO, D.F.

Tel. 55-12-84-69

Part. 26-19-07-42

PRESUPUESTOS DE 9:30 A 7:00 P.M.  
SÁBADOS DE 9:30 A.M. A 3:00 P.M.

[impresosahumada@hotmail.com](mailto:impresosahumada@hotmail.com)



## *Jurado evaluador*

---

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 27 de enero de 2014, en la Ciudad de México D.F. para optar al Grado de Maestro en Ciencias Genómicas, al Q.F.B. Carlos Alberto Galicia Silva.

Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez

---

Dra. Minerva Camacho Nuez

---

Dr. José de Jesús Olivares Trejo

---

Dra. Rosalía Lira Carmona

---

Dra. Mavil López Casamichana

---