

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

**COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS GENÓMICAS**

**Identificación de una metalotioneína de *Trichomonas
vaginalis***

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS GENÓMICAS**

Presenta

Jorge Antonio Moreno Reyes

Directora de Tesis

Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez

México, D.F. Enero de 2016.

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.

UACM3 TOV356

DIRECTORA

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

ASESORES

Dra. Claudia Selene Zárate Guerra
Profesora-Investigadora
Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

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

Dra. Rosalía Lira Carmona
Unidad de Investigación Médica
en Enfermedades Parasitarias e Infecciosas.
Centro Médico Nacional Siglo XXI
Instituto Mexicano del Seguro Social

M. en C. José Luís Villalpando Aguilar
Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

La investigación fue realizada en el Posgrado en Ciencias Genómicas, laboratorio 1 de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, contando con la dirección de la Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez y con la asesoría de la Dra. Claudia Selene Zárate Guerra, Dra. Minerva Camacho Nuez, Dra. Rosalía Lira Carmona y el M. en C. José Luís Villalpando. La investigación estuvo financiada con recursos del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México y del CONACyT.

Agradezco a la Universidad Autónoma de la Ciudad de México por el entero apoyo brindado en lo académico y en lo económico al CONACyT, siendo becario con número de apoyo 296788.

Agradecimientos

A la Dra. Elizabeth, directora de esta tesis, por su ayuda, conocimientos y paciencia otorgados en la realización de este trabajo de investigación.

A todos mis asesores (as) y lectores (as), que me guiaron paso a paso para poder ir construyendo y mejorando el presente trabajo.

A Laurita, por su apoyo en el laboratorio, consejos y asesoría.

A José Luís, que además de ser mi asesor fue un compañero de laboratorio, resolviendo dudas, contagiando entusiasmo y transmitiendo perseverancia.

A mi amigo y compañero Yebrán, por estar ahí en los momentos buenos y malos, fueran dentro o no del laboratorio.

Al personal del área secretarial del PCG, por su amabilidad y disposición.

A mi familia, por ser el núcleo de mi motivación, apoyo y aliciente en los momentos más difíciles.

A mi estimado y amigo de la familia, Ángel Hernández, por las largas charlas llenas de comprensión y apoyo.

A todas aquellas personas que contribuyeron para que este trabajo se concluyera en el tiempo adecuado.

Dedicatoria

A mi familia, por creer en mis decisiones, por darme su apoyo durante todo este tiempo, compartir mis alegrías, escuchar mis frustraciones y enfados, por darme certidumbre cuando yo creí que ya no la había. A mi mamá por quererme tanto, por ser mi ejemplo de vida y fortaleza. A Marisol, mi hermana, siempre preocupada de si iría desvelado a la Universidad y sin haber desayunado. A Yazmín, por haber afrontado con valentía una fuerte etapa en su vida y seguir brindándonos esa espontánea sonrisa que nos llena de gusto escuchar. A Jan, ese pequeño niño que llego a la casa y que ahora que es más grande se acerca a preguntar con cierto agobio que si me desvelaré de nuevo o ya voy a terminar....

A la vida, por darme la oportunidad de aprender de los momentos difíciles y volver memorables aquellos que me han resultado felices.

ÍNDICE	Página
INTRODUCCIÓN	1
I. ANTECEDENTES GENERALES	4
1.1 Tricomoniasis	4
1.2 Epidemiología	5
1.3 Estructura y ciclo de vida de <i>Trichomonas vaginalis</i>	5
1.4 Patogénesis	8
1.4.1 Factores de virulencia y mecanismos moleculares de patogénesis	8
1.4.1.1 Adhesinas	8
1.4.1.2 Cisteín proteinasas	9
1.4.1.3 Hidrolasas	9
1.4.1.4 Moléculas citotóxicas	9
1.5 Efecto de iones metálicos en la expresión de factores de virulencia en <i>Trichomonas vaginalis</i>	10
1.5.1 Hierro	10
1.5.2 Zinc	11
1.6 Aspectos fundamentales sobre metales y metaloproteínas	14
1.7 Metales en el aparato reproductor masculino	15
1.8 Metalotioneínas (MTs)	16
1.8.1 Estructura	16
1.8.2 Clasificación	18
1.8.3 Genes que codifican a metalotioneínas	19
1.8.4 Mecanismos de regulación	19
1.8.4.1 A nivel de la cromatina	20
1.8.4.2 Transcripcional	20
1.8.4.3 Postranscripcional	23
1.8.5 Inductores de la síntesis de metalotioneínas	23
1.8.6 Funciones de las metalotioneínas	28
1.8.6.1 Homeostasis, reservorio y detoxificación de metales	28
1.8.6.2 Metalotioneínas y modulación de la expresión génica	30
1.8.6.3 Metalotioneínas y estrés oxidativo	31

