

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

Maestría en Ciencias Genómicas

“Determinación de la posible secuencia nucleotídica
del elemento ERE del RNAm de *tvcp39* que participa en
la interacción con TveIF-5A en *Trichomonas vaginalis*”

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA

Q.B.P YOLANDA ELIANA MANRÍQUEZ TREVIÑO

DIRECTORA DE TESIS

DRA. MARÍA ELIZBETH ÁLVAREZ SÁNCHEZ

MÉXICO, D.F JUNIO, 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[©]

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.

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTORA

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

ASESORES

Dra. Minerva Camacho Nuez
Profesora-Investigadora
Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga
Profesora-Investigadora
Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dra. Laura Itzel Quintas Granados
Asesora Académica
Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

El presente trabajo se realizó en el laboratorio N° 1 del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, bajo la dirección de la Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez y con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) para la beca del estudiante No. 404797, y con el financiamiento del proyecto No. 83808.

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco A Dios, por haberme guiado a lo largo de este proceso. Por haberme puesto en mi camino a excelentes personas como las que aquí conocí y haberme dado la fortaleza para seguir adelante en aquellos momentos de debilidad.

A la Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, por hacer posible la realización de este proyecto. Además, de agradecer su paciencia, tiempo y dedicación que tuvo para que esto saliera de manera exitosa.

A mis asesoras de tesis Dra. Minerva, Dra. Elisa y Dra. Itzel y a mis lectores M.C Eduardo Flores, Dr. Javier Barrios, Dra. Mavil López por su apoyo, asesoría, puntos de vista y disponibilidad de tiempo.

A mis padres Rubén y Yola, a mi tía Elsa y a mi hermana Mónica por su amor y apoyo incondicional, por sus consejos, sus palabras de aliento, porque me impulsan a ser mejor cada día. Sin ustedes no hubiera podido lograr nada de esto. Les estoy eternamente agradecida!

A mi novio hermoso por el apoyo brindado, por aguantarme siempre. Por soportar mis ratos de histeria y motivarme a seguir adelante a pesar de los obstáculos que se me presentaron. Gracias por ser un excelente novio y amigo. Te adoro!

A mis amigas: Alma, Fer, Guyus, Male y Lucy por ser parte de mi vida, de mis momentos tristes y alegres, por apoyarme, por nunca dejarme caer, por estar siempre ahí.

A mis amigos Helios y José Luis por haber sido excelentes compañeros y amigos, por haberme tenido la paciencia necesaria, por motivarme a seguir

adelante en los momentos de desesperación. Gracias por todas sus enseñanzas y consejos.

A mis compañeros de trabajo: Dra. Quintas, Lauriñis, José Luis, Almita, Frankie y Jacquie, gracias por su ayuda y consejos, más que un grupo de trabajo se convirtieron en mi familia, gracias por su apoyo, comprensión y sobre todo su amistad. Los quiero mucho a todos!

A mis compañeros del posgrado: Dra. López, Kenji, Alichó, Olguita, Elbita, Juca, David, Hugo, Cecy, Karla, Naye, Karen, Edgar, Mariana gracias por su amistad!

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Acido Desoxirribonucleico
AP	Proteína adhesina
ATP	Adenosin trifosfato
CHAPS	3-[(3 colamidopropil)-(dimetilamonio) -1- propano sulfonato)
<i>cox-2</i>	gen <i>ciclooxigenasa-2</i>
CPs	Cisteína proteinasas
CTP	Citosin trifosfato
DAB	1,4 diamino-2 butanona
DEPC	Dietilpirocarbonato
DHS	Deoxihipusina sintasa
DOHH	Deoxihipusina hidroxilasa
DTT	Ditiotreitol
eIF-5A	Factor de Inicio de Traducción Eucariótico 5A
ERE	Elemento de respuesta a eIF-5A
EMSA	Ensayo de retardo
GST	Glutation S-Transferasa
GTP	Guanosín trifosfato
HeLA	Línea celular humana de cáncer cervical
IAA	Iodoacetamida
IPTG	Isopropil β -D- Tiogalactopiranósido
IRE	Elemento de respuesta a hierro
IRP	Proteína reguladora de hierro
kDa	Kilodaltones
LB	Medio Luria
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimoles
PBS	Fosfato amortiguador salino
pH	Potencial de Hidrógeno
RNA	Acido Ribonucleíco
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundos

T.A	Temperatura ambiente
TCA	Ácido Tricloroacético
TE	Tris-Cl y EDTA
TvDHS	Deoxihipusina sintetasa de <i>Trichomonas vaginalis</i>
TYM	Medio de cultivo triptona-extracto de levadura-maltosa
O.D.	Densidad Óptica
ODC	Ornitina Descarboxilasa
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
UTR	Región no Traducida
VECs	Células del Epitelio Vaginal
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
µg	Microgramos
µl	Microlitro
µm	Micrómetro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Microscopía de barrido de *T. vaginalis*.

Figura 2. Ciclo de vida de *T. vaginalis*.

Figura 3. Análisis del ERE del 3'UTR de *tcvp39* y sus mutantes.

Figura 4. Inducción de la proteína TveIF-5Ar.

Figura 5. Cromatograma de la purificación de la proteína TveIF-5Ar.

Figura 6. Análisis de la pureza de la proteína TveIF-5Ar.

Figura 7. Inducción de la proteína TvDHSr.

Figura 8. Cromatograma de la purificación de la proteína TvDHSr.

Figura 9. Análisis de la pureza de la proteína TvDHSr.

Figura 10. Electroforesis en doble dimensión de TveIF-5A hipusinada.

Figura 11. Inmunodetección de TveIF-5A hipusinada.

Figura 12. Extractos citoplásmicos de células HeLa y *T. vaginalis*.

Figura 13. Transcripción *in vitro* de controles positivos *cox-2* e *IRE-fer*.

Figura 14. Ensayo de movilidad electroforética del ERE de *cox-2* e *IRE-fer*.

Figura 15. Transcripción *in vitro* del ERE del 3'UTR de *tcvp39* y sus mutantes.

Figura 16. Ensayo de movilidad electroforética del ERE con las mutaciones puntuales.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Métodos de diagnóstico para la detección de *T. vaginalis*

Tabla 2. Iniciadores de los EREs de la región 3'UTR del RNAm de *tvcp39* con mutaciones puntuales.

INDICE

1 RESUMEN	3
2 INTRODUCCIÓN	4
2.1 TRICOMONOSIS	4
2.2 DIAGNÓSTICO.....	5
2.3 TRATAMIENTO	6
2.4 EPIDEMIOLOGÍA.....	7
2.5 <i>TRICHOMONAS VAGINALIS</i>	8
2.6 CICLO DE VIDA.....	9
2.7 GENOMA DE <i>T. VAGINALIS</i>	10
2.8 PROPIEDADES DE VIRULENCIA	11
2.8.1 <i>Adhesión</i>	12
2.8.2 <i>Citotoxicidad</i>	12
2.8.3 <i>Mecanismo de evasión de la respuesta inmune</i>	13
2.8.4 <i>Hemólisis</i>	14
2.8.5 <i>Fagocitosis</i>	14
2.8.6 <i>Apoptosis</i>	15
2.9 POLIAMINAS	15
2.9.1 <i>Poliaminas en T. vaginalis</i>	16
2.10 EIF-5A.....	17
2.11 DEOXIHIPUSINA SINTASA (DHS).....	18
2.12 DEOXIHIPUSINA HIDROXILASA (DOHH).....	18
2.13 TVEIF-5A EN <i>TRICHOMONAS VAGINALIS</i>	19
2.14 TvCP39	19
3 JUSTIFICACIÓN	20
4 OBJETIVO GENERAL	20
5 OBJETIVOS PARTICULARES	20
6 METODOLOGÍA	21
6.1 ANÁLISIS IN SILICO DE LAS ESTRUCTURAS ERES DEL 3'UTR DE TVCP39	21
6.2 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES (TVEIF-5A Y TVDHS)	21

6.3	PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	22
6.3.1	<i>Purificación de TveIF-5A recombinante</i>	22
6.3.2	<i>Purificación de TvDHS recombinante</i>	22
6.4	HIPUSINACIÓN IN VITRO	23
6.5	ELECTROFORESIS EN DOBLE DIMENSIÓN	23
6.6	2D-WESTERN BLOT.....	24
6.7	OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CITOPLÁSMICOS DE <i>T. VAGINALIS</i> Y CÉLULAS HELA 25	
6.8	TRANSCRIPCIÓN IN VITRO	25
6.9	ENSAYO DE CAMBIO DE MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA (EMSA).....	26
7	RESULTADOS	27
7.1	ANÁLISIS IN SILICO DE LOS ERES DEL 3'UTR DE TVCP39 MUTANTES	27
7.2	DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS DE LOS ERES DE LA REGIÓN 3'UTR DEL RNAM DE TVCP39 CON MUTACIONES PUNTUALES	32
7.3	PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES TVEIF-5A Y TVDHS	34
7.4	HIPUSINACIÓN IN VITRO PARA LA OBTENCIÓN DE LA PROTEÍNA TVEIF-5A MADURA.....	47
7.5	ENSAYO DE MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA DEL ERE COX-2 E IRE-FER.....	52
7.6	ENSAYO DE MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA DE ERE CON LAS MUTACIONES PUNTUALES	53
8	DISCUSIÓN	64
9	CONCLUSIÓN	66
10	PERSPECTIVAS	66
11	BIBLIOGRAFIA	67
12	APÉNDICE	71

1 RESUMEN

Trichomonas vaginalis es el agente causal de la tricomonosis, infección de transmisión sexual que afecta el tracto urogenital. Este parásito depende del hospedero para obtener los nutrientes necesarios para su sobrevivencia.

T. vaginalis presenta propiedades y factores de virulencia que le permiten establecer la infección, una de estas propiedades es la citotoxicidad y uno de los factores involucrado en la citotoxicidad es la cisteín proteasa de 39 kDa (TvCP39).

TvCP39 está regulada positivamente por poliaminas a nivel de transcrito y proteína, y se encontró que presenta en su extremo 3'UTR una secuencia denominada ERE (elemento de respuesta a eIF-5A) en forma de tallo-burbuja.

En *T. vaginalis* se ha propuesto que eIF-5A conocida como TveIF-5A pueda estar involucrada en un mecanismo postranscripcional del RNAm de *tvcp39* que presenta la secuencia ERE el cual forma una estructura de tallo- burbuja en el extremo 3'UTR, este mecanismo se ha propuesto para el RNAm de *cox-2*.

Recientemente se ha comprobado que TveIF-5A madura es capaz de unirse a la secuencia ERE, sin embargo es importante conocer si esta proteína presenta una interacción específica de secuencia. Es por ello que en este trabajo realizamos mutaciones puntuales en la secuencia ERE del 3'UTR del RNAm de *tvcp39*, cabe destacar que nos interesó conservar la estructura tallo-burbuja, para lo cual se realizaron análisis *in silico* de cada una de las mutantes, una vez diseñados nuestras sondas de realizaron ensayos de retardamiento que nos permitieron observar si el cambio de nucleótido presente en la secuencia ERE disminuye y/o inhibe la interacción de TveIF-5A lo cual nos da un panorama de cómo podría estar regulándose este RNAm.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 *Tricomonosis*

La tricomonosis es una infección de transmisión sexual ocasionada por el parásito *Trichomonas vaginalis* que infecta el tracto genitourinario. Las personas enfermas pueden presentar síntomas o ser asintomáticos. La mayoría de las mujeres desarrollan síntomas de 4 a 28 días después de una relación sexual con una persona infectada. Estos síntomas se manifiestan como descargas vaginales líquidas y espumosas, amarillo-verdosas y con olor desagradable, comezón, ardor y dolor vaginal, irritación o enrojecimiento vaginal y dolor durante la relación sexual. Solo 2% de las pacientes presentan el signo típico de la tricomonosis conocido como cérvix de fresa (*Colpitis macular*). Debido a la inflamación que produce el parásito en el cuello del cérvix se presentan hemorragias localizadas en forma de puntilleo que generalmente sólo se observan por colposcopia.

Uno de los problemas para el diagnóstico clínico de la tricomonosis es que hasta 50% de las mujeres infectadas con tricomonas son asintomáticas (Petrin y col., 1998; Schwebke y Burgess, 2004) sin embargo para aquellas que presentan la infección ha sido ligado a una amplia gama de secuelas en la salud reproductiva de la mujer incluyendo: ruptura de las membranas amnióticas lo cual ocasiona partos prematuros y/o neonatos de bajo peso, e incluso con infertilidad (Schwebke., 2004). Existe una predisposición al desarrollo de cáncer cervical debido a la destrucción del epitelio vaginal lo cual permite el establecimiento del virus del papiloma humano y su replicación (Mason y col., 1990, Boyle y col. 2003) se ha asociado también con incremento en el riesgo de contraer el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), como resultado del proceso inflamatorio crónico (Guenthner y col., 2005).

En el caso de los hombres infectados hasta el 90% llegan a ser asintomáticos por lo que se les ha atribuido el papel de portadores de la infección.

En los pocos casos en los que la infección prevalece estos pueden presentar síntomas como prostatitis y uretritis, caracterizadas por descargas uretrales y sensación de ardor al orinar (Petrin y col., 1998; Schwebke y Burgess, 2004; Schwebke y Hook, 2003), una infección persistente puede producir prostatitis o epididimitis (Krieger y col. 1993) y, debido al daño causado en las células por la expresión de genes proinflamatorios, puede causar daño a las células epiteliales provocando una renovación celular, si este proceso no se controla puede llevar a la hiperproliferación de las células prostáticas. Así como regular la expresión de genes anti-apoptóticos y evitar la apoptosis en las células dañadas. Por todo esto se ha propuesto una predisposición al cáncer de próstata (Sutcliffe y col., 2006).

2.2 Diagnóstico

El diagnóstico de la tricomonosis se puede deducir por la presencia de los signos y síntomas clínicos ya mencionados, sin embargo hasta el momento se realizan varias técnicas de diagnóstico entre las cuales se encuentra la visualización directa del parásito, el estándar de oro utilizado es el cultivo de Diamond (Lossick y col., 1991) el cual confiere un alto grado de sensibilidad y especificidad (Heine y col., 1993); la desventaja es el tiempo de incubación (2 a 7 días). Existen otros métodos diagnósticos menos sensibles como la tinción de Papanicolaou y técnicas de amplificación por PCR (Swygard y col. 2004) del gen de la β -Tubulina 9/2 y AP65 A/B (Madico y col., 1998).

Recientemente se han utilizado las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (NAATs Nucleic Acid Amplification Tests) que han sido validadas en mujeres sintomáticas y asintomáticas, son pruebas comerciales, con alta sensibilidad donde se utilizan muestras de orina, exudados vaginales y endocervicales. El ensayo APTIMA TV es una prueba cualitativa de amplificación del ácido nucleico *in vitro* que utiliza captura de blanco, hibridación de sonda quimioluminiscente y el sistema TIGRIS DTS automatizado para detectar el RNA ribosomal (rRNA) de *Trichomonas vaginalis* (Tabla 1).

El diagnóstico de *T. vaginalis* es más difícil en los pacientes masculinos, obteniendo mejores resultados los cultivos de exudados uretrales y sedimento urinario.

Tabla 1. Métodos de diagnóstico para la detección de *T. vaginalis*

Categoría	Prueba	Rango de sensibilidad (%)	Rango de especificidad (%)	Ventajas
Microscopía directa	Observación en fresco	44-68	100	Resultados el mismo día Barato
Cultivo	Medio Diamond's modificado o InPouch	44-75	100	Mejor sensibilidad que la microscopía
Pruebas moleculares no-amplificadas	Affirm VPIII Prueba de hibridación de ácidos nucleicos	64	100	Resultados el mismo día es posible Se incluye la detección para <i>Gardnerella</i> y levaduras
NAATs	APTIMA TV	88-100	98-100	Alta sensibilidad y especificidad Funciona bien con especímenes de hombre
	Inhouse PCR	76-100	96-100	

(Hobbs y col., 2013)

2.3 Tratamiento

El tratamiento de la tricomonosis es a base de nitroimidazoles como el metronidazol, tinidazol, ornidazol, carnidazol y nimorazol; siendo el metronidazol el medicamento más utilizado para el tratamiento de la tricomonosis, su dosis vía oral es de 2 g. en una sola dosis, o bien, 500 mg.

cada 8 hrs por 5 a 7 días. Las parejas sexuales deben ser también tratados (Muzny CA y col., 2013).