II. ESTADO DEL ARTE	33
III. JUSTIFICACIÓN	35
IV. HIPÓTESIS	36
V. OBJETIVOS	36
5.1 General	36
5.2 Específicos	36
VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	37
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	38
7.1 Análisis Bioinformático	38
7.1.1 Búsqueda de genes codificantes para metalotioneínas (<i>tvmts</i>) en <i>Trichomonas vaginalis</i>	38
7.1.2 Obtención de las secuencias de genes y proteínas	38
7.1.3 Alineamiento de secuencias	38
7.1.4 Búsqueda de dominios conservados	39
7.1.5 Perfiles de desorden intrínseco	39
7.1.6 Análisis filogenético	39
7.2 Extracción de DNA genómico	40
7.3 Amplificación por PCR del gen <i>tvmt</i> de <i>T. vaginalis</i> aislado HGMN01	40
7.4 Purificación de bandas de DNA	41
7.5 Clonación del gen <i>tvmt</i>	42
7.5.1 Preparación de células competentes <i>E. coli</i> DH5α y Top10	42
7.5.2 Clonación del gen <i>tvmt</i> en pJET 1.2/blunt	42
7.5.3 Extracción de DNA plasmídico por Miniprep de Roche	43
7.5.4 Clonación del gen <i>tvmt</i> en el vector pCR 4-TOPO TA	44
7.5.5 Extracción de DNA plasmídico por Miniprep	44
7.6 Secuenciación	45
7.7 Análisis de expresión	45
7.7.1 Cultivo de <i>T. vaginalis</i> en presencia de cationes divalentes	45
7.7.2 Extracción de RNA total de los parásitos por el método de Trizol	46
7.7.3 Síntesis de cDNA	47
7.7.4 Amplificación por PCR del gen <i>tvmt</i> de <i>T. vaginalis</i> aislado HGMN01	48

7.7.5 Análisis densitométrico	49
7.8 Diseño de péptido sintético	49
7.9 Producción de anticuerpos policlonales anti-TvMT	50
7.10 Ensayo de western blot	50
VIII. RESULTADOS	52
8.1 Análisis bioinformático	52
8.2 Amplificación mediante PCR y RT-PCR del gen <i>tvmt</i> de <i>T. vaginalis</i> aislado HGMN01	64
8.3 Clonación y secuenciación del gen <i>tvmt</i> de <i>T. vaginalis</i> aislado HGMN01	64
8.4 Expresión del transcrito de <i>tvmt</i> en presencia de cationes divalentes	75
8.5 Inmunodetección de TvMT	79
IX. DISCUSIÓN	87
X. CONCLUSIONES	92
XI. PERSPECTIVAS	94
XII. BIBLIOGRAFÍA	95

LISTA DE FIGURAS

Página

FIG. 1. Cambios morfológicos de <i>T. vaginalis</i> .	7
FIG. 2. Representación esquemática de una metalotioneína (MT).	17
FIG. 3. Regulación de la expresión génica de las MTs.	26
FIG. 4. Respuesta a cadmio por MTF-1.	27
FIG. 5 Localización del gen codificante de metalotioneína-like (<i>tvmt</i>) en el genoma de <i>T. vaginalis</i> .	55
FIG. 6. Posibles metalotioneínas en el genoma de <i>T. vaginalis</i> .	57
FIG. 7. Búsqueda de dominios conservados.	58
FIG. 8. Perfil de desorden intrínseco de MT-like de <i>T. vaginalis</i> aislado HGMN01 y cepa G3.	59
FIG. 9. Perfil de desorden intrínseco de MT-like de <i>T. vaginalis</i> aislado HGMN01 y de <i>H. sapiens</i> .	60
FIG. 10. Perfil de desorden intrínseco de MT-like de <i>T. vaginalis</i> aislado HGMN01 y de <i>C. virginica</i> .	61
FIG. 11. Elementos MREs y AREs en el promotor de <i>tvmt</i> de <i>T. vaginalis</i> .	62
FIG. 12. Análisis filogenético de las MTs-like de <i>T. vaginalis</i> y de diversos organismos.	63
FIG. 13. Amplificación del gen <i>tvmt</i> de <i>T. vaginalis</i> aislado HGMN01.	67
FIG. 14. Bandas purificadas, obtenidas de la amplificación del gen <i>tvmt</i> de <i>T. vaginalis</i> aislado HGMN01.	68
FIG. 15. PCR-colony para la verificación de clonas positivas, usando el vector pJET 1.2/blunt.	69
FIG. 16. Alineamiento de secuencias de <i>tvmt</i> de <i>T. vaginalis</i> cepa G3 y fragmento de 267 pb del aislado HGMN01.	70
FIG. 17. Alineamiento de secuencias de <i>tvmt</i> de <i>T. vaginalis</i> cepa G3 y fragmento de 177 pb del aislado HGMN01.	71
FIG. 18. PCR-colony para la verificación de clonas positivas, usando el vector pCR 4-TOPO TA.	72
FIG. 19. Alineamiento de secuencias de <i>tvmt</i> de <i>T. vaginalis</i> cepa G3 y <i>tvmt</i> del aislado HGMN01, clonado en vector pJET 1.2/blunt y pCR 4-TOPO TA.	73