Estos medicamentos son reducidos en los hidrogenosomas provocando desestabilidad en el DNA del parásito, sin embargo durante los últimos años se ha reportado resistencia al tratamiento con metronidazol (Swygard, Sena y col.; 2004). Las causas que se han descrito para esta resistencia son: la falla en la actividad enzimática de la Piruvato Ferredoxín Óxidoreductasa (PFO), una conformación alterada del hidrogenosoma, ferredoxina (Fd) con un potencial redox excepcional, cantidades reducidas de ferredoxina intracelular (Vázquez y col., 2001), una mutación puntual en la región que flanquea al extremo 5' del gen Fd, resultando en una disminución en la transcripción del gen Fd (Dunne y col. 2003). Para infecciones resistentes a metronidazol, se utiliza el Tinidazol (Schwebke, 2004).

2.4 Epidemiología

La tricomonosis es la infección no viral de transmisión sexual número uno en el mundo. Tiene una incidencia a nivel mundial de más de 250 millones de casos al año (reporte de la OMS, 2010).

En México hasta la semana 44 del 2013 se reportaron un total de 86, 647 casos de tricomonosis en donde el 97% de los casos se reportaron en mujeres y 3% en hombres (Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica SUIVE 2013).

En nuestro país la tricomonosis se encuentra distribuida principalmente en la zona centro y sur del país, los estados de la república mexicana más afectados son: Veracruz (12.5%), Estado de México (10.9%), Puebla (10.6%), Chiapas (5.3%), Oaxaca (5.1%) y Guanajuato (4.9%); y los estados con menor incidencia son Querétaro (0.20%) y Baja California Sur (0.24%).

2.5 *Trichomonas vaginalis*

Trichomonas vaginalis es un parásito protozoario de forma ovoide, que mide entre 10-20 μm de largo y 7 μm de diámetro, con un núcleo excéntrico que contiene seis cromosomas.

Este protozoario es móvil debido a la presencia de cuatro flagelos anteriores y un quinto flagelo adosado a la membrana ondulante, presenta un axostilo; prolongación que atraviesa al parásito y se proyecta en el extremo opuesto a los flagelos como una espícula (Alderete y col., 2004; Petrin y col., 1998; Schwebke y Burgess, 2004). Este parásito es un anaerobio microaerófilico que prefiere un pH de 6.0 para su crecimiento y metabolismo (Alderete y col., 2004).

A diferencia de la mayoría de los eucariontes, *T. vaginalis* carece de mitocondrias y en su lugar utiliza al hidrogenosoma para llevar a cabo el metabolismo de carbohidratos usando al hidrogeno como aceptor de electrones. El hidrogenosoma parece tener un ancestro común con la mitocondria basados en su similitudes en el importe de proteínas. Sin embargo, existen diferencias entre ellos ya que el hidrogenosoma no cuenta con citocromos, enzimas de la cadena respiratoria ni tiene DNA. (Schwebke y col., 2004). El citoesqueleto de este parásito contiene actina, tubulina, y esta formado por microtúbulos que lo distinguen de otros protozoarios por estructuras poco comunes como la costa, la pelta y el axostilo. Los microtúbulos son esenciales para el mantenimiento, la forma celular y su organización, para el transporte citoplásmico, motilidad y división en todas las células eucarióticas. (Ribeiro y col., 2000).

T. vaginalis presenta dos morfologías, la forma ameboide encontrada en biopsias de pacientes con tricomonosis, que se da al estar en contacto con células del epitelio vaginal (VECs) (Figura 1) y la forma ovoide que se ha encontrado en flujo uretral y vaginal, orina y semen de pacientes infectados. (Lehker y col. 1991; Arroyo y col. 1993; Moreno-Brito y col., 2003).

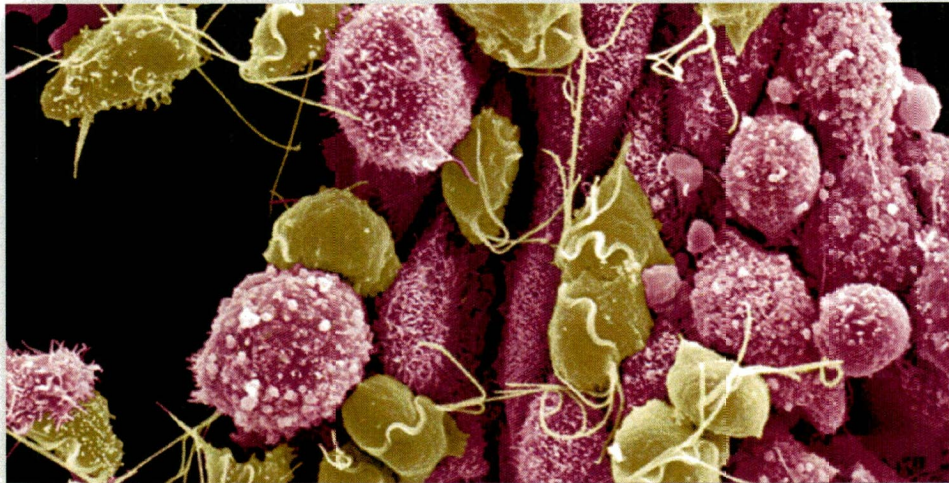


Figura 1. Microscopía de barrido de *Trichomonas vaginalis* mostrando la morfología ameboide al entrar al contacto con VECs (Marlene Benchimol).

2.6 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *T. vaginalis* es simple, no existen formas libres de este microorganismo, no tiene huéspedes intermediarios ni es transmitido por vectores sólo se presenta en forma de trofozoito (Schwebke y col., 2004). La transmisión es de persona a persona mediante el contacto sexual con personas infectadas. Los parásitos se adhieren a las mucosas de la vagina y del exocérnix donde permanecen a pesar de las condiciones adversas (pH ácido, cambios hormonales cíclicos, descamación del epitelio, presencia de lactobacilos y de anticuerpos anti-tricomonas). *T. vaginalis* también puede ser transmitido de madre-hijo(a) durante el parto por una transmisión vertical, esto se da cuando el neonato pasa por el canal vaginal. En este caso, *T vaginalis* puede afectar tanto las vías respiratorias, como el tracto genital del recién nacido (Smith, Wang y col.; 2002; Carter y Whithaus 2008). *T. vaginalis* se multiplica por fisión binaria que empieza con la división nuclear, para generar dos células hijas. (Gómez-Conde y col., 2000).

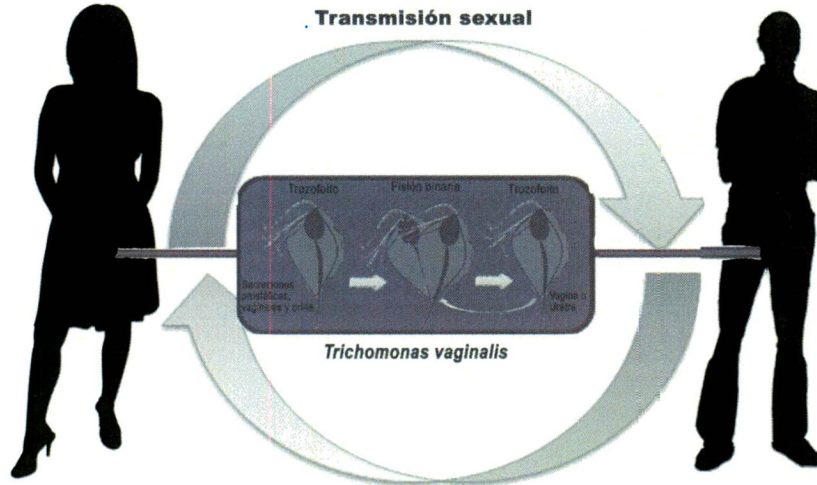


Figura 2. Ciclo de vida de *T. vaginalis*. Tomado del libro Genómica de Parásitos. Aspectos Moleculares, Genómicos, Proteómicos y de Virulencia. Álvarez Sánchez María Elizabeth, Azuara Elisa; 2012.

2.7 Genoma de *T. vaginalis*

El genoma de *T. vaginalis* presenta un tamaño de 160 Mb, con 60,000 genes que codifican para proteínas y 65 de ellos contienen intrones. El gran tamaño del genoma se debe a que contiene una gran cantidad de secuencias repetidas que pueden ser clasificados como: transposones, retrotransposones, y que representan aproximadamente dos tercios del genoma, lo que refleja una reciente expansión masiva de material genético (Carlton y col., 2007).

El genoma presenta genes que codifican para proteínas que son capaces de realizar el procesamiento de corte y empalme denominado "splicing" (Pestota y col., 2001; Vanacova y col., 2005; Carlton y col., 2007).

El genoma de este parásito también presenta genes que codifican para RNA de transferencia (RNAt) de los 20 aminoácidos y 250 genes codificantes para RNA ribosomales (DNAr).

De manera interesante, *T. vaginalis* contiene genes Dicer, argonautas y DEAD-DEAH-box, así como genes que codifican para helicasas, sugiriendo la existencia de una vía para la formación de RNA interferente (RNAi).

El elemento promotor Inr se encontró en aproximadamente el 75% de las regiones no traducidas 5' (UTR) apoyando su papel central en la expresión génica. (Carlton y col. 2007).

La RNA polimerasa II de *T. vaginalis* es inusual, es resistente a alfa-amanitina en un 50%, y se sugiere que solo esta polimerasa es responsable de la transcripción en este parásito (Liston y Johnson., 1998). Otra RNA polimerasa que ha sido descrita es la RNA pol III la cual transcribe el gen que codifica para el gen 5Sr (Torres-Machorro y col., 2006).

T. vaginalis contiene genes que codifican para actina y tubulina, proteínas que permiten el remodelamiento de su forma ovoide a ameboide. De igual forma presenta genes que participan en la respuesta al daño al DNA como Rad51, Dmc1, XPC/Rad4/mus101/TopBP1. También se identificaron 800 proteínas de superficie que pueden estar involucradas en la citoadherencia y citotoxicidad del parásito en las células del hospedero. *T. vaginalis* contiene un amplio degradoma de más de 400 peptidasas haciéndolo uno de los degradomas más complejos. Además, presenta 138 posibles genes involucrados en el metabolismo energético y vías de transporte de electrones así como genes implicados en la respuesta al daño y reparación del DNA, reestructuración de la cromatina y meiosis. (Carlton y col. 2007).

2.8 Propiedades de virulencia

Durante el proceso de infección, *T. vaginalis* se encuentra expuesto a condiciones adversas como: pH ácido, presencia de lactobacilos, cambios hormonales cíclicos, descamación del epitelio, flujo menstrual, nutrientes escasos y fluctuaciones en las concentraciones de hierro. Por esto, para establecer una infección crónica, requiere de múltiples propiedades de

virulencia como la adhesión, la citotoxicidad, la fagocitosis, diversas estrategias para la evasión de la respuesta inmune y la inducción de apoptosis a las células blanco (Alderete y col., 2004; Klemba y Golberg, 2002; Petrin y col., 1998; Schwebke y Burgess.,2004).

Algunos factores microambientales del huésped tales como Fe^{2+} , Zn^{2+} , poliaminas, pH y temperatura pueden regular alguna de estas propiedades de virulencia.

2.8.1 Adhesión

La adhesión de *T. vaginalis* a la célula blanco es uno de los principales mecanismos para el establecimiento de la infección. En la adhesión de *T. vaginalis* a las células del epitelio urogenital participan diversas moléculas como adhesinas (Alderete y Garza, 1998, Arroyo y col., 1992; Moreno-Brito y col., 2004), Las adhesinas involucradas en esta propiedad son cinco: AP65, AP51, AP33, AP23 (Arroyo, y col., 1992) y AP120 (Moreno-Brito, y col. 2005). Además presenta dos cisteín-proteinasas (CPs) involucradas en la adhesión, CP30 (Mendoza-López y col. 2000) y CP62 (Hernández y col., 2004). En este proceso también participan receptores específicos para componentes de la matriz extracelular (Alderete JF y col., 2002). El hierro regula positivamente la síntesis de adhesinas en *T. vaginalis*, reflejando que el parásito necesita mayor adherencia debido al flujo menstrual (Arroyo y col., 1993).

2.8.2 Citotoxicidad

En la citotoxicidad de *T. vaginalis* hacia las células epiteliales, se requiere del contacto con la célula blanco, así como de la participación de diversas moléculas como porinas, toxinas, factores de desprendimiento celular, fosfolipasas (Alderete y col., 2004) y CPs como la CP65 (Álvarez-Sánchez y col., 2003; Hernandez-Gutierrez y col., 2004). Estas CPs tienen afinidad por la

superficie de las células del cérvix y de la vagina y son capaces de degradar diversos sustratos como fibronectina y colágena I y IV, así como inmunoglobulinas (Álvarez-Sánchez y col., 2000; Hernández-Gutierrez y col., 2004). La actividad proteolítica de estas moléculas se modulan diferencialmente por hierro (Álvarez-Sánchez y col., 2007; Hernández-Gutierrez y col., 2003).

Varias de estas moléculas son inmunogénicas durante la infección, ya que se encuentran anticuerpos específicos en el suero en las secreciones de pacientes con tricomonosis (Alderete y col. 2004; Álvarez-Sánchez y col., 2000; Hernández-Gutierrez y col., 2004; Mendoza-López y col., 2000), por lo que se pueden considerar posibles blancos para el diagnóstico.

TvCP39 y TvCP65 son inmunogénicas en pacientes con tricomonosis, se encuentran en secreciones vaginales, son activas en el pH y temperatura que se encuentra en la vagina durante la infección, degradan proteínas del ambiente vaginal como colágena IV y fibronectina, requieren poliaminas para su expresión y su expresión es sub-regulada por hierro y zinc. (Figueroa Angulo y col. 2012).

2.8.3 Mecanismo de evasión de la respuesta inmune

Durante la menstruación existen cambios en la vagina, macromoléculas de la sangre se encuentran en el epitelio vaginal, encontrándose factores del complemento *in vivo*, que se conocen como tricomonocidas y que ocasionan la lisis del parásito debido a la activación de la vía alterna del complemento (Gillin y col., 1981; Demes y col., 1988).

T. vaginalis presenta variación fenotípica como parte de un mecanismo de evasión inmune (Alderete y col., 1987). Dos inmunógenos de superficie (P270 y P230) están involucrados en este mecanismo. Para P230, la variación fenotípica se basa en cambios en la accesibilidad del epítipo de unión de anticuerpos. En contraste, la expresión en la superficie de P270 se relaciona con la presencia de un virus de doble cadena (dsRNA), la concentración de hierro y fosforilación (Lehker M y col., 2000).

Así mismo *T. vaginalis* es capaz de evadir la respuesta inmune; a través de la degradación de inmunoglobulinas humanas (Igs): IgA, IgG e IgM por la acción de CPs (Provenzano y col., 1995). Una CP de 60 kDa cumple un doble rol para la supervivencia del parásito, degrada las inmunoglobulinas y suministra nutrientes al parásito mediante la degradación de hemoglobina (Lehker M y col., 2000).

El mimetismo molecular también se presenta en *T. vaginalis*, por la decoración de la membrana del parásito con moléculas homólogas a proteínas del hospedero, tales como varias de las adhesinas del parásito (AP65, AP51 y AP33) que son homólogos a enzimas metabólicas del hospedero. (Alderete J. Y col., 2001).

2.8.4 Hemólisis

La actividad hemolítica de *T. vaginalis* depende de un contacto directo entre el parásito y la superficie del eritrocito (Polamianos y col., 1992), este mecanismo es importante para la obtención de nutrientes como fierro y lípidos, los cuales pueden ser obtenidos mediante la lisis de los eritrocitos. (Krieger y col. 1983, Levi y col., 1996).

Durante la hemólisis se da la formación de poros en la membrana del eritrocito, en este proceso se encuentra participando probablemente una cisteín proteasa de 30 kDa (Fiori y col., 1993) o cisteín proteasas denominadas porinas (Dailey y col., 1990).

2.8.5 Fagocitosis

T. vaginalis puede fagocitar células que se encuentran comúnmente en el microambiente de la vagina como lactobacillus de Doderlein's, células del epitelio vaginal, leucocitos, eritrocitos, levaduras, espermatozoides y células prostáticas (Pereira- Neves A y col., 2007).

Aunque el mecanismo de fagocitosis no ha sido completamente elucidado, se han descrito al menos dos vías: 1) la vía utilizada por los fagocitos profesionales en los cuales los pseudópodos se extienden hacia la célula blanco y 2) un proceso de hundimiento sin extensión de la membrana.

Se han sugerido que diferentes proteínas están involucradas en este proceso (Lehker M y col., 1990).

2.8.6 Apoptosis

T. vaginalis induce apoptosis a neutrófilos de humano y VECs a través de un incremento en la actividad de la caspasa 3 y reducción de la expresión de la proteína antiapoptótica McL 1 en los neutrófilos (Kang y col., 2006). Por otra parte, también induce la apoptosis de macrófagos mediante la activación de la vía citocromo c/caspasa 3/ MAPK p38, causando anergia de la respuesta inmune local. Sin embargo, aún se desconoce si el contacto directo con el parásito o la liberación de un factor, están involucrados. El rol de p38 como un ejecutor final de la apoptosis de macrófagos por *T. vaginalis* es único (Chang JH. Y col., 2006).

2.9 Poliaminas

Las poliaminas putrescina, espermidina y espermina son aminas alifáticas imprescindibles para la vida en todos los eucariontes. Éstas se caracterizan por ser moléculas sencillas de un tamaño similar a los aminoácidos y encontrarse presentes en concentraciones importantes (en un rango de 0.1- 2.29 mM), regulando procesos vitales para el mantenimiento y el crecimiento celular como: apoptosis, división, diferenciación y crecimiento celular.

Las poliaminas se unen a los ácidos nucleicos por medio de interacciones electrostáticas para influir en la transcripción y la traducción (Tabor y col., 1985; Pegg, 1988; Schuber y col., 1989).

A pH fisiológico, las poliaminas están protonadas, es decir poseen cargas positivas, a mayor número de grupos amino la carga neta de la molécula será mayor. Aunque se ha demostrado que las poliaminas se unen tanto a DNA como a RNA, sus interacciones con el RNA son considerablemente más robustas. (Gerner y col., 2002).

2.9.1 Poliaminas en *T. vaginalis*

T. vaginalis es un parásito obligado debido a que depende de su hospedero para su sobrevivencia. El parásito, carece de muchas vías metabólicas *de novo*, las cuales las obtiene directamente del hospedero, por lo que se vale de diferentes mecanismos que le va a permitir sobrevivir en el microambiente de la vagina.

T. vaginalis es incapaz de sintetizar espermina *de novo* por lo que adquiere esta molécula del hospedero. El metabolismo de poliaminas de *T. vaginalis* es diferente con respecto de otros eucariontes. Este parásito lo realiza mediante un sistema antiporte putrescina/espermina, en el cual se excretan dos moléculas de putrescina para introducir una molécula de espermina. En *T. vaginalis* la putrescina es sintetizada por la enzima ornitina descarboxilasa (ODC) mediante la vía de la arginina-hidrolasa, mientras que la espermina es procesada dentro de los hidrogenosomas y convertida a espermina vía espermidina N¹ acetiltransferasa (SSAT) acoplado a la vía de la poliamina oxidasa (Yarlett y col., 2000)

El metabolismo de poliaminas se encuentra ligado a la capacidad de adherencia de *T. vaginalis* a las VECs, la ausencia de poliaminas regula negativamente la adherencia del parásito a las células VECs; ya que se ha demostrado que cuando se agrega putrescina exógena disminuye la adhesión a la célula blanco. Estos datos sugieren que el metabolismo de poliaminas, así como la secreción de putrescina interfieren en el reconocimiento y unión del

parásito a las VECs (García y col., 2005). Las poliaminas regulan la expresión del gen *tvcp65* debido a que en ausencia de poliaminas los niveles de expresión de *tvcp65* disminuyen, al igual que la actividad proteolítica y la cantidad de proteína (Álvarez Sánchez y col., 2008)

Existe una proteína dependiente de poliaminas llamada factor de inicio de la traducción 5A. (eIF-5A). En *T. vaginalis* esta proteína se encuentra regulada positivamente por las poliaminas ya que cuando se crecen los parásitos en un ambiente carente de poliaminas la expresión del RNAm y la cantidad de la proteína disminuye sin embargo se recupera cuando se adiciona putrescina exógena al medio (Carvajal-Gómez y col., 2011).

T. vaginalis tiene la capacidad de modificar el ambiente ácido de la vagina al secretar poliaminas que contribuyen al mal olor de las secreciones vaginales típicas de la tricomonosis (Yarlett et al., 2000)

2.10 eIF-5A

La proteína eIF-5A es altamente conservada entre archaea y eucariontes y es la única conocida que posee el aminoácido hipusina, el cual es esencial para que eIF-5A lleve a cabo su función en la proliferación, diferenciación y sobrevivencia de la célula. Esta proteína sufre una modificación postraducciona llamada hipusinación (Xu y col., 2004).

Esta reacción requiere de dos pasos enzimáticos para formar la proteína activa o madura: en el primer paso, la enzima Deoxihipusina sintetasa (DHS) transfiere un carbono 4-aminobutil de la espermidina a un residuo de lisina específico de eIF-5A. Posteriormente es hidrolizado por la enzima Deoxihipusina hidroxilasa (DOHH) (Park y col., 2000).

No se conoce una función específica de esta proteína; sin embargo, se han descrito mecanismos en los cuales puede estar participando. Mediante inmunofluorescencia indirecta se demostró que eIF-5A es una proteína de transporte núcleo- citoplasmático de RNAs (Rosorius y col., 1999)

Por otra parte, se ha propuesto que eIF-5A madura participa en un mecanismo de regulación postranscripcional en el RNAm del gen *cox-2* que presenta

secuencias denominadas “elementos de respuesta a eIF-5A” (EREs) en su extremo 3'UTR las cuales forman una estructura de tallo-burbuja (Parker y col., 2002). Debido a la falta de correlación con la síntesis de proteínas en general, se ha sugerido que eIF-5A puede no ser un factor de inicio de la traducción. (Kang y col., 1994).

2.11 Deoxihipusina sintasa (DHS)

Es una proteína esencial encontrada en todos los eucariontes que cataliza la síntesis de deoxihipusina [N^ε-(4-aminobutil)-lisina], el primer paso en la síntesis postraducciona del aminoácido inusual hipusina [N^ε-(4-amino- 2-hidroxibutil)-lisina].

Esta enzima utiliza dos sustratos, espermidina (donador de butilamina) y eIF-5A precursora (aceptor de butilamina) y requiere como cofactor a NAD.

La inhibición de la actividad de DHS en células de mamíferos provoca la detención del crecimiento, muerte celular así como diferenciación tumoral (Xu y col., 2004).

Trabajos previos donde realizaron una hipusinación *in vitro* utilizando a DHS de *T. vaginalis* (TvDHS) y TveIF-5A precursora como sustrato sugieren que TvDHS es suficiente para llevar a cabo la modificación postraducciona de hipusinación en el parásito *T. vaginalis* (Quintas-Granados y col., en proceso).

2.12 Deoxihipusina hidroxilasa (DOHH)

Deoxihipusina hidroxilasa cataliza el paso final de la síntesis postraducciona de hipusina. Esta enzima convierte a eIF5A intermediaria que contiene deoxihipusina a la forma madura que contiene la hipusina.

Estudios recientes han mostrado han mostrado que DOHH solo es indispensable para la hipusinación en eucariontes superiores y no para levadura, arqueas y eubacterias (Park y col., 2010).

2.13 TveIF-5A en *Trichomonas vaginalis*

T. vaginalis presenta dos genes *tveif-5a* (*tveif-5a1* y *tveif-5a2*), cada uno codifica para una proteína de 19 kDa. Ambos genes se expresan de manera constitutiva y son regulados positivamente por las poliaminas. Mediante ensayos de Western blot utilizando anticuerpos anti-péptido (anti-TveIF-5A) se inmunodetectaron dos proteínas de 19 y 209 kDa con un *pI* de 5.2 y 5.5, en extractos proteicos de *T. vaginalis* que correspondían a la proteína precursora y madura respectivamente. La localización de esta proteína en *T. vaginalis* es en el citoplasma (Carvajal-Gamez y col., 2010).

2.14 TvCP39

La proteinasa de 39-kDa es una proteinasa de superficie secretada durante la infección con Tricomonosis y se encuentra activa bajo las condiciones microambientales de la vagina. Es capaz de unirse a células epiteliales HeLa, VECs y células de cáncer prostático humano (DU-145) (Hernández-Gutiérrez y col., 2004).

TvCP39 es una proteinasa de tipo papaína que corresponde a una sola mancha proteolítica de 39 kDa y un *pI* de 4.5. Degrada varias proteínas de la matriz extracelular incluyendo fibronectina, distintos tipos de colágena (I,III,IV, y V), IgG, IgA y hemoglobina. Es inmunogénica y tiene actividad proteolítica a 37°C en un amplio rango de pH, similar a las condiciones encontradas durante la infección en mujeres y hombres. (Ramón-Luing y col., 2011).

TvCP39 es expresada, secretada e involucrada en el daño a tejido durante la infección, por lo que se le ha encontrado estar involucrada en la citotoxicidad de *T. vaginalis* (Hernández-Gutiérrez y col., 2004).

Reportes recientes indican la regulación positiva mediada por el metabolismo de poliaminas en TvCP39, en los niveles de transcrito, cantidad y localización de la proteína. La caracterización del 3'UTR de *tvcp39* presentó una secuencia ERE que forma una estructura tallo-burbuja como el reportado el 3'UTR de *cox-2* (Carvajal-Gamez en proceso y Parker y col., 2002).

3 JUSTIFICACIÓN

Recientemente se ha determinado la interacción de la proteína TvelF-5A con un elemento tallo-burbuja denominado elemento de respuesta a eIF-5A (ERE) localizado en el extremo 3' UTR del gen *tvcp39* involucrado en la citotoxicidad del parásito, pero no se conoce los nucleótidos del ERE de *tvcp39* que podrían estar participando en la interacción con la proteína TvelF-5A.

4 OBJETIVO GENERAL

Determinar los nucleótidos del ERE del RNAm de *tvcp39* que participan en la interacción con TvelF-5A en *T. vaginalis*

5 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar mediante análisis *in silico* las estructuras EREs de la región 3'UTR del RNAm de *tvcp39* con mutaciones puntuales.
2. Determinar mediante ensayos funcionales los nucleótidos del ERE del RNAm de *tvcp39* que participan en la interacción con TvelF-5A en *T. vaginalis*.

6 METODOLOGÍA

6.1 *Análisis in silico de las estructuras EREs del 3'UTR de tvcp39*

Para el análisis de las secuencias EREs que contienen las mutaciones puntuales se utilizó el programa "mfold" versión 2.5 (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/rna-folding-form>) para analizar las estructuras tallo-burbuja y determinar el valor de ΔG , ambos parámetros se han reportado como una de las características de elementos regulatorios.

El software "mfold" es un servidor utilizado para el plegamiento de ácidos nucleicos y para la predicción de hibridación utilizando parámetros termodinámicos, fue desarrollado por el Dr. Michael Zuker (Zuker., 2003).

6.2 *Expresión de proteínas recombinantes (TveIF-5A y TvDHS)*

Para inducir la expresión de las proteína recombinantes primero se creció un preinóculo de las clonas de TveIF-5Ar y TvDHSr (Tesis de doctorado Carvajal-Gamez 2011) en medio LB-ampicilina a 200 rpm/ 37°C/ O.N. y posteriormente se resembró en el mismo medio y se cultivó a 200 rpm a 37°C hasta alcanzar una O.D de 0.6. La expresión de la proteína se indujo con 1 $\mu\text{g/ml}$ isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido (IPTG) de SIGMA-ALDRICH a 200 rpm/ 37°C/ 4 hr. Una vez transcurrido ese tiempo se centrifugó el medio a 8000 rpm/ 30 min/ 4°C se decantó el sobrenadante y se conservó con la pastilla.

Para observar la inducción de la proteína se adicionó amortiguador de carga 2x y se analizó en geles SDS-PAGE al 12 % teñidos con Azul de Coomassie.

Una vez inducida la proteína se agregaron 5 ml de amortiguador de unión a la pastilla, 150 μl de PMSF 100 mM, 50 μl de Triton X-100 y 200 μl del coctel de inhibidores (Roche), se sonicó la muestra por 3 min con un pulso de 10 seg de sonicación con 10 seg de descanso y una amplitud de 85%, se centrifugó a 8000 rpm/ 45 min/ 4°C se recolectó el sobrenadante y se filtró con membrana de 0.22 μm para proceder a su purificación.

Nota: Los tubos Falcon de 15 y 50 ml se trabajaron con el rotor Heraeus con las siguientes características; velocidad máxima 8500 rpm y carga máxima de 6x130g.

Los tubos eppendorf de 1.5 ml se trabajaron con el rotor Heraeus cuya velocidad máxima es de 14000 rpm y la carga máxima de 24 x 4g.

6.3 Purificación de proteínas recombinantes

6.3.1 Purificación de TveIF-5A recombinante

La proteína soluble TveIF-5Ar se purificó utilizando una columna de afinidad a GST de 1 ml (GE Life Sciences) con el cromatógrafo AKTA prime plus (Amersham Biosciences) usando el método manual. Primero se lavó la columna con 30 ml de agua filtrada y desgasificada para eliminar el etanol al 20 % con el que es almacenada, utilizando un flujo de 1 ml/min, la columna se equilibró con 50 ml del amortiguador de unión pH 7.6 con 1 ml/min de flujo, se pasó la muestra previamente filtrada (20 ml) utilizando un flujo de 0.5 ml/min, al terminar el pase de la muestra se realizaron lavados con 250 ml del amortiguador de unión y se eluyó con el 100% del amortiguador de elución que contiene 10 mM de Glutation reducido de SIGMA-ALDRICH y se colectaron las fracciones de 1 ml cada una, 20 µl de estas se corrieron en geles SDS-PAGE al 12% teñidos con Azul de Coomassie para verificar la purificación.

6.3.2 Purificación de TvDHS recombinante

La proteína soluble TvDHSr se purificó utilizando una columna de afinidad a histidinas de 1 ml (GE Life Sciences) con el cromatógrafo AKTA prime plus (Amersham Biosciences) usando el método manual. Primero, la columna se lavó con 30 ml de agua filtrada y desgasificada para eliminar el etanol al 20 % con el que es almacenada, utilizando un flujo de 1 ml/min, se equilibró la

columna con 50 ml del amortiguador de lavado pH 8.0 con 1 ml/min de flujo, se pasa la muestra previamente filtrada (20 ml) utilizando un flujo de 0.5 ml/min. Una vez pasada la muestra por la columna se hicieron lavados con 250 ml del amortiguador de lavado, se eluyó con gradientes de 0 a 100% del amortiguador de elución que contiene 250 mM de imidazole y se recolectaron las fracciones de 1 ml cada una de ellas, las cuales 20 μ l de estas fueron corridas en geles SDS-PAGE al 12% teñidos con Azul de Coomassie para verificar la purificación.

6.4 Hipusinación *in vitro*

Para convertir a la proteína recombinante TveIF-5A precursora en su forma madura se realizó una hipusinación *in vitro* la cual consistió en adicionar en un tubo eppendorf de 1.5 ml los siguientes reactivos: 173 μ l de Amortiguador Glicina-NaOH 0.1 M pH 9.5, 200 μ l de DTT 1 mM, 1000 μ l de la proteína TveIF-5Ar precursora previamente purificada, 387 μ l de la proteína TvDHS también previamente purificada, 200 μ l del cofactor NAD 1mM y 40 μ l de espermidina 1 mM. Una vez agregados todos los reactivos se colocó el tubo eppendorf en el incubador/agitador a 220 rpm durante 1 hora a 37°C.

Después de transcurrido ese tiempo se adicionó la solución de paro que consiste en agregar 100 μ l de fosfato de potasio 1M y 800 μ l de espermidina 60 mM.

6.5 Electroforesis en doble dimensión

Para corroborar que la proteína TveIF-5A se encontraba hipusinada se corrió un gel en doble dimensión de la siguiente manera:

1 ml de la reacción de hipusinación *in vitro* se precipitó con 100 μ l de TCA 0.N a 4°C y se lavó con acetona fría. La pastilla se resuspendió en 100 μ l de

amortiguador de hidratación (0.02 g de CHAPS, 0.21 g de Urea 7M y 0.0154 g de DTT).

Se tomó una alícuota de 40 μ l de la reacción y se le adicionó 1 μ l de Azul de bromofenol, 3 μ l de anfolinas y 81 μ l de amortiguador de hidratación para tener un total de 125 μ l que se cargaron en una tira IPG de 3-10 de 7 cm para proceder a la hidratación.