FIG. 20. Alineamiento de secuencias de las MTs-like de <i>T. vaginalis</i> cepa G3 y del aislado HGMN01.	74
FIG. 21. Amplificación del gen <i>tvmt</i> del aislado HGMN01 (104 pb).	77
FIG. 22. Expresión del gen <i>tvmt</i> en presencia y ausencia de cationes divalentes.	78
FIG. 23. Alineamiento de secuencias de metalotioneínas de ratón y del aislado HGMN01.	80
FIG. 24. Análisis de antigenicidad de MT-like del aislado HGMN01 mediante Bepipred Linear Epitope Prediction.	81
FIG. 25. Análisis de antigenicidad mediante ABCpred y NetMHCII.	82
FIG. 26. Análisis de antigenicidad de péptido sintético.	83
FIG. 27. Análisis de hidrofobicidad en la escala Hopp & Woods.	84
FIG. 28. Análisis de hidrofobicidad en la escala Kyte & Doolittle.	85
FIG. 29. Ensayo de western blot.	86

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Factores de virulencia de <i>T. vaginalis</i> expresados diferencialmente en presencia de hierro y zinc, mecanismo de virulencia y tipo de regulación.	13
Tabla 2. Concentraciones de diversiones iones metálicos presentes en el plasma seminal de hombres sanos.	15
Tabla 3. Factores fisiológicos y experimentales que inducen la síntesis de metalotioneínas.	24
Tabla 4. Concentraciones de cationes en los que fue cultivada <i>T. vaginalis</i> .	46
Tabla 5. Esquema de inmunización.	50
Tabla 6. Características de posibles metalotioneínas de <i>T. vaginalis</i> .	56

LISTA DE ABREVIATURAS

a.a. Aminoácido

AP. Proteína de adhesión

ARE. Elemento de respuesta antioxidante

Cd. Cadmio

cDNA. Ácido desoxirribonucleico complementario

c.b.p. Cuanto baste para

DEPC. Dietilpirocarbonato

DNA. Ácido desoxirribonucleico

DNAg. Ácido desoxirribonucleico genómico

dNTPs. Desoxinucleótidos trifosfato

E. Valor de expectativa

Fe. Hierro

g. Gravedades

HRP. Peroxidasa de rábano

Inr. Elemento regulador de la transcripción

kDa. Kilodaltons

mM. Milimolar

Mn. Manganeseo

MRE. Elemento de respuesta a metal

mRNA. Ácido ribonucleico mensajero

MT. Metalotioneína

MTF-1. Factor de transcripción de respuesta a metal

OMS. Organización Mundial de la Salud

pb. Pares de bases

PBS. Fosfato buffer salino

PCR. Reacción en cadena de la polimerasa

pH. Potencial de hidrógeno

Put. Putrescina

RNA. Ácido ribonucleico

RT-PCR. Reacción en cadena de la polimerasa retrotranscriptasa

SDS. Dodecil sulfato de sodio

tvmf. Gen codificante para metalotioneína en *T. vaginalis*

TYM. Medio de cultivo tripticasa extracto de levadura y maltosa

USF. Factor estimulador de unión

Zn. Zinc

RESUMEN

Trichomonas vaginalis es un protozoo flagelado que parasita los tractos urogenitales de los seres humanos, este parásito es el agente causal de la tricomoniasis, una infección de transmisión sexual (ITS). La tricomoniasis es una de las ITS más frecuentes en el mundo. En México está dentro de las veinte principales causas de enfermedades transmisibles. Por otra parte, *T. vaginalis* debe adaptarse a los tractos genitourinarios femenino y masculino los cuales son fisiológica y anatómicamente distintos. El tracto genitourinario femenino está enriquecido en hierro mientras que el masculino en zinc, concentraciones de este catión >1.6 mM tienen efecto tricomonocida. Existen proteínas llamadas metalotioneínas (MT), las cuales tienen la función de quelantes biológicos y cuya inducción de la expresión de sus genes se ve incrementada por la presencia de cationes divalentes. En diversos patógenos se ha encontrado la presencia de metalotioneínas, las cuales contribuyen a su supervivencia ante la presencia de cationes metálicos perjudiciales para estos organismos y facilita el establecimiento de la infección. En este trabajo se identificó una metalotioneína-like de *T. vaginalis* aislado HGMMN01 (TvMT). Lo anterior se realizó a través de la búsqueda de genes codificantes para MTs en el genoma del parásito, posteriormente se identificaron dominios conservados característicos de estas proteínas y el desorden intrínseco en su secuencia. También se analizó la expresión del gen codificante de metalotioneína en *T. vaginalis* (*tvmt*), para ello se cultivaron parásitos en presencia y ausencia de diversos cationes divalentes (Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} y Mn^{2+}), observándose un incremento en la inducción de la expresión de *tvmt* en presencia de estos iones metálicos. Anticuerpos anti-TvMT inmunoreconocieron a una proteína de 9.6 kDa, lo cual es coincidente con lo reportado para la metalotioneína-like de *T. vaginalis*.

INTRODUCCIÓN

Trichomonas vaginalis es un parásito eucarionte flagelado que presenta dos morfologías, la forma de trofozoíto que presenta un nado libre, flagelado, con forma de pera, y la forma ameboide, similar a la morfología de una amiba caracterizado por un importante incremento en la superficie de contacto. Algunas células forman pseudoquistes los cuales pueden ser inducidos *in vitro* bajo la exposición de los trofozoitos a bajas temperaturas, sin embargo el significado de esta forma durante el proceso de infección es aún desconocida [1]. Este patógeno parasita la vía urogenital y varía de tamaño entre 7 y 10 μm , es muy similar en muchos aspectos a otros eucariontes unicelulares, pero difiere en su metabolismo energético y muestra una remarcada similitud con bacterias anaeróbicas al tener un metabolismo fermentativo de los carbohidratos. Una diferencia en este organismo con respecto a otros eucariontes es la presencia del hidrogenosoma, el cual es una estructura análoga a la mitocondria y lleva a cabo muchas de las mismas funciones metabólicas, como la producción de ATP por fosforilación a nivel de sustrato, sin embargo en el hidrogenosoma no se encuentran los citocromos presentes en la mitocondria [2].