Posteriormente, se realizó la hidratación pasiva durante 16 h. Al día siguiente se realizó el isoelectroenfoco utilizando el siguiente programa:

Paso 1	250 V	Rampa: L	Tiempo 00:40
Paso 2	4000 V	Rampa: L	Tiempo 03:00
Paso 3	4000 V	Rampa: R	Vhora 10000

Una vez terminado el isoelectroenfoco se equilibraron las tiras IPG con 5 ml del amortiguador de equilibrio que contenía 15 mg/ml de DTT durante 15 minutos para el primer lavado y 5 ml del amortiguador de equilibrio con 37.5 mg/ml de IAA por otros 15 minutos para el segundo lavado. Una vez transcurrido el periodo de equilibrio se corre la segunda dimensión en un gel SDS-PAGE al 15% que fue corrido a 100 V. Posteriormente el gel se tiñó con plata y el gel espejo es transferido a una membrana de nitrocelulosa en una cámara semi-seca (Trans-blot SD Semi-Dry Transfer Cell, BioRad) durante 20 min a 20 V.

6.6 2D-Western Blot

A la membrana de nitrocelulosa se le adicionó 50 ml de leche al 5% y se dejó O.N. a 4° C para su bloqueo. A la mañana siguiente se removió la leche y se lavó la membrana con PBS pH 7.0, en total fueron 4 lavados de 5 minutos cada uno con agitación rápida. Una vez terminados los lavados se procedió a adicionar el anticuerpo primario α TveIF-5A de conejo en una dilución 1:1000 y se dejó en agitación suave durante 2 horas. Después el anticuerpo primario fue removido y se dieron lavados con PBS-Tween 0.1%.

Se agregó el anticuerpo secundario Cabra anti conejo HRP en una dilución 1:3000 y se incubó durante 1 hora a T.A. Posteriormente se dieron 5 lavados con PBS pH 7.0- Tween-20 al 0.1%. Por último, la membrana fue revelada por quimioluminiscencia usando el kit ECL de GE Healthcare Life Sciences y utilizando el fotodocumentador QuemiDoc (Biorad).

6.7 Obtención de extractos citoplásmicos de *T. vaginalis* y células HeLa

100 x 10⁶ parásitos ó células HeLa se centrifugarón a 1800 rpm durante 5 min a 4°C y se desechó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió con 1 ml de PBS pH 7.0 frío y se pasó a un tubo eppendorf de 1.5 ml. Se realizaron 2 lavados más con 1 ml de PBS pH 7.0 y se centrifugaron por 5 minutos a 18000 rpm a 4°C en cada lavado. Se volvió a dar un spin de 14000 rpm por 1 minuto para eliminar el PBS restante. Se agregó 400 µl de amortiguador A frío (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF) se pipeteo suavemente hasta homogenizar y se incubaron por 15 min a 4°C. Una vez transcurrido el periodo de incubación se adicionó 25 µl de Nonidet P-40 (USB®) al 10% más 2 µl de coctel de inhibidores 25x (Roche), se homogenizaron y se centrifugaron durante 1 min a 14000 rpm.

El sobrenadante, el cual contenía las proteínas citoplásmicas fue transferida a un tubo eppendorf nuevo. Para observar la integridad de los extractos se corrió un gel SDS-PAGE al 12% que fue teñido con Azul de Coomassie.

6.8 Transcripción in vitro

Se preparó una mezcla utilizando los siguientes reactivos: 2 µl Amortiguador 10x, 2 µl ATP, 2 µl GTP, 2 µl CTP, 1.5 µl UTP (sin marca), 0.5 µl UTP (biotinilado), 8 µl de DNA producto de la hibridación, 2 µl de la enzima T7 la cual fue adicionada en hielo. La mezcla preparada es incubada durante 37 °C por un periodo de 4 horas. Una vez terminada la incubación se adicionó 1 µl de DNasa y se incubó a 37 °C durante 20 minutos.

Posteriormente, se precipitó el RNA utilizando los siguientes reactivos:

15 µl de Acetato de Sodio

115 µl de H₂O del kit Ambion

300 µl de etanol grado molecular

Después, se mezcló por inversión leve y se dejó precipitar O.N. a -70 °C. Al día siguiente la mezcla se colocó en hielo para su descongelación y se centrifugó a 13 000 rpm durante 25 min a 4°C, el sobrenadante se decantó y la pastilla se dejó secar a T.A, se resuspendió en 20 µl de agua libre de RNAsa previamente calentada a 65 °C por 10 min. Por último, la cámara de electroforesis se trató con benzal para evitar la degradación del RNA y se preparó un gel de agarosa al 3 % con TBE 1x y H₂O DEPC utilizando como amortiguador de corrida TBE 0.5x H₂O DEPC.

6.9 Ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA)

Para determinar si la proteína TveIF-5A es capaz de unirse a todas las mutantes del extremo 3'UTR del RNAm de *tvcp39* se realizaron ensayos de cambio de movilidad electroforética.

La concentración de proteínas fue considerada como 20 µg/µl para TveIF-5A recombinante madura y 50 µg/µl para TveIF-5A recombinante precursora y 20 µg/µl de extractos citoplásmicos de *T. vaginalis* y 30 µg/µl de células HeLa.

Las proteínas fueron incubadas durante 10 minutos a T.A junto con un amortiguador de unión (BB5x), después se adicionaron las sondas obtenidas en la transcripción *in vitro* en una concentración de ≈ 300 ng, las mezclas son incubadas durante 25 minutos a 4°C. Posteriormente, se adicionó 1.3 µl de heparina (100 mg/ml) a cada muestra y se incubó por 10 minutos a T.A, se agregó 4 µl del amortiguador de muestra EMSA (“amortiguador de carga” del kit Ambion) con el colorante para ácidos nucleicos RedGel a cada tubo para su visualización. Las muestras fueron analizadas en geles de agarosa al 1.35%.

La electroforesis se realizó en una cámara vertical, previamente tratada con benzal, a 100 V hasta acabar la corrida en amortiguador TBE/DEPC 0.5x pH 7.5. El gel se visualizó en el fotodocumentador QuemiDoc utilizando la luz UV.

7 RESULTADOS

7.1 Análisis *in silico* de los EREs del 3'UTR de *tvcp39* mutantes

Para conocer el efecto de las mutaciones puntuales en cada uno de los nucleótidos que conforman el ERE del 3'UTR de *tvcp39*, se realizó un análisis bioinformático utilizando el programa "mfold" donde se analizaron las estructuras secundarias de tallo-burbuja y se determinó el valor de ΔG de cada una de ellas.

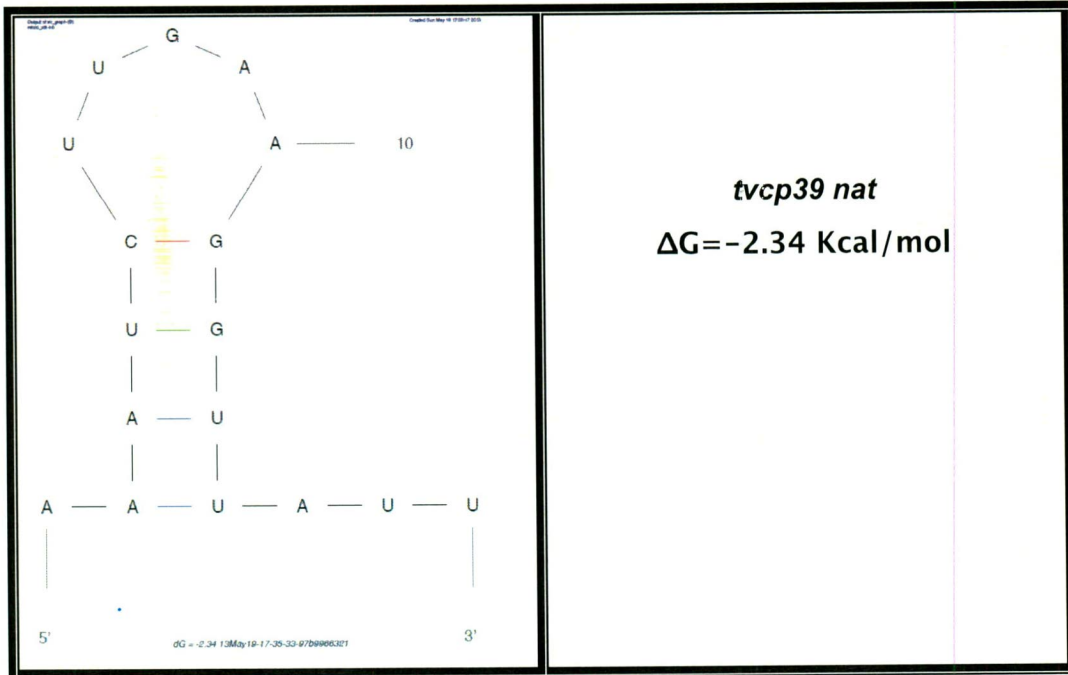
De todas las mutaciones ensayadas solo cuatro de ellas conservaron la estructura de tallo burbuja así como una ΔG negativa. Se decidió conservar estas cuatro mutantes ya que sus valores son similares al de la estructura tallo-burbuja del ERE del 3'UTR de *tvcp39* nativo y queríamos conservar la misma estructura secundaria para no tener variaciones en nuestro estudio. (Fig. 3).

Figura 3 Análisis del ERE del 3'UTR de *tvcp39* y sus mutantes.

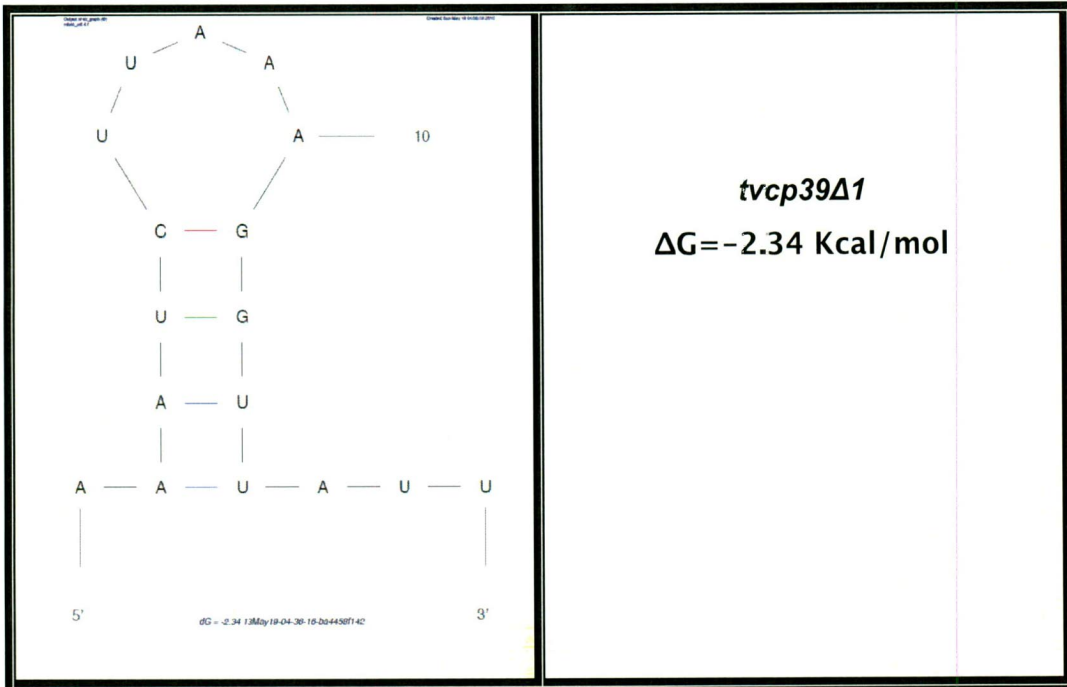
Modelajes de la secuencia ERE del 3'UTR de *tvcp39* y sus mutantes utilizando el programa "mfold" donde se muestran las estructuras tallo-burbuja así como la ΔG que presentan cada una de ellas.

Panel A) Estructura de tallo-burbuja del ERE de *tvcp39* nativo cuya ΔG es de -2.34 Kcal/mol **B)** Estructura de tallo-burbuja de la primer mutante del ERE de *tvcp39* con una ΔG de -2.34 Kcal/mol **C)** Estructura de tallo-burbuja de la segunda mutante del ERE de *tvcp39* con una ΔG de -2.34 Kcal/mol **D)** Estructura de tallo-burbuja de la tercer mutante del ERE de *tvcp39* con una ΔG es de -2.41 Kcal/mol **E)** Estructura de tallo-burbuja de la cuarta mutante del ERE de *tvcp39* con una ΔG es de -3.49 Kcal/mol.

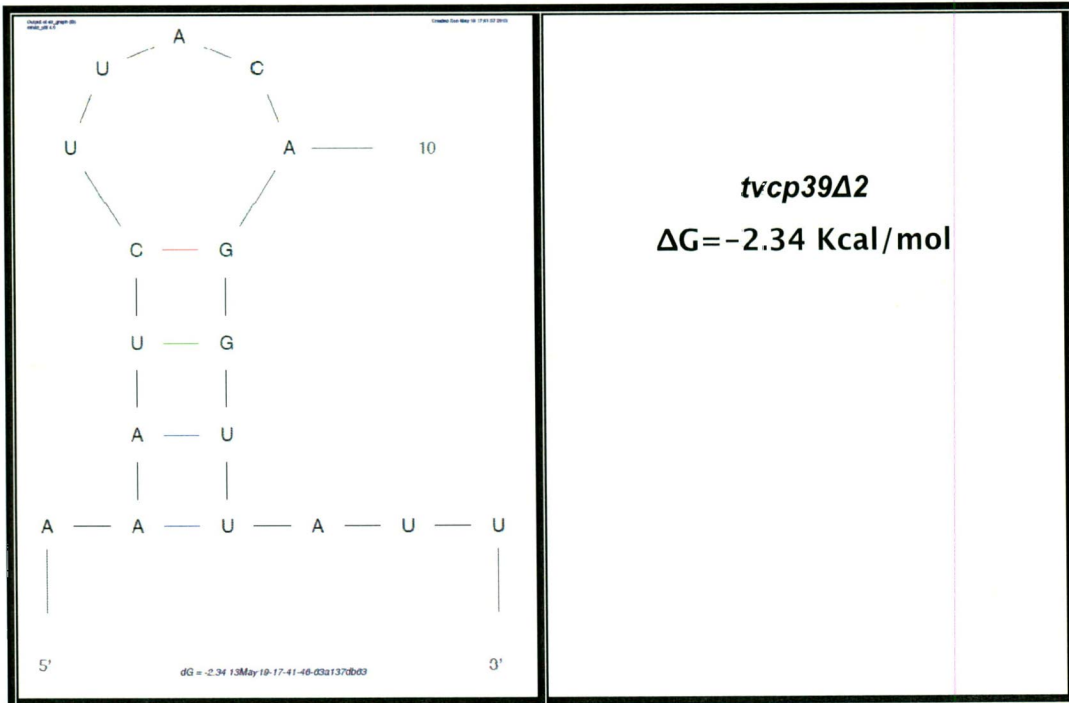
A)



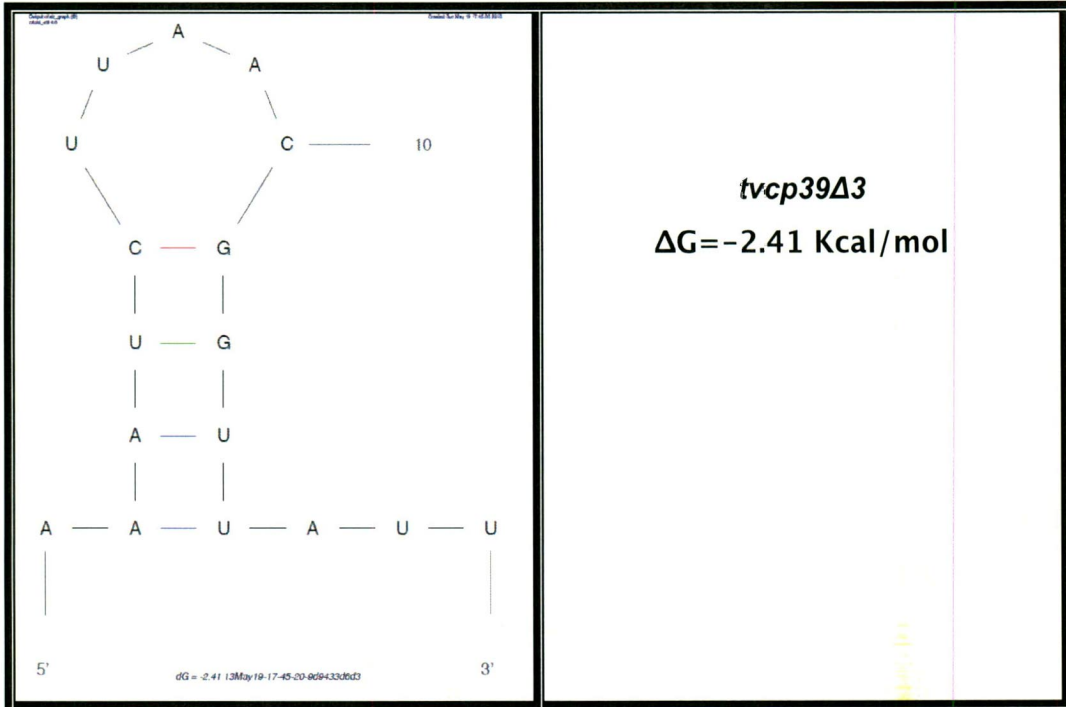
B)



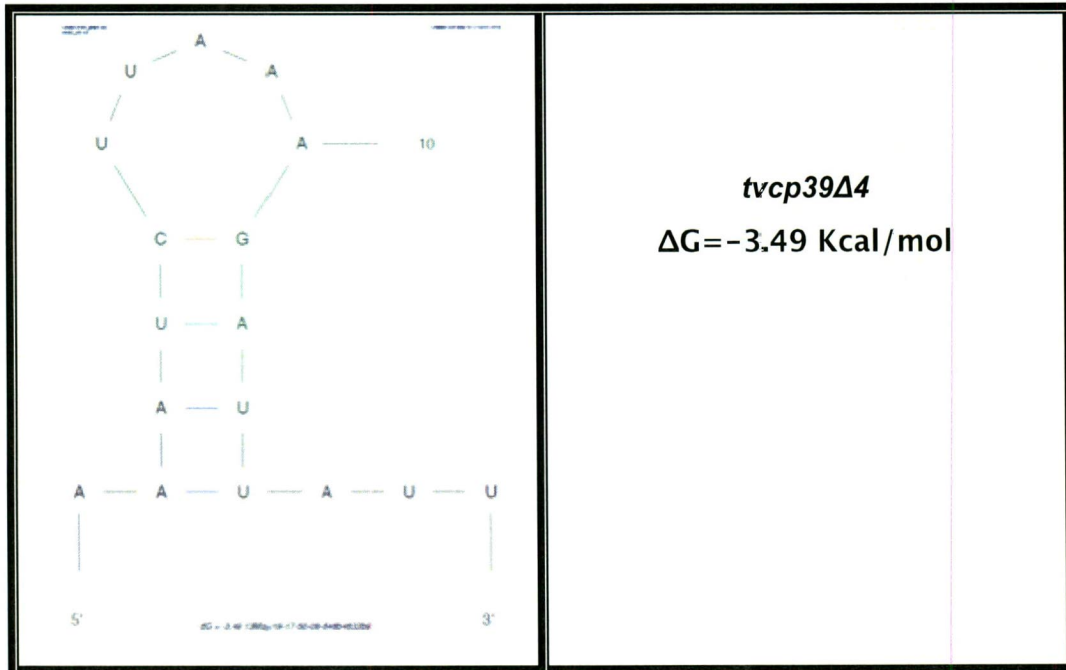
C)



D)



E)



7.2 Diseño de oligonucleótidos de los EREs de la región 3'UTR del RNAm de *tvcp39* con mutaciones puntuales

Una vez que identificamos las mutantes que utilizaríamos en nuestro trabajo se procedió al diseño de oligonucleótidos, los cuales fueron diseñados con las siguientes características: son 100 % complementarios, para que al hibridarlos se lograra una doble cadena de DNA necesaria para realizar la transcripción *in vitro*; presentan una secuencia promotora mínima necesaria para llevar a cabo la transcripción y contiene repetidos de Guanidinas recomendado en el Kit MEGAscript (Ambion) para aumentar la eficiencia de la transcripción (Tabla 2).

Estos oligonucleótidos fueron primero hibridados en buffer TE (10 mM Tris-Cl pH 7.5, 1mM EDTA) y se utilizaron como templados en la transcripción *in vitro* para poder obtener los RNAm que fueron utilizados como sondas en los ensayos de movilidad electrofóretica (EMSA).

Tabla 2. Oligonucleótidos o iniciadores de los EREs de la región 3'UTR del RNAm de *tvcp39* con mutaciones puntuales.

Iniciadores		Secuencia
tvcp39 nativo	S	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG TTT AGA ATT TCC AAT AA 3'
	A	3' ATT ATG CTG AGT GAT ATC CCC AAA TCT TAA AGG TTA TT 5'
tvcp39Δ1	S	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG TTT AGA A C T TCC AAT AA 3'
	A	3' ATT ATG CTG AGT GAT ATC CCC AAA TCT TAA AGG TGA TT 5'
tvcp39Δ2	S	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG TTT AGA AT G TCC AAT AA 3'
	A	3' ATT ATG CTG AGT GAT ATC CCC AAA TCT TAA AGG TTA TT 5'
tvcp39Δ3	S	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG TTT AGA ATT G CC AAT AA 3'
	A	3' ATT ATG CTG AGT GAT ATC CCC AAA TCT TAA AGG TTA TT 5'
tvcp39Δ4	S	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG TTT AGA ATT TC T AAT AA 3'
	A	3' ATT ATG CTG AGT GAT ATC CCC AAA TCT TAA AGG TTA TT 5'

S. Sentido, A. Antisentido

El recuadro con la base 1 a la 24 muestra la secuencia promotora mínima necesaria para la transcripción *in vitro* y el recuadro pequeño con una sola base indica la mutación.

7.3 Purificación de proteínas recombinantes TveIF-5A y TvDHS

Después, se llevó a cabo la purificación de las proteínas recombinantes TveIF-5A y TvDHS. La primera fue utilizada directamente en su forma precursora en los ensayos de retardamiento y la segunda fue necesaria para lograr a la proteína TveIF-5A en su forma madura mediante una hipusinación *in vitro* ya que es la enzima que cataliza la modificación postraduccional en *Trichomonas vaginalis*.

La clona *BL21* recombinante para TveIF-5A y *BL21 (DE3)* recombinante para TvDHS fueron cultivadas en medio LB a 37 °C e inducidas con 1 mM de IPTG por 4 horas. Transcurrido el tiempo de inducción las bacterias fueron lisadas, el lisado y el sobrenadante se analizaron en geles SDS-PAGE al 12 % teñidos con azul de Commassie para observar la inducción (Fig. 4 y 7).

Una vez comprobada la inducción se procedió a la purificación de las proteínas recombinantes utilizando la técnica de cromatografía de afinidad usando el cromatógrafo AKTA prime plus (Amersham Biosciences). El cromatograma nos permitió observar el pico cromatográfico que correspondía a la proteína TveIF-5Ar (Fig.5) y a la proteína TvDHSr (Fig. 8) y saber en cuales eluciones se encontraban las proteínas purificadas. Las eluciones fueron corridas en geles SDS-PAGE al 12% los cuales fueron teñidos con azul de Commassie obteniéndose una proteína de 46 kDa correspondiente a TveIF-5A (Figura 6 carriles 1,2 y 3) y una proteína de 43 kDa en el caso de TvDHS (Figura 9 carriles 1,2,3,4,5 y 6). Ambas presentando una pureza aceptable para proceder con los demás ensayos.

Figura 4. Inducción de la proteína recombinante TveIF-5A

Análisis por electroforesis en SDS-PAGE al 12% teñido con azul de coomassie.

Carriles: 1) extracto total no inducido 2) extracto total inducido

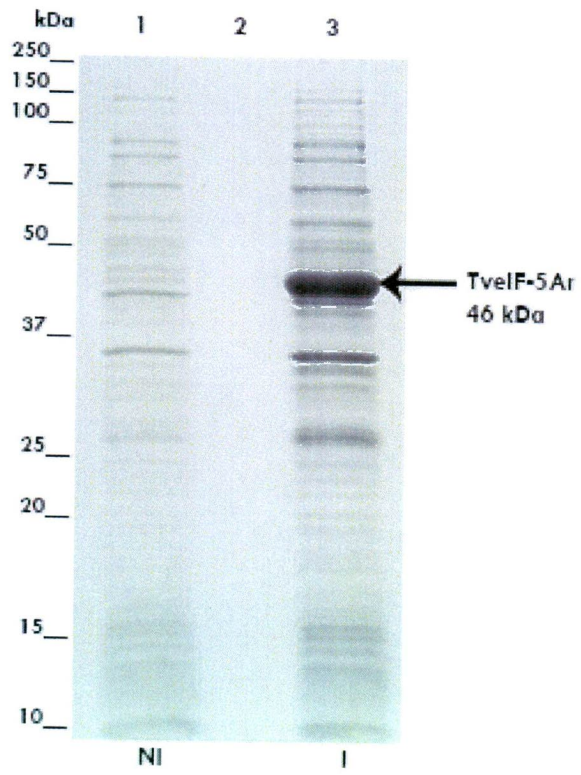


Figura 5. Cromatograma de la purificación de la proteína recombinante TveiF-5A

Cromatograma de la purificación de TveiF-5Ar donde el eje X muestra el tiempo de retención representados en minutos, y el eje Y la concentración de proteína en unidades de mili-absorbancia (mAu).

El pico cromatográfico que corresponde a la proteína purificada se indica con una flecha.

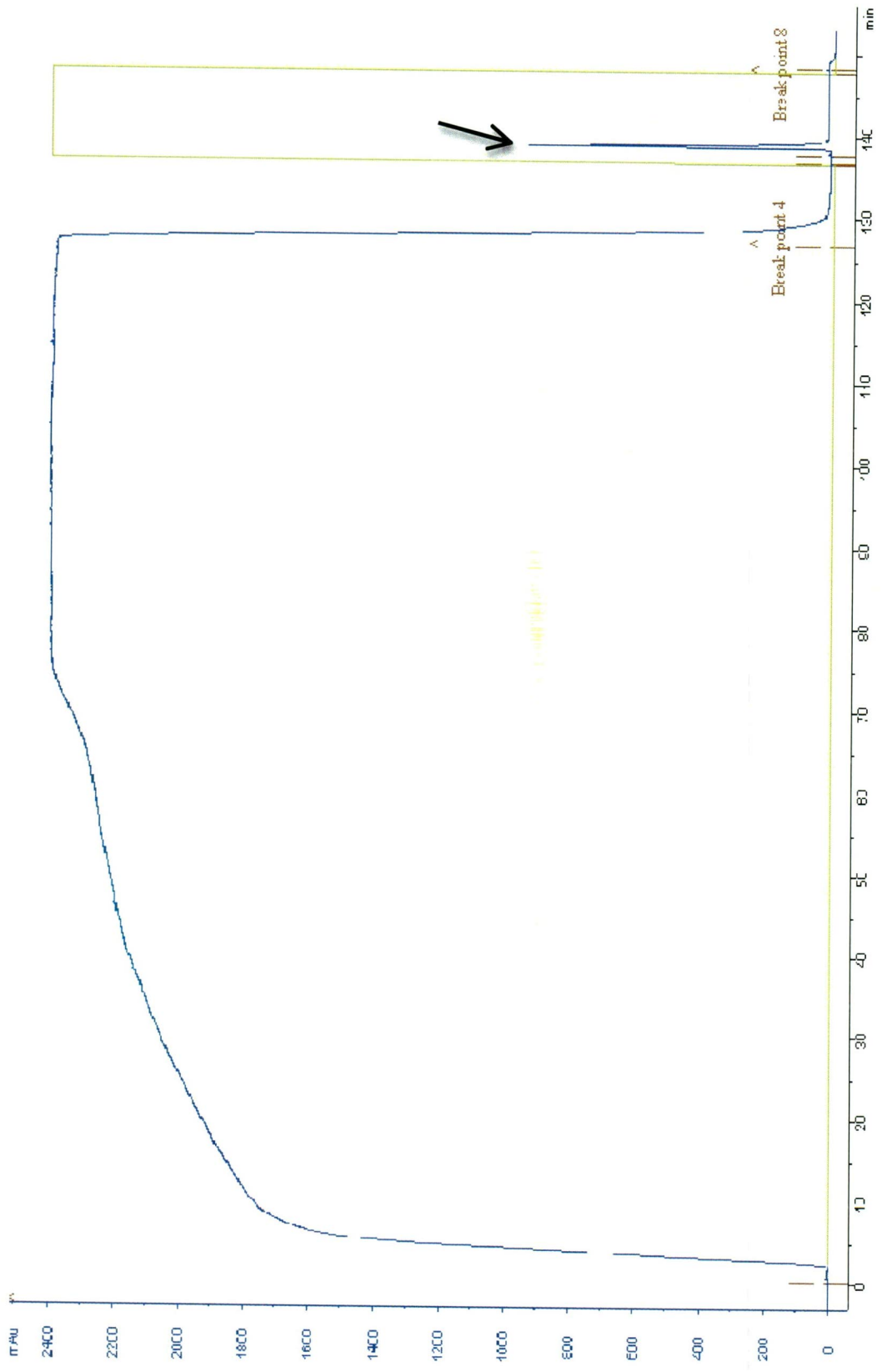


Figura 6. Análisis de la pureza de la proteína recombinante TveIF-5A

Análisis por electroforesis en SDS-PAGE al 12% teñido con azul de coomassie.

Carriles: 1) primera elución de 2) segunda elución 3) tercera elución 4) cuarta elución 5) quinta elución.

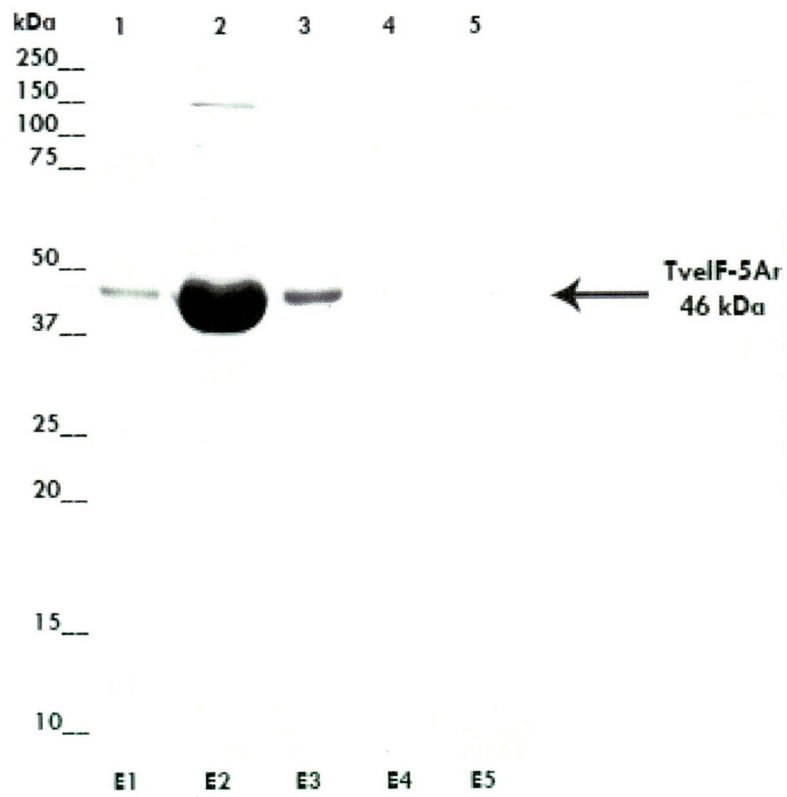


Figura 7. Inducción de la proteína recombinante TvDHS

Análisis por electroforesis en SDS-PAGE al 12% teñido con azul de coomassie.

Carriles: 1) extracto total no inducido 2) extracto total inducido

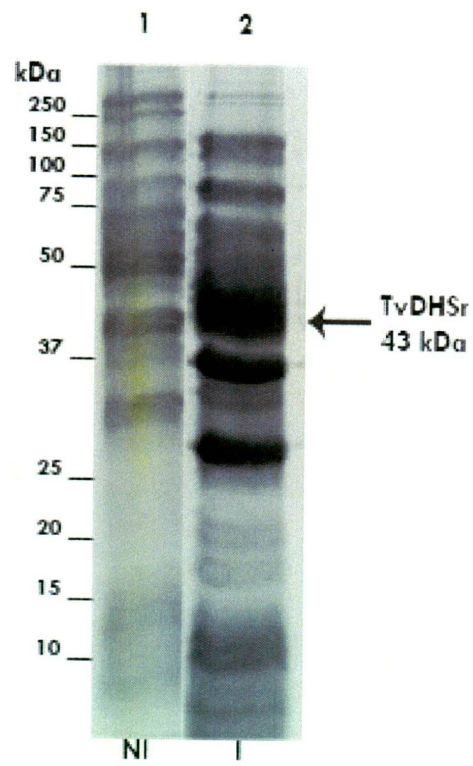


Figura 8. Cromatograma de la purificación de la proteína recombinante TvDHS

Cromatograma de la purificación de TvDHSr donde el eje X muestra el tiempo de retención representados en minutos, y el eje Y la concentración de proteína en unidades de mili-absorbancia (mAu).