T. vaginalis causa la tricomoniasis humana, una infección de transmisión sexual, la cual tiene relevancia médica y social con implicaciones económicas. Durante la tricomoniasis se puede presentar vaginitis en la mujer y uretritis y/o prostatitis, en el hombre; las consecuencias a esta infección pueden ser: partos prematuros, infantes de bajo peso al nacer e incremento en la mortalidad infantil, predispone a la adquisición de VIH/SIDA y al desarrollo de cáncer cervical o de próstata. Este parásito infecta principalmente a la mujer, mientras la mayoría de los hombres son capaces de contrarrestar la infección rápidamente, sugiriendo que los diferentes microambientes del tracto urogenital afectan en la patobiología del parásito. En el caso de la mujer el microambiente vaginal es rico en hierro y en el caso del hombre en el microambiente prostático existen altas concentraciones de zinc de 4.5 a 7 mM [2, 3].

El zinc es un elemento con actividad antimicrobiana. Una concentración en el tracto urogenital masculino menor a 1.6 mM de zinc puede propiciar prostatitis crónica debida a infección por *T. vaginalis*, concentraciones mayores a 1.6 mM de zinc han mostrado un efecto tricomonocida [3].

La colonización de las membranas mucosas por *T. vaginalis* y el mantenimiento de la infección están favorecidas por la existencia de proteínas que participan en diversos mecanismos de virulencia, que incluyen unión y degradación de la mucosa, y componentes de la matriz extracelular (EMC), adherencia y citotoxicidad en células del epitelio vaginal, cervical y de la próstata, fagocitosis, control y destrucción de células del sistema inmune, entre otros. Una expresión diferencial de estas proteínas en *T. vaginalis*, ha evidenciado ser regulada por la presencia de iones metálicos como el hierro y zinc, lo que muestra la importancia de factores presentes en el microambiente del tracto urogenital [3].

Por otra parte, existen proteínas llamadas metalotioneínas, encargadas de unirse a iones metálicos esenciales como el zinc (Zn) y cobre (Cu), y algunos metales no esenciales como mercurio (Hg), oro (Au), plomo (Pb) y cadmio (Cd). Las metalotioneínas (MT) constituyen un grupo de proteínas ampliamente distribuidas en los organismos, las cuales se caracterizan por tener un alto contenido de grupos sulfhidrilo provenientes del aminoácido cisteína capaces de unir metales. Para estas proteínas se han propuesto las siguientes funciones: detoxificación de metales pesados, regulación del metabolismo del zinc y el cobre, estabilización de membranas celulares, activación de apoenzimas, captura y eliminación de radicales libres, así como modulación de la expresión de algunos genes [4].

En diversos patógenos se ha encontrado la presencia de metalotioneínas, las cuales les ayudan a tolerar concentraciones de iones metálicos que les resultarían tóxicos o letales, facilitando de esta manera la supervivencia de estos organismos ante un ambiente que les resultaría perjudicial. Además, en algunos de estos

patógenos se ha encontrado una correlación entre la expresión de metalotioneínas y la de factores de virulencia. Debido a la síntesis de la metalotioneína II (MT-II) *Candida glabrata* puede crecer en un medio que contenga una concentración 1mM de CuSO_4 , de otra manera esa concentración sería letal para esta levadura patógena [5]. *Cryptococcus neoformans* es un patógeno fúngico que infecta los pulmones de seres humanos y cuenta con diversas proteínas que participan en la detoxificación de cobre, además de ser cruciales para la virulencia de este hongo, en la cual participan metalotioneínas [35]. Por otra parte, en una biblioteca genómica de *Mycobacterium tuberculosis* se identificó un pequeño marco de lectura (MT0196) que codifica para una proteína rica en cisteínas de 4.9 kDa. Tanto el cobre como el cadmio y compuestos que generen óxido nítrico o superóxido inducen la expresión de estos genes. La proteína nativa se une a cobre, por lo que parcialmente puede proteger a *M. tuberculosis* de la toxicidad por este metal. Por lo anterior se propone que el gen MT0196 codifica para una metalotioneína de Mycobacteria (MymT) [33].

I. ANTECEDENTES GENERALES

1.1 Tricomoniasis

Como ya se mencionó, *Trichomonas vaginalis* es el agente causal de la tricomoniasis humana. A pesar de ser una infección de transmisión sexual (ITS) fácilmente diagnosticable y tratable, regularmente no todos los casos son reportados por las diversas instituciones de salud, situación que se vive principalmente en los países subdesarrollados, sin embargo últimamente el control de esta infección ha recibido un mayor énfasis por parte de los programas de salud en el control de infecciones de transmisión sexual. Recientemente, se ha incrementado su interés y relevancia debido a que se han presentado altas tasas de enfermedades asociadas a esta infección [9].

En el hombre se ha observado una asociación positiva entre la tricomoniasis y el riesgo de padecer cáncer de próstata y la falta de una sintomatología específica puede facilitar que la infección se mantenga persistente e indetectable. *T. vaginalis* tiene una gran oportunidad de ascender a la próstata comparado con otros agentes infecciosos transmitidos sexualmente. La próstata posiblemente puede actuar como un reservorio del parásito, esto con base en que se ha encontrado a este parásito en fluidos prostáticos de parejas de mujeres que padecen de tricomoniasis. Adicionalmente, estudios anteriores han propuesto que la causa de prostatitis crónica es debido a la presencia de *T. vaginalis* lo cual desencadena el desarrollo de hiperplasia epitelial la cual podría estar involucrada en la carcinogénesis de próstata. Otro mecanismo mediante el cual se hipotetiza que *T. vaginalis* puede contribuir a la carcinogénesis de próstata incluye el daño al epitelio urogenital, inhibición de la apoptosis y un posible cambio del nivel local en la concentración de poliaminas afectando el crecimiento y desarrollo de las células prostáticas [10].

1.2 Epidemiología

La OMS calculó que más de 200 millones de personas al año se infectan por *T. vaginalis*. En los países en vías de desarrollo, los casos de tricomoniasis son más frecuentes en individuos con una conducta sexual riesgosa. Las tasas de prevalencia entre las mujeres que residen en países en vías de desarrollo ascienden al >15%, cifra que indica que la tricomoniasis es una de las enfermedades de transmisión sexual más comunes [11].

En México en el año 2014 se presentaron un total de 78,220 casos nuevos de tricomoniasis urogenital. En México la tricomoniasis urogenital está dentro de las veinte principales causas de enfermedades transmisibles [12-14]. Hasta la semana 48 del año 2015, la Dirección General de Epidemiología (DGE) ha registrado cerca de 72,000 casos en el país [14].

1.3 Estructura y ciclo de vida

T. vaginalis, posee cinco flagelos, cuatro de los cuales están localizados en la porción anterior del parásito. El quinto flagelo se encuentra incorporado con la membrana ondulante, el flagelo y la membrana ondulante le dan su característico movimiento titilante. *T. vaginalis* puede adoptar una forma redondeada internalizando el flagelo. Algunos creen que esta forma puede ser un pseudoquist, pero es más similar a una forma degenerada de *T. vaginalis* [2]. La forma celular de pseudoquiste puede ser inducida *in vitro* por la exposición del trofozoito a bajas temperaturas y otros agentes estresante como son los fármacos [1].

El citoesqueleto de *T. vaginalis* está compuesto de tubulina y fibras de actina. Por otra parte, el núcleo en *T. vaginalis* está localizado en la porción anterior y como en otros eucariontes, se encuentra rodeado por poros nucleares de la envoltura [2, 3]. También posee gránulos los cuales son organelos catalasa

negativos, indicando que no son peroxisomas . La producción de moléculas de hidrógeno se lleva a cabo en los hidrogenosomas y son importantes en el metabolismo llevando a cabo la producción de ATP mediante fosforilación a nivel de sustrato [2,15]. Los gránulos de glucógeno también están presentes en *T. vaginalis* y estos pueden ser observados por microscopía de transmisión de electrones. *T. vaginalis* también tiene actividad hidrolasa y tiene estructuras similares a lisosomas y fagosomas [2].

El ciclo de vida de *T. vaginalis* es simple, el trofozoito se divide por fisión binaria y es la forma infectiva que coloniza los tractos urogenitales de los seres humanos [9]. El trofozoito es transmitido a través del coito y no ha sido reportada la forma de pseudoquiste en la transmisión de la infección [9].