El pico cromatográfico que corresponde a la proteína purificada se indica con una flecha.

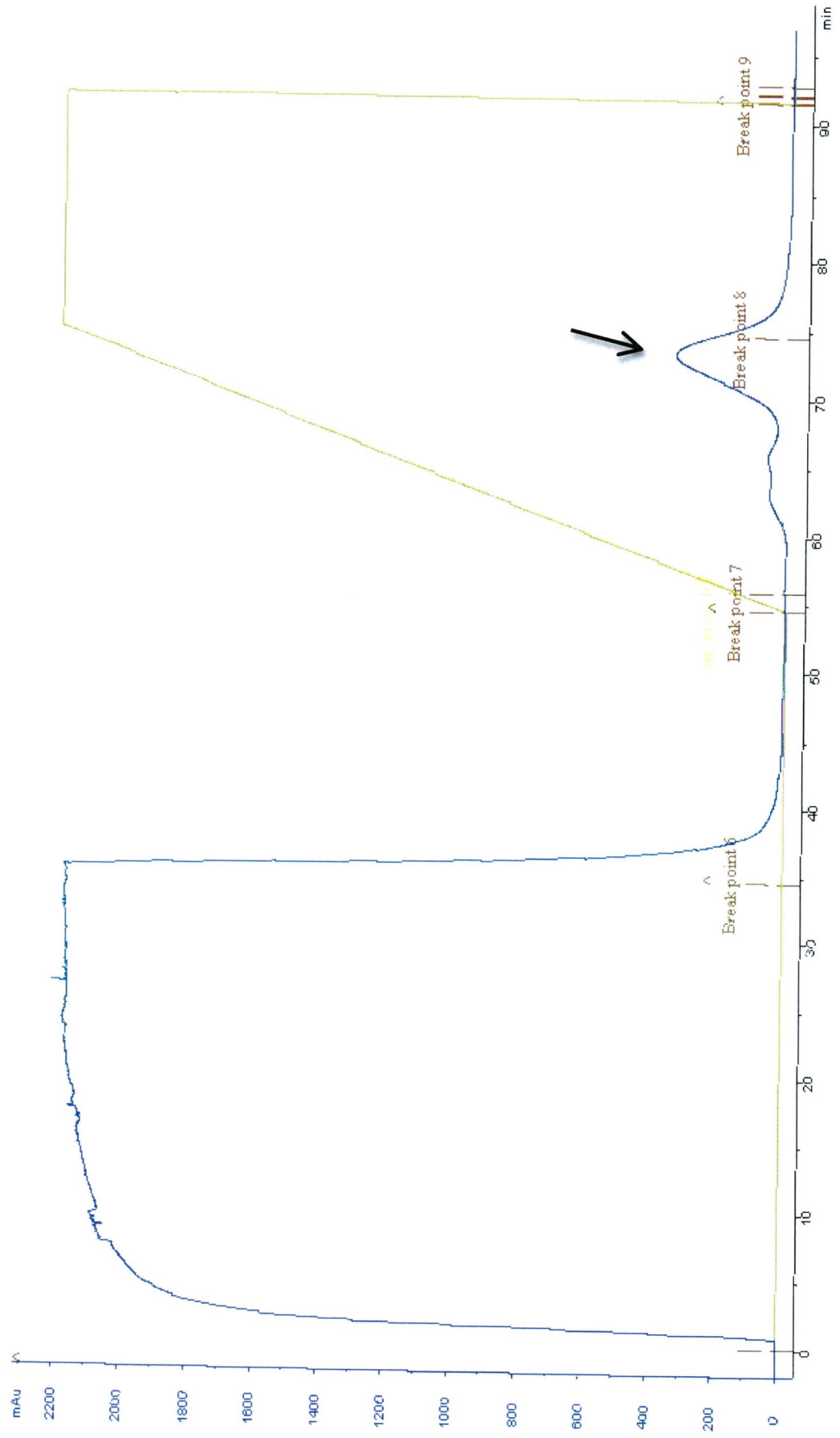


Figura 9. Análisis de la pureza de la proteína recombinante TvDHS.

Análisis por electroforesis en SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie. Carriles: 1) primera elución de 2) segunda elución 3) tercera elución 4) cuarta elución 5) quinta elución 6) sexta elución.

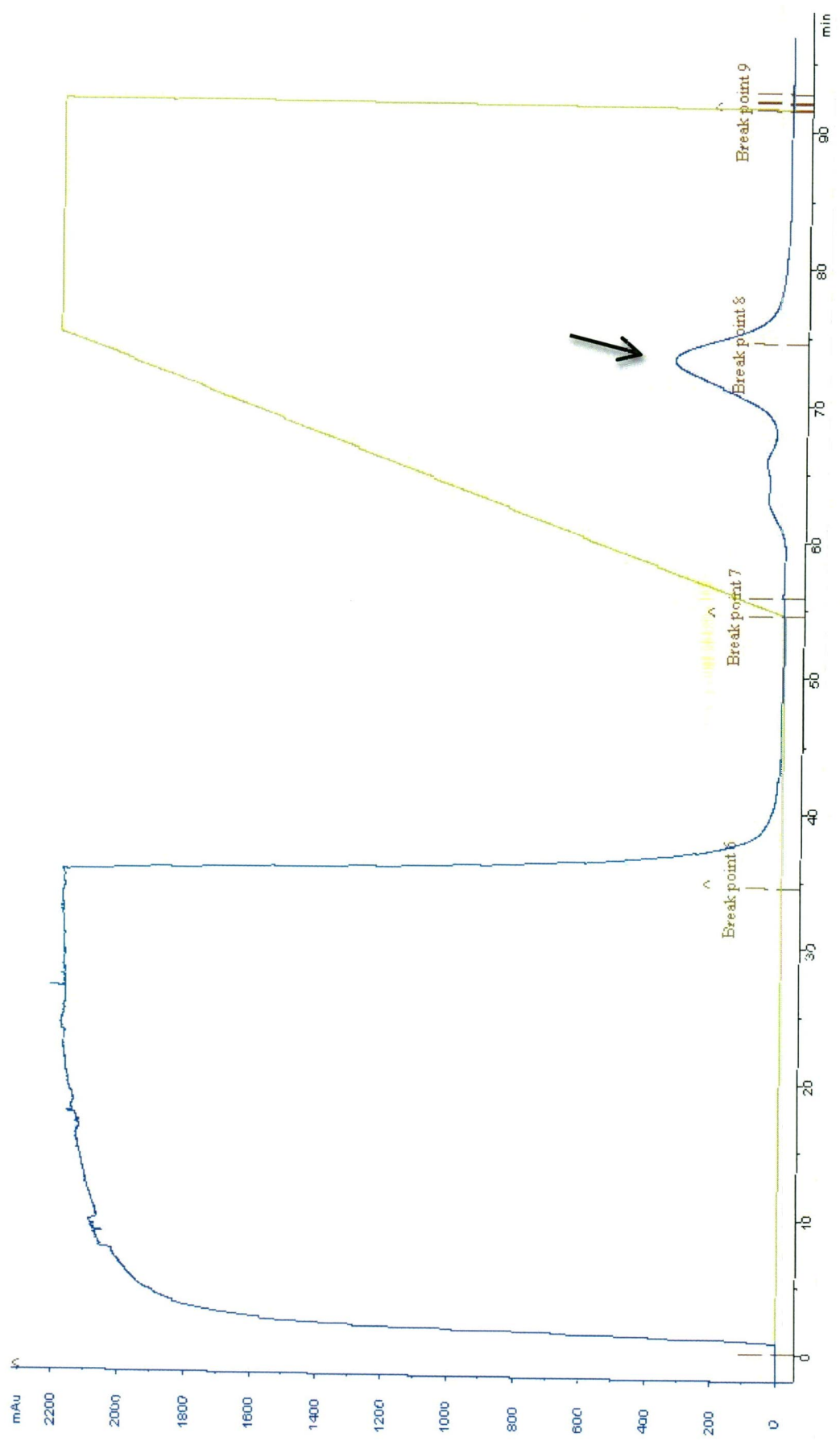
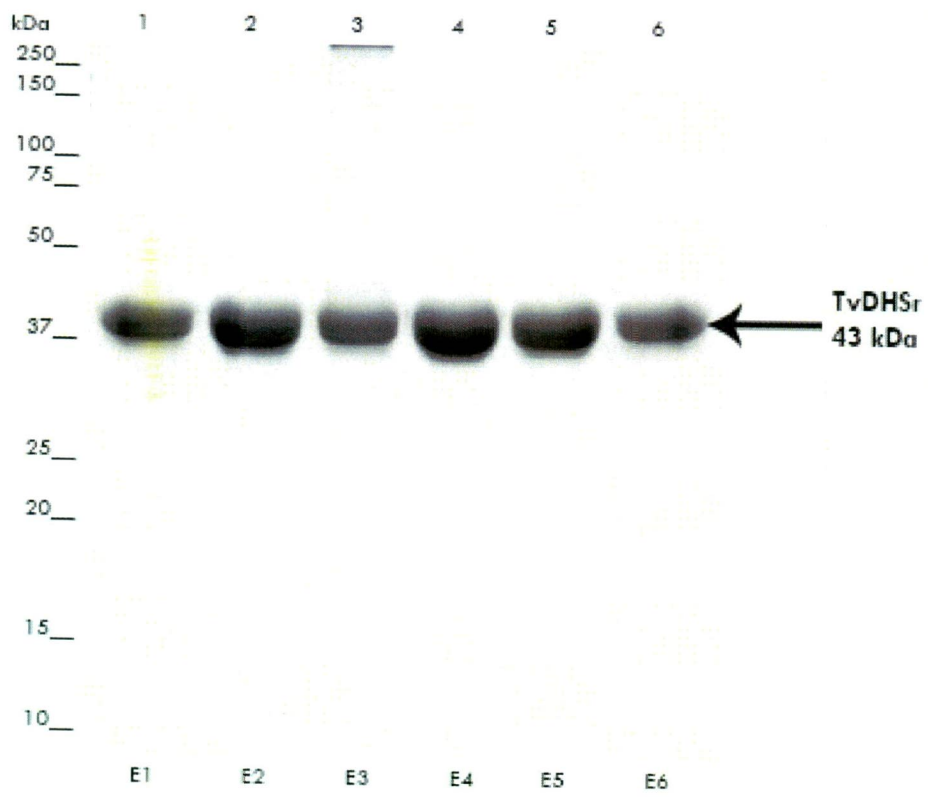


Figura 9. Análisis de la pureza de la proteína recombinante TvDHS.

Análisis por electroforesis en SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie. Carriles: 1) primera elución de 2) segunda elución 3) tercera elución 4) cuarta elución 5) quinta elución 6) sexta elución.



7.4 Hipusinación *in vitro* para la obtención de la proteína TveIF-5A madura

Una vez purificadas las proteínas recombinantes se realizó la hipusinación *in vitro* para obtener a la proteína recombinante TveIF-5A con la modificación postraducciona de hipusinación porque como ya se sabe esta modificación le confiere funcionalidad a la proteína y además, se ha demostrado que solo la proteína TveIF-5A madura o funcionalmente activa es capaz de interactuar con el elemento ERE ubicado en el extremo 3'UTR del RNAm de *tvcp39* (Carvajal-Gamez y col. en proceso) y ya que nosotros queríamos observar cuánto afectaban las mutaciones puntuales en algunos de los nucleótidos del elemento ERE del gen *tvcp39* en esta interacción era necesario realizar la hipusinación *in vitro*.

Para corroborar la correcta hipusinación de la proteína TveIF-5A se realizó una electroforesis en doble dimensión de la reacción de hipusinación, aprovechando la diferencia en punto isoeléctrico que le confiere la modificación postraducciona de hipusinación como fue reportado por Carvajal-Gamez y col. en el 2010.

El resultado que nosotros obtuvimos fue la detección de dos manchas de 46 y 47 kDa con un pI de 5.26 y 5.46 respectivamente, las cuales corresponden a TveIF-5A precursora y TveIF-5A madura (Fig. 10).

Para confirmar que las manchas obtenidas se trataran de la proteína TveIF-5A se realizó un Western Blot de 2D en donde un gel espejo fue transferido a una membrana de nitrocelulosa y utilizando anticuerpo específico anti-TveIF-5A se inmunodetectaron las mismas dos manchas con lo que corroboramos que es la proteína TveIF-5A, y que efectivamente se encuentra hipusinada (Fig. 11).

Figura 10. Electroforesis en doble dimensión de TveIF-5A hipusinada.

Análisis por electroforesis en SDS-PAGE en 2D utilizando tiras de pH de 3-10 al 15% teñido con plata, en donde se muestra dos manchas de diferente punto isoeléctrico que corresponden a las proteínas TveIF-5A precursora y madura.

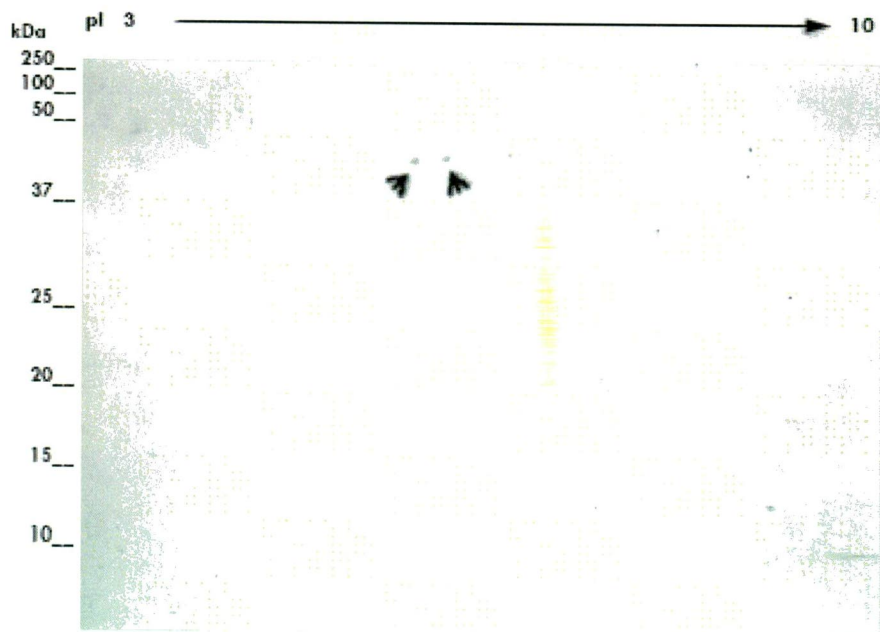
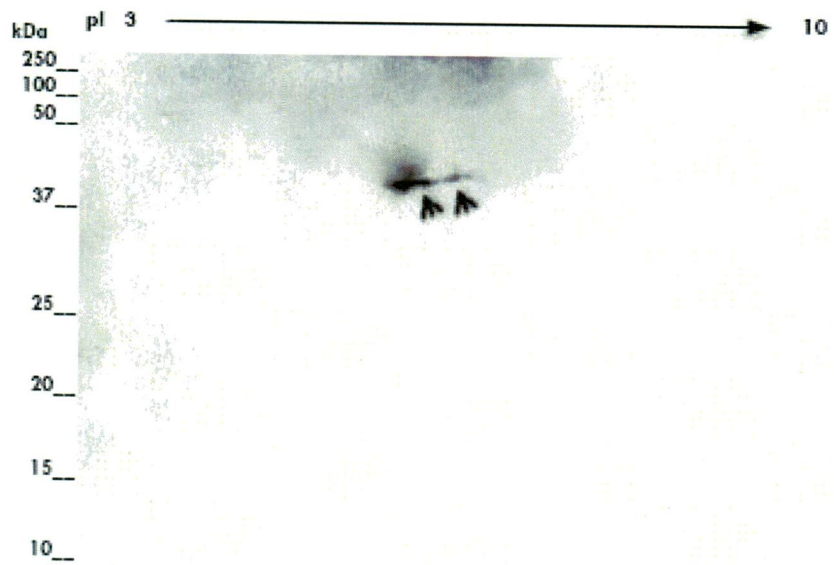


Figura 11. Inmunodetección de TveIF-5A hipusinada.

2D- Western blot utilizando anticuerpo específico anti-TveIF-5A para demostrar la presencia de TveIF-5A precursora y madura.



7.5 Ensayo de movilidad electroforética del ERE de *cox-2* e IRE-fer

Para proceder al primer ensayo de retardamiento que se realizó como control primero se tuvieron que obtener extractos citoplásmicos tanto de células HeLa como de *Trichomonas vaginalis*. Los extractos fueron analizados en geles SDS-PAGE al 12% teñidos con azul de Commassie para verificar su integridad (Fig. 12). Estos extractos fueron utilizados como controles en el ensayo de retardamiento debido a que habrá la formación de complejos.

Después se procedió a realizar la transcripción *in vitro* de las sondas que fueron usadas en el ensayo de movilidad electroforética que fue utilizado como control, las cuales fueron el RNAm de *cox-2* ya que presenta estructuras EREs en su extremo 3'UTR al igual que *tvcp39* y el gen IRE-fer ya que también se conoce que interacciona con proteínas de respuesta a hierro. Ambos genes fueron utilizados como controles positivos (Fig. 13).

El ensayo de movilidad electroforética control se realizó en gel de agarosa al 1.3 % teñido con SYBR green donde se puede observar la formación de dos complejos con la sonda de *cox-2* y extractos citoplásmicos de células HeLa (Fig. 14 carril 2).

También se da la formación de complejos al contacto de *cox-2* con extractos citoplásmicos de *T. vaginalis* (Fig. 14 carril 3).

Al igual que lo reportado por Carvajal-Gamez en el 2011 la proteína TveIF-5A precursora no fue capaz de interactuar con el RNAm de *cox-2* (Fig. 14 carril 4) pero si con la proteína TveIF-5A madura, es decir aquella que presenta la modificación postraduccional de hipusinación (Fig 14 carril 5).

También se probó utilizando el RNAm del IRE-fer donde podemos observar la formación de complejos tanto con extractos citoplásmicos de *T. vaginalis* así como con extractos de células HeLa (Fig. 14 carriles 6 y 7).

7.6 Ensayo de movilidad electroforética de ERE con las mutaciones puntuales

Una vez teniendo el control se realizó la transcripción *in vitro* de las sondas ERE del 3'UTR de *tvcp39* y sus mutantes para obtener los RNAs que se utilizaría en el ensayo final, estos RNA fueron verificados mediante un gel de agarosa al 3% teñido con red gel (Fig 15)

Por último se realizó un ensayo de movilidad electroforética del ERE con las mutaciones puntuales en gel de agarosa al 1.35 % el cual fue teñido con Red Gel donde se observó la formación de complejos en el ERE de *tvcp39* nativo con la proteína TveIF-5A madura (Fig. 16 carril 4) como era de esperarse, así como en los EREs de las mutantes *tvcp39Δ1* y *tvcp39Δ2* (Fig. 16 carriles 7 y 10). En el caso de la mutante *tvcp39Δ3* aunque sigue habiendo interacción se puede observar una pequeña disminución en esta, tal vez debido a un cambio en la afinidad de unión (Fig 16. Carril 13).

De manera interesante, la interacción se vio abatida en la mutante *tvcp39Δ4* (Fig 16 carril 16) sugiriendo una participación específica de secuencia para la interacción con la proteína TveIF-5A.

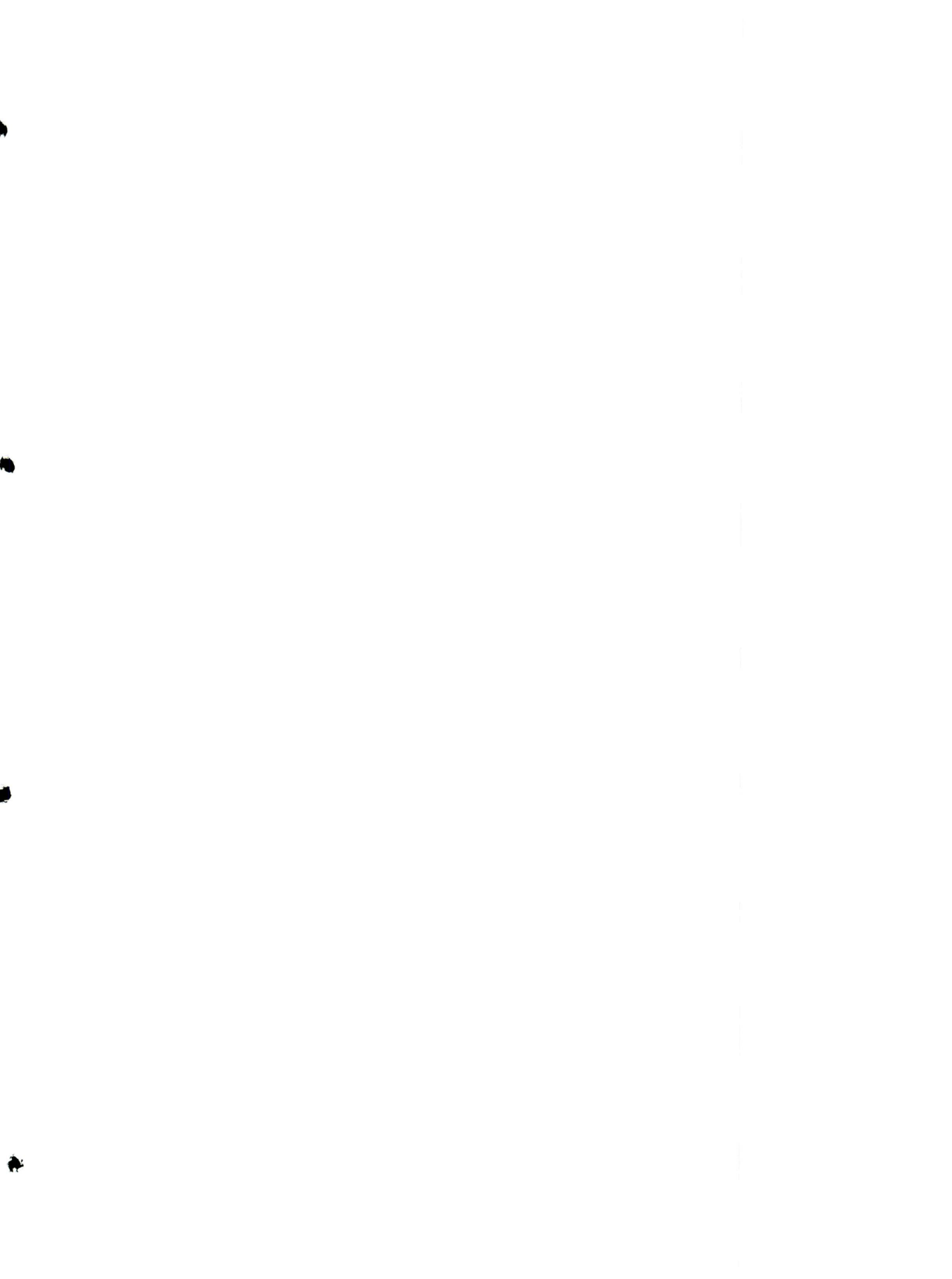
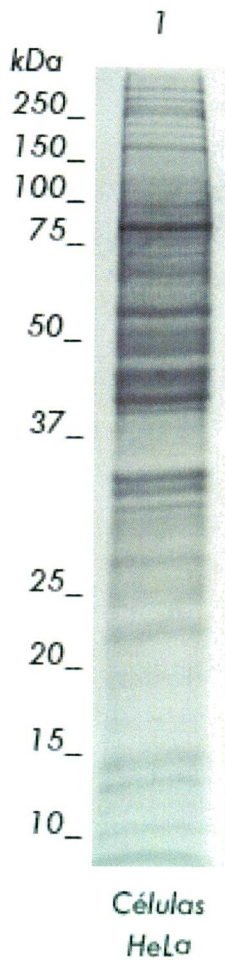


Figura 12. Extractos citoplásmicos de células HeLa y *T. vaginalis*.

La integridad de los extractos citoplásmicos se corroboró con geles SDS-PAGE al 12% teñidos con azul de coomassie. Panel A. Carril: 1) Extractos citoplásmicos de células HeLa. Panel B. Carril: 1) Extractos citoplásmicos de *T. vaginalis*.

A.



B.

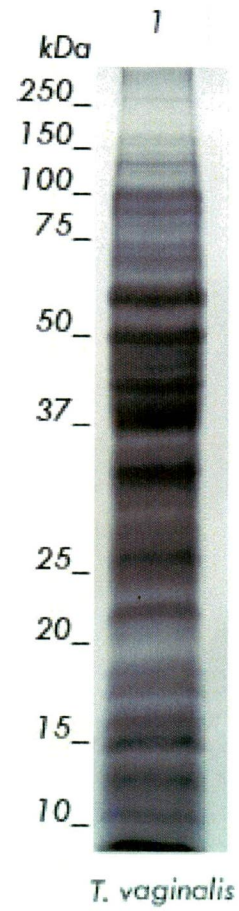


Figura 13. Transcripción *in vitro* de controles positivos *cox-2* e *IRE-fer*

Electroforesis en gel de agarosa al 3 % teñido con red gel en donde se puede observar la integridad de RNA. Carriles: 1) marcador de tamaño molecular en pb 2) sonda del RNAm de *cox-2*, 3) sonda del RNAm de *IRE-fer*.

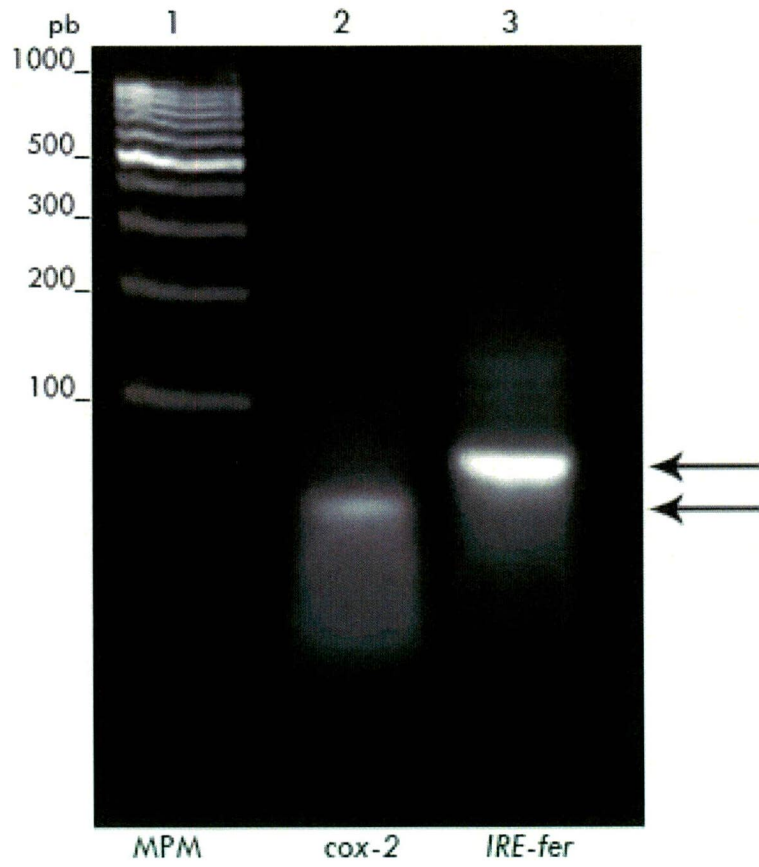


Figura 14. Ensayo de movilidad electroforética del ERE de cox-2 e IRE-fer
EMSA en gel de agarosa al 1.3 % teñido con SYBR Green.

1 2 3 4 5 6 7



Sonda libre	+	-	-	-	-	-	-
ERE cox-2	+	+	+	+	+	-	-
IRE-fer	-	-	-	-	-	+	+
Ex. citoplásmicos <i>T. vaginalis</i>	-	-	+	-	-	+	-
Ex. citoplásmicos de HeLa	-	+	-	-	-	-	+
TveIF-5A hipusinada	-	-	-	-	+	-	-
TveIF-5A precursora	-	-	-	+	-	-	-

Figura 15. Transcripción *in vitro* del ERE del 3'UTR de *tvcp39* y sus mutantes.

Electroforesis en gel de agarosa al 3 % teñido con red gel en donde se puede observar la integridad del RNA. Carriles: 1) marcador de tamaño molecular en pb 2) sonda del RNAm de 3'UTR de *tvcp39* nativo, 3) sonda del RNAm *tvcp39Δ1*, 4) sonda del RNAm *tvcp39Δ2*, 5) sonda del RNAm *tvcp39Δ3* y 6) sonda del RNAm *tvcp39Δ4*.

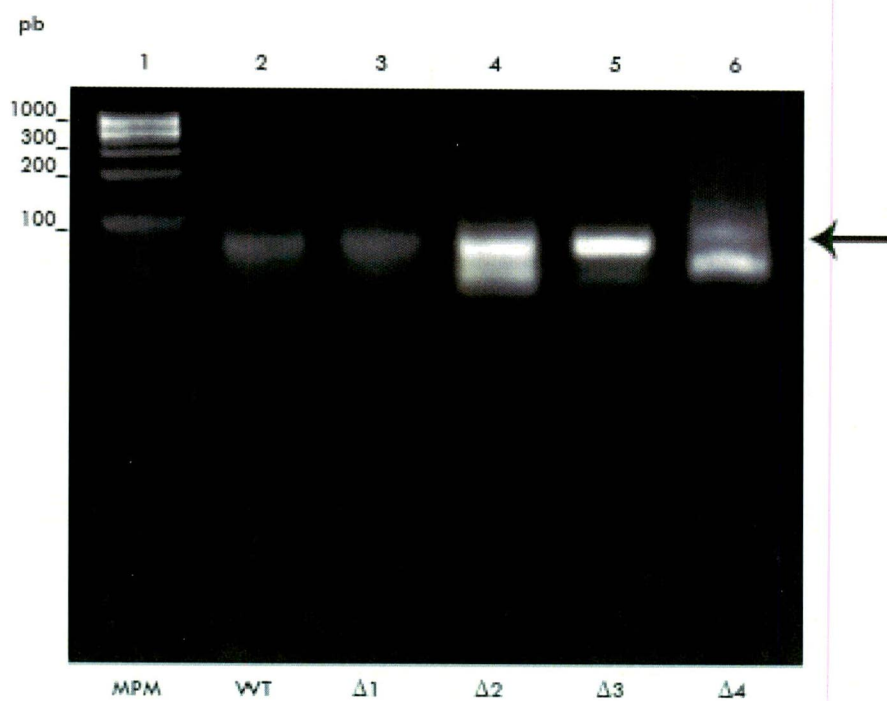
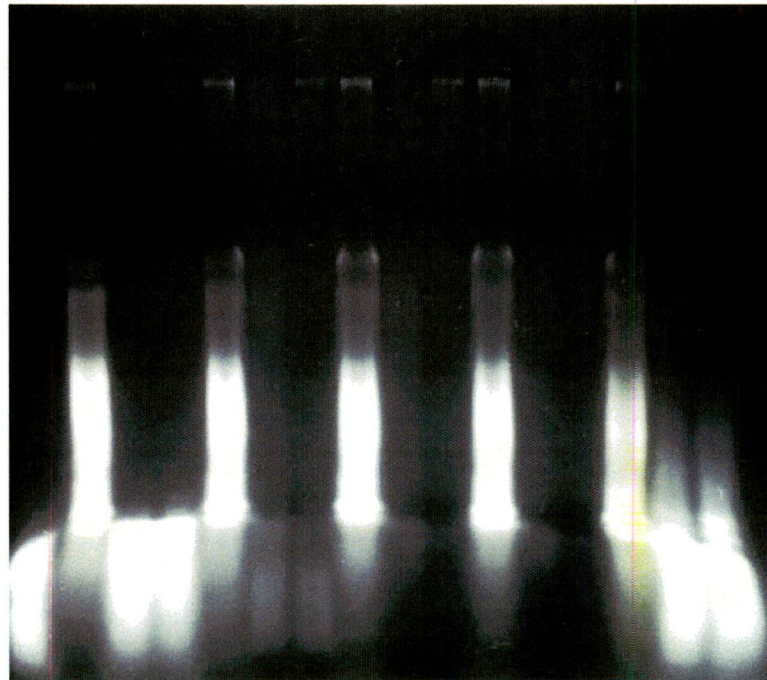


Figura 16. Ensayo de movilidad electroforética del ERE con las mutaciones puntuales.

EMSA en gel de agarosa al 1.35 % teñido con Red Gel

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



Sonda libre	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ERE tvcp39 wt	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ERE tvcp39 Δ1	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
ERE tvcp39 Δ2	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
ERE tvcp39 Δ3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
ERE tvcp39 Δ4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Ex. citoplásmicos de <i>T. vaginalis</i>	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
TveIF-5A precursora	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
TveIF-5A madura	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+

8 DISCUSIÓN

La regulación de la expresión génica presenta varios mecanismos de control, uno de los cuales se presenta a nivel post-transcripcional involucrado en el procesamiento y estabilidad del RNAm, los elementos regulatorios involucrados en este mecanismo son aquellos elementos estructurales que presenta el RNAm y proteínas específicas, mediante la unión de estos se puede lograr la estabilidad del RNAm y por lo tanto su eficiente traducción. En el RNAm se han caracterizado elementos de la secuencia que se encuentran en las regiones no traducidas (UTR) los cuales se encuentran en el extremo 3' o 5', se sabe que estas regiones pueden presentar varias conformaciones estructurales y/o secuencias específicas que serán reconocidas por proteínas. Los elementos que ya se han caracterizado en organismos eucariontes son elementos ricos en AU (AUBPs) y proteínas de unión AREs (ABPs), así como elementos de respuesta a hierro (IRE) y proteínas reguladoras de hierro (IRB), estos mecanismos se dan debido al reconocimiento de la secuencia presente en el RNAm, así como su estructura tipo tallo burbuja respectivamente.

La existencia de este tipo de regulación post-transcripcional en *Trichomonas vaginalis* ha sido respaldado por la presencia de un elemento de respuesta a hierro conocido como IRE de tipo tallo y burbuja en el extremo 5'UTR del RNAm del gen *tvcp4* y su interacción con proteínas de tipo IRP (Solano-González y col., 2007).

Las constantes interacciones entre el RNAm y las proteínas en los distintos niveles de control en la regulación génica controlan cada aspecto y etapa de maduración del RNAm a nivel de transporte, localización, estabilidad lo cual se reflejara en la eficiente traducción de la proteína, en este caso nos referimos a la proteína TvCP39, la cual es un factor de virulencia que participa en la citotoxicidad de *T. vaginalis*, el reconocimiento de la secuencia específica RNAm de esta proteína que interacciona con la proteína TveIF-5A es importante para tratar de comprender cuál es el proceso de regulación génica de este gen en particular.

Mediante mutaciones en el extremo 3'UTR se ha demostrado que puede afectar la expresión del gen del cloroplasto el cual presenta una secuencia y estructura tallo-burbuja en el extremo 3'UTR la cual interacciona con proteínas específicas, en estudios realizados en la planta de tabaco donde utilizaron reporteros que carecen de esta estructura observando que afecta la unión de estos dos elementos *in vitro*, lo cual afecta el metabolismo de la planta (*in vivo*), planteando la posibilidad de que esta interacción podría influenciar en el rendimiento transcripcional (Monde y col. 2000).

9 CONCLUSIÓN

El presente trabajo nos permitió tener una idea mas clara de que nucleótidos presentes en la secuencia ERE del RNAm de *tvcp39* pudieran estar participando en la interacción con la proteína TveIF-5A en *T. vaginalis*.

La mutación puntual en la secuencia de *tvcp39Δ3* que presentaba el cambio en el nucleótido T por G en la burbuja presentó una disminución en la interacción con la proteína TveIF-5A madura.

La mutación puntual en la secuencia de *tvcp39Δ4* que presentaba el cambio en el nucleótido C por T en el tallo, afectó la interacción con la proteína TveIF-5A.

Esto sugiere que estos nucleótidos se encuentran participando directamente en la interacción con la proteína TveIF-5A, por lo tanto el nucleótido C en la secuencia AGA ATT TCC AAT AA del 3'UTR ERE del RNAm de *tvcp39* es indispensable para la interacción con la proteína TveIF-5A en *T. vaginalis*

10 PERSPECTIVAS

1. Realizar mutaciones de secuencia en el 3'UTR ERE del RNAm de *tvcp39* para determinar de manera mas específica los nucleótidos que participan en la interacción con TveIF-5A.
2. Determinar cualitativamente la afinidad de unión de las mutantes del ERE del RNAm de *tvcp39* que presentan las mutaciones puntuales.

11 BIBLIOGRAFIA

1. Liston, D.R., Johnson, P. J. (1998) Gene Transcription in *Trichomonas vaginalis*. Parasitol Today. 14: 261-265.
2. Torres-Machorro, A. L., Hernández, R., Sánchez, J., López-Villaseñor, I. (2006) The 5S ribosomal RNA gene from the early diverging protozoa *Trichomonas vaginalis*. Mol. Biochem Parasitol. 145 (2): 269-273.
3. Pegg, A. E. (1988) Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and as a target for chemotherapy. Cancer Research. 48 (4):759-774.
4. Schuber, F. (1989) Influence of polyamines on membrane functions. Biochem. J. 260:1-10.
5. Kang, H. J., Song, O.H., Ryu, S. J., Shin, J. M., Kim, J. M., Cho, Y. S., Alderete, J.F., Ahn, M.N., Min, D. Y. (2006) *Trichomonas vaginalis* promotes apoptosis of human neutrophils by activating caspase-3 and reducing Mcl-1 expression. Parasite Immunology. 28 (9):439-446.
6. Dailey, D.C., Chang T.H., Alderete, J. F. (1990) Characterization of *Trichomonas vaginalis* haemolysis. Parasitology. 2:171-175.
7. Fiori, R., Rocchigiani, A. M., Cappuccinelli, P. (1993). *Trichomonas vaginalis* haemolysis: Evidence of functional pores formation on red cell membranes. FEMS Microbiology Letters. 109 (1):13-18.
8. Lehker MW, Arroyo R, Alderete JF. (1991) The regulation by iron of the synthesis of adhesins and cytoadherence levels in the protozoan *Trichomonas vaginalis*. J, Exp Med. 174, 311.
9. Lehker MW y Alderete JF. (2000). Biology of Trichomoniasis. Curr. Opin Infect Dis. 13, 37.
10. Arroyo R, González-Robles A, Martínez Palomo, Alderete JF (1993) Signalling of *Trichomonas vaginalis* for ameboid transformation and adhesion synthesis follows cytoadherence. Mol. Microbiol. 2, 299.

11. Petrin D., Delgaty K., Bhatt R., and Garber G., (1998) Clinical and Microbiological Aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Reviews* Vol.11 p. 300-317.
12. Gomez- Conde E, Mena-López R, Hernández-Jauregui P, González-Camacho M. (2000) *Trichomonas vaginalis*; chromatin and mitotic spindle during mitosis. *Exp. Parasitol.* 96, 130.
13. Figueroa-Angulo EE, Rendón-Garandilla FJ, Puente-Rivera J, Calla-Choque JS, et al. (2012) The effects of environmental factors on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. *Microbes and Infection* 14, 1411-1427.
14. Hernández-Gutierrez R, Avila-Gonzalez L, Ortega-López J, et al. (2004) *Trichomonas vaginalis*: characterization of a 39-kDa cysteine proteinase found in patient vaginal secretions. *Experimental Parasitology* 107: 125-135.
15. Ramón-Luing LA, Rendón-Gandarilla FJ, Puente-Rivera J, et al. (2011) Identification and characterization of the immunogenic cytotoxic TvCP39 proteinase gene of *Trichomonas vaginalis*. *The International Journal of biochemistry and Cell Biology* 43: 1500-1511.
16. Schwebke JR, Burgess D., (2004) Trichomoniasis. *Clinical Microbiology Reviews* p. 794-803.
17. Carvajal-Gamez BI, Arroyo R, Camacho-Nuez M, Lira R et al. (2011) Putrescine is required for the expression of *eif-5a* in *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 180: 8-16.
18. Carvajal-Gamez B, Arroyo R, Lira R, López-Camarillo C, et al. (2010) Identification of two novel *Trichomonas vaginalis eif-5a* genes. *Infection, Genetics and Evolution.* 10, 284.
19. Carvajal-Gamez BI, Quintas-Granados LI, Arroyo R, Mendoza-Hernández G, Alvarez-Sánchez ME. (2012) Translation initiation factor eIF-5A, the hypusine-containing protein, is phosphorylated on serine and tyrosine and O-glycosylated in *Trichomonas vaginalis*. *Microbial Pathogenesis* 52, 177-183.
20. Zuker Michael (1993) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 31 (13) 3406-3415.
21. Carlton JM, Hirt RP, Silva JC, Delcher AL, Schatz M, Zhao Qi, et al. (2007) Draft Genome Sequence of the Sexually Transmitted Pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science*, 315(5809): 207-212.

22. Parker MT, Gerner EW. (2002) Polyamine-mediated post-transcriptional regulation of COX-2. *BIOCHIMIE* 84, 815-819.
23. Solano-González E, Burrrola-Barraza E, León-Sicairos C, Avila-González L, Gutiérrez-Escolano L. (2007) The trichomonad cysteine proteinase TVCP4 transcript contains an iron-responsive element. *FEBS Letters* 581, 2919-2928.
24. Torres-Romero JC, Arroyo R. (2009) Responsiveness of *Trichomonas vaginalis* to iron concentrations : Evidence for a post-transcriptional iron regulation by an IRE/IRP-like system. *Infection, Genetics and Evolution* 9, 1065-1074.
25. Xu Aiguo, Chen Kuang Yu. (2001) Hypusine Is Required for a Sequence-specific Interaction of Eukaryotic Initiation Factor 5A Postsystematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment RNA. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol 276, No.4, 2555-2561.
26. Xu Aiguo, Jao David-Li, Chen Kuang Yu (2004) Identification of mRNA that binds to eukaryotic initiation factor 5A by affinity co-purification and differential display. *Biochem. J.* 384, 585-590.
27. Vázquez-Carrillo LI, Quintas Granados LI, Arroyo R, Mendoza Hernández G, González-Robles A et al. (2011) The effect of Zn²⁺ on prostatic cell cytotoxicity caused by *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Integrated Omics*.
28. Quintas-Granados LI, Ortega-Lopez J, Mendoza-Hernández G, Arroyo R, Alvarez-Sánchez ME, (en proceso) Hypusination of TveIF-5A is performed only by the deoxyhypusine synthase from *Trichomonas vaginalis*.
29. Kang HA, Hershey JW. (1994) Effect of initiation factor eIF-5A depletion on protein synthesis and proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol.Chem.* 269, 3934-3940.
30. Hobbs MM, Seña AC. (2013) Modern diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection. *Sex Transm Infect.* 89,434-438.
31. Alderete JF, Crouch ML, Arroyo R. (2004) Mecanismos de patogénesis de la tricomonosis: La enfermedad de transmisión sexual no viral número uno causada por *Trichomonas vaginalis*. *La frontera: genética molecular de la enfermedad*. Capitulo 6. Tomo I. Editado por Luna-Arias J.P y Orozco-Orozco E. Editorial IPN México. 167.

32. Alderete JF, Benchimol M, Lehker MW, Crouch ML. (2002). The complex fibronectina *Trichomonas vaginalis* interactions and trichomoniasis. *Parasitol Int.* 51, 285.
33. Alderete JF, Garza GE. (1988) Identification and properties of *Trichomonas vaginalis* proteins involved in cytoadherence. *Infect Immun.* 56, 28.
34. Álvarez-Sánchez E, Carvajal-Gamez BI, Solano-González E, García A, Alderete J, Arroyo R. (2008). Polyamines Depletion Down-regulated Gene Expression of the *Trichomonas vaginalis* Cytotoxic 65 kDa CP65 Cystein Proteinase. *J. Biochem. Cell.* 10, 1016.
35. Moreno- Brito V, Yáñez-Gómez C, Meza-Cervantez P, Avila- González L, Rodríguez MA, Ortega-López J, González-Robles A, Arroyo R.(2005). A *Trichomonas vaginalis* 120 kDa protein with identity to hydrogenosome pyruvate:ferrodoxin oxidoreductase is a surface adhesin induced by iron. *Cell Microbiol.* 7, 245.
36. Park MH, Lee YB, Joe Ya. (1997). Hypusine is essential for eukaryote cell proliferation. *Biol Signal.* 6, 115.
37. Park MH. (1989). The essential role of hypusine in eukaryotic translation initiation factor 4D (eIF-4D). Purification of eIF-4D and its precursors and comparison of their activities. *J Biol Chem.* 264, 18531.

12 APÉNDICE

Medio Luria Bertani (LB)

Medio LB	20 g
Agua destilada	1000 ml

Esterilizar con autoclave.

Ampicilina 100 mg/ml

Ampicilina	0.1 g
Agua inyectable	1 ml

Se filtra con membrana de 0.22 μm para esterilizarse.

Se almacena a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se protege de la luz.

Isopropiltio- β galactopiranosido 1 M (IPTG)

IPTG	0.238 g
Agua inyectable	1 ml

Se filtra con membrana de 0.22 μm para esterilizarse.

Se almacena a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se protege de la luz.

Complete 25x

1 pastilla	
Agua inyectable	2 ml

Amortiguador de unión (para GST)

Na_2HPO_4	2.84 g
NaCl	8.76 g

Se ajusta el pH a 7.6. Se afora a 1 lt con agua destilada.

Filtrarlo por 0.22 μm y desgasificarlo

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

Tris-base 18.165 g

SDS 0.4 g

Ajustar el pH a 8.8

Aforar a un volumen de 100 ml con agua destilada.

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

Tris-base 6.055 g

SDS 0.4 g

Ajustar el pH a 6.8

Aforar a un volumen de 100 ml con agua destilada.

Persulfato de Amonio al 10 % (PSA)

PSA 1.0 g

Agua destilada 10 ml

Almacenar a -20 °C protegido de la luz

Buffer de corrida 10x (Stock)

Tris base 30.3 g

Glicina 144 g

SDS 10 g

Disolver en 1 lt de agua destilada.

Almacenar a T.A.

Buffer de corrida 1x

Buffer de corrida 10x 100 ml

Agua destilada 900 ml

Solución colorante de proteínas (Azul brillante de Coomassie) 0.05%

Metanol 500 ml

Ácido acético glacial 100 ml

Agua destilada 400 ml

Azul de Coomassie 0.5 g

Disolver toda la noche. Filtrar con papel Whatman

Almacenar a T.A.

Solución decolorante de geles de poliacrilamida

Metanol 165 ml

Ácido acético glacial 50 ml

Agua destilada 785 ml

Almacenar a T.A.

PBS pH 7.0 10x

NaCl 80 g

KCl 2 g

Na₂HPO₄ 6.5 g

KH₂PO₄ 2 g

Se ajusta pH a 7.0 y se afora a 1 Lt con agua destilada. Se esteriliza por autoclave.

PBS pH 7.0 1x

NaCl 8 g

KCl 0.2 g

Na₂HPO₄ 0.65 g

KH₂PO₄ 0.2 g

Se ajusta pH a 7.0 y se afora a 1 Lt con agua destilada. Se esteriliza por autoclave.

Lecha al 5 %

Leche 5 g

PBS 1x pH 7.0 100 ml

PBS 1x pH 7.0 / Tween .1 %

Tween 100 % 500 µl

PBS 1x pH 7.0 500 ml

Buffer A (Extractos citoplásmicos)

10 mM HEPES pH 7.9

10 mM KCL

0.1 mM EDTA

0.1 mM EGTA

1 mM DTT

0.5 mM PMSF

Almacenar a 4°C

Nonidet-P40 al 10%

Nonidet P-40 100 µl

Buffer A 900 µl

Almacenar a T.A

Glicerol al 80%

Glicerol 8 ml

Agua inyectable 2 ml

Se esteriliza por autoclave y se almacena a T.A.

Amortiguador de hidratación 2D

CHAPS 0.02 g

UREA 7M 0.21 g

DTT 0.,0154 g

Amortiguador de Equilibrio

UREA 6M 36.036 g

Glicerol 30% 30 ml

Tris pH 8.8 50 mM 3.33 ml stock 1.5 M

SDS 2%	2 g
Azul de bromofenol 0.002%	20 ml

Amortiguador de Transferencia

25 mM Tris base	6.06 g
192 mM Glicina	28.83 g
20% Metanol	400 ml

Aforar a 2 lt
Almacenar a 4 °C

TBE 10X

Tris base	121.1 g
Ácido Bórico	61.8 g
EDTA	7.4 g

Se ajusta pH a 8.3 y se afora a 1 Lt con agua destilada.

Coordinación de Certificación y Registro

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada Humano me es ajeno