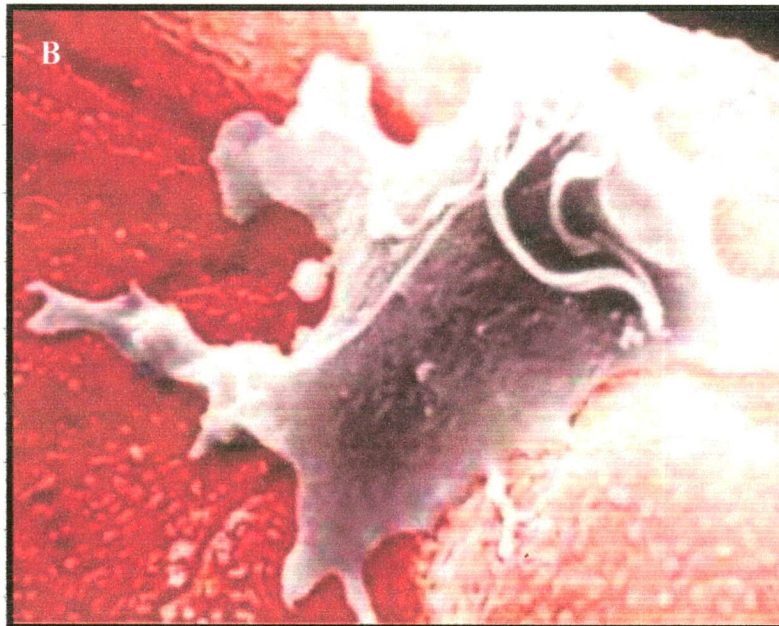
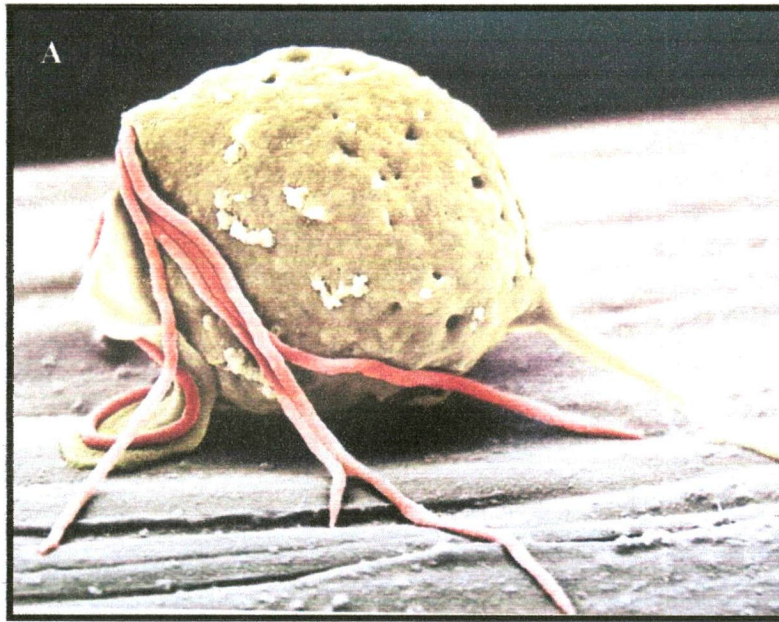


Figura. 1. Cambios morfológicos de *T. vaginalis*.

A) *T. vaginalis* en cultivo tiene la forma típica de una pera. B) Morfología ameboide de *T. vaginalis* que se caracteriza por un importante incremento en la superficie de contacto con células del epitelio vaginal.

Fuentes: <https://www.flickr.com/photos/cinvestav/6967159496>
<https://sites.google.com/site/patriciajohnsonlabucla/>

1.4 Patogénesis

Aunque la patogénesis y virulencia de la tricomoniasis en humanos no es completamente comprendida, se han hecho progresos en identificar productos del parásito que puedan causar daño a las células y tejidos del tracto genitourinario.

1.4.1 Factores de virulencia y mecanismos moleculares de patogénesis

1.4.1.1 Adhesinas

La adhesión es una de las propiedades de virulencia más importante durante la tricomoniasis, se han identificado diversas moléculas de adhesión (Ad) en la superficie del parásito (AP65, AP51, AP33 y AP23) [9, 3]. Evidencia de la función de las adhesinas en la patogénesis se ha derivado de experimentos en los cuales anticuerpos contra adhesinas causan una adhesión reducida de los parásitos y el subsecuente efecto citopático en las células del huésped. El contacto de *T. vaginalis* con células diana de mamíferos causan una sobre-regulación de adhesinas [9]. Estas adhesinas también participan en el mimetismo molecular, mecanismo que está involucrado en la evasión de la respuesta del sistema inmune [3]. El control de la expresión de adhesinas se encuentra bajo la influencia de hierro, por lo que la inducción de la transcripción de *ap65-1* (un gen que codifica a una proteína de adhesión de 65,000 Da) fue reportado que está regulado por elementos de respuesta a hierro en el DNA (secuencia: AGATAACGA), sin embargo es el único gen en el que ha sido encontrado esta secuencia. Estos hallazgos sugieren que la adhesión de *T. vaginalis* facilita un eficiente mecanismo de citotoxicidad hacia las células prostáticas y del epitelio vaginal de mamíferos, que involucran probablemente complejas interacciones similares a interacciones célula-célula, como es el caso de los leucocitos [9].

1.4.1.2 Cisteín proteinasas.

Las cisteín proteinasas (CPs) parecen ser necesarias para una eficiente adhesión de los parásitos a sus células diana [9]. Existen CPs localizadas en la superficie del parásito como TvCP30 y TvCP62, en la superficie de lipofosfoglucono (TvLPG), y diversos receptores de la matriz extracelular (EMC) [3].

1.4.1.3 Hidrolasas.

Una variedad de hidrolasas han sido descritas en *T. vaginalis*, en donde las cisteín proteinasas con pesos moleculares (PMs) de 20 a 110 kDa son las que particularmente prevalecen y son liberadas de las células. Reportes en otros parásitos describen a estas proteínas como factores de desprendimiento celular que son liberados por los parásitos. La liberación de factores de desprendimiento celular y proteinasas de *T. vaginalis*, claramente implica que este parásito genera productos que pueden degradar proteínas como la laminina, vitronectina y otros componentes de la matriz extracelular [9].

1.4.1.4 Moléculas citotóxicas.

Evidencia reciente sugiere que *T. vaginalis* puede producir moléculas que son liberadas a sus células diana y mediar la citotoxicidad a través del daño de la membrana plasmática de la célula blanco [9]. Una de estas moléculas produce poros en las membranas de los eritrocitos que son detectados por microscopía electrónica, es así como estas moléculas muestran una actividad similar a la de las perforinas.

Una molécula adicional con capacidad de causar daño en la membrana celular es el factor lítico (LF), éste es liberado por *T. vaginalis* y puede causar la

destrucción de células nucleadas y eritrocitos, degradando específicamente fosfatidilcolina [9].

1.5 Efecto de iones metálicos en la expresión de factores de virulencia en *T. vaginalis*

T. vaginalis responde a cambios en su ambiente (por ejemplo: temperatura, microflora, pH, hierro, poliaminas, zinc, respuesta inmune del huésped y otros factores desconocidos) a través de cambios en su perfil proteómico [3]. Los microambientes de los tractos genitourinarios femenino y masculino son fisiológica y anatómicamente distintos, por lo que este parásito debe adaptarse a ellos para poder asegurar su supervivencia. El tracto genitourinario femenino está enriquecido en hierro mientras que el masculino en zinc, lo que genera como respuesta en el parásito una expresión diferencial en sus factores de virulencia, fenómeno que queda evidenciado a través de cambios en el proteoma de *T. vaginalis* al hacer crecer al parásito en presencia y ausencia de estos iones metálicos [15, 16].

A continuación se presenta información de hallazgos encontrados al hacer crecer a *T. vaginalis* en presencia y ausencia de estos dos cationes (hierro y zinc).

1.5.1 Hierro.

T. vaginalis requiere de 300 μM de hierro para efectuar sus funciones metabólicas en un nivel óptimo que le permite una adecuada multiplicación en cultivo [3]. Diversos reportes han mostrado recientemente que el hierro puede regular una variedad de propiedades en *T. vaginalis*, como es la síntesis de adhesinas, capacidad de citoadherencia, la expresión de genes de inmunógenos de superficie y la resistencia y lisis del complemento como evasión de la respuesta inmune del huésped. Diversos datos demuestran que la virulencia de *T. vaginalis* se encuentra reducida en condiciones de ausencia de hierro (tabla 1) [3].

Estudios morfológicos y proteómicos en *T. vaginalis* cultivada en presencia y ausencia de hierro han mostrado cambios en el perfil proteómico, dependiendo de la concentración de hierro. Aproximadamente de 600 a 640 y de 540 a 570 spots fueron detectados en geles que contenían muestras de proteínas de *T. vaginalis* crecida en condiciones ricas de hierro y en ausencia de hierro respectivamente. De las proteínas que fueron expresadas diferencialmente de los parásitos crecidos en ausencia de hierro, 12 fueron sobre-reguladas, 19 desreguladas y de 11 fue abolida su expresión [3].

En un análisis del proteoma del hidrogenosoma de *T. vaginalis* cultivada en presencia de hierro a una concentración de 86 μM y en ausencia de este ion metálico fueron identificadas 179 proteínas, de las cuales 58 fueron diferencialmente expresadas. La deficiencia de hierro lleva a una sobre-regulación de proteínas involucradas en el ensamblaje de agrupamientos hierro-sulfurados y en una desregulación de enzimas involucradas en el metabolismo de carbohidratos. Interesantemente, el hierro afecta la expresión de solamente algunas de múltiples proteínas parálogas, mientras que la expresión de otras fueron independientes de hierro. Estos hallazgos indican una estricta regulación de la expresión diferencial de múltiples copias de genes en respuesta a cambios en la disponibilidad de hierro exógeno [15].

1.5.2 Zinc.

El contenido de zinc en las secreciones prostáticas es una defensa importante de tipo no específica contra infecciones del tracto genitourinario. El espectro antimicrobiano del zinc incluye bacterias, virus y hongos. Las concentraciones de zinc encontradas en el fluido prostático normal del ser humano son de 4.5 a 7 mM y tienen efecto tricomonocida, lo cual puede ayudar a limitar o resolver la infección en hombres. Concentraciones de zinc inferiores a 1.6 mM en

los fluidos prostáticos no tienen un efecto tricomonocida y se presenta prostatitis crónica [17].

En el año 2011, Vázquez y cols., demostraron que el zinc altera la virulencia de *T. vaginalis* incrementando la expresión de cisteín proteinasas involucradas en la citotoxicidad hacia células prostáticas, afectando además su morfología. El proteoma y la expresión de diversos factores de virulencia cuando se cultiva *T. vaginalis* en células prostáticas DU145 y 1.6 mM de zinc muestra una menor multiplicación y la existencia de 27 proteínas expresadas diferencialmente en estas condiciones (tabla 1). Dos fimbrinas y una metaloproteinasa de 50 kDa se sobre-expresaron en presencia de zinc. Esta expresión diferencial puede ser clave en la supervivencia de este organismo en el ambiente adverso del tracto genitourinario masculino [3].

Tabla 1. Factores de virulencia de *T. vaginalis* expresados diferencialmente en presencia de hierro y zinc, mecanismo de virulencia y tipo de regulación.

Proteína	Factor de virulencia	Propiedad de virulencia	Regulación		Nivel de regulación
			Hierro	Zinc	
AP23	Adhesina	Citoadherencia	+	+	Transcripcional
AP33	Adhesina	Citoadherencia	+	+	Traduccional
	Subunidad α de succinil Co A sintetasa				
AP51	Adhesina	Citoadherencia	+	+	Transcripcional
	Subunidad β de succinil Co A sintetasa				Traduccional
AP65-1	Adhesina	Citoadherencia	+	+	Transcripcional
					Traduccional
AP120	Adhesina	Citoadherencia	+	ND	Transcripcional
	Piruvato ferredoxin oxidoreductasa				Postraduccional
BspA-like	Adhesina	Citoadherencia	+/-	ND	Transcripcional
		Evasión de la respuesta inmune			
P270	Molécula de membrana	Variación fenotípica	-	ND	Postraduccional
TvCP4	CP de superficie	Hemólisis	+	ND	Postranscripcional
TvCP12	CP de superficie	Citotoxicidad	-	ND	Postranscripcional
TvCP30	CP de superficie	Citoadherencia	-	ND	ND
		Proteína de degradación			
TvCP39	CP de superficie	Citotoxicidad	-	-	Postranscripcional
		Degradación de Igs			
TVCP65	CP de superficie	Citotoxicidad	-	-	Postranscripcional
CP2, CP3, CP4 y CPT	CPs secretadas	Apoptosis	-	ND	ND
TvGAPDH	Proteína de unión a Fn	Citoadherencia	+	ND	Transcripcional
	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa				
TvLEGU-1	CP de superficie	Citoadherencia	+	ND	Transcripcional
					Postranscripcional

(+) Sobre-regulada

(-) Desregulada

ND: No determinada

Fuente: Figueroa y cols. 2012

1.6 Aspectos fundamentales sobre metales y metaloproteínas

Algunos metales (como Cu, Zn, Mg, Mn, Fe, Co, Na y K) desempeñan funciones imprescindibles para los seres vivos, contribuyen a la estabilización de estructuras y moléculas biológicas, o funcionan como cofactores en multitud de reacciones enzimáticas. Por ello son esenciales para el metabolismo y crecimiento celular, aunque se requieran en concentraciones muy bajas. En cambio, otros (como Cd, Hg, Ag, Pb y Pt) no tienen funciones biológicas conocidas, son considerados como no esenciales, y son muy tóxicos incluso a concentraciones muy bajas [18].

Las células no son soluciones ideales y cuentan con diversos factores dinámicos que pueden dominar la distribución de metales, por ejemplo, cuando los metales son liberados por metalochaperonas. Por lo que también implica el contexto del ambiente celular, que involucra el estado redox y concentración del metal, y de las proteínas expresadas en la célula [19].

Las metaloproteínas no son moléculas rígidas debido a que pueden adquirir una geometría alternativa inducida por un ion metálico más competitivo. Por ejemplo, la glioxalasa de *Clostridium acetobutylicum* (GlxI) es activada mediante níquel o cobalto, asumiendo con ambos una conformación geométrica octaédrica, mientras que con zinc se une con una menor afinidad, adquiriendo una conformación de dos pirámides trigonales e inactivando a esta enzima [19]. Sin embargo, existen proteínas aún más versátiles que la anterior, por ejemplo, las metalotioneínas son proteínas capaces de ligar tanto metales esenciales como no esenciales. Cuando se saturan con sales de zinc o cadmio, fijan 7 átomos del metal por molécula de proteína. Los metales se agrupan en dos dominios; el dominio denominado α (C-terminal), contiene 11 cisteínas capaces de fijar 4 átomos de metal, el dominio β (N-terminal) con 9 cisteínas, fija 3 átomos de metal. Los iones metálicos divalentes como el zinc y el cadmio se coordinan tetraédricamente con 4 cisteínas [4].

1.7 Metales en el aparato reproductor masculino

Estudios realizados en seres humanos, en animales e *in vitro*, sugieren que la presencia de metales pesados puede tener impactos adversos en la salud reproductiva masculina, aunque se exponga a niveles relativamente bajos de ellos. Los metales pesados pueden afectar el aparato reproductor masculino, a través de alteraciones en el eje hipotalámico-pituitario o directamente en la espermato-genésis, resultando perjudicial en la calidad del semen [20].

En la siguiente tabla se pueden apreciar las concentraciones de algunos iones metálicos presentes en el plasma seminal de hombres sanos:

Tabla 2. Concentraciones de diversiones iones metálicos presentes en el plasma seminal de hombres sanos.

Ion metálico	Tipo de muestra	Concentración	Referencia
Plomo	Plasma seminal	29 µg/L	[20]
Cadmio	Plasma seminal	0.8 µg/L	[20]
Mercurio	Plasma seminal	11.5 µg/L	[20]
Magnesio	Plasma seminal	12.62 mg/dL	[24]
Cobre	Plasma seminal	173.29 µg/mL	[24]
Manganeso	Plasma seminal	0.7 µg/L	[23]
Hierro	Plasma seminal	28.7 p.p.m	[25]
Zinc	Plasma seminal	154.6 mg/L	[21]

1.8 Metalotioneínas

1.8.1 Estructura

Las metalotioneínas generalmente están conformadas por 60 a 68 aminoácidos, caracterizadas por la ausencia de aminoácidos aromáticos, en su secuencia primaria pueden encontrarse hasta 20 cisteínas. Son proteínas que no poseen un alto grado de estructuración originado por la carencia de estructuras secundarias rígidas. Las metalotioneínas adoptan su estructura tridimensional en función al ion metálico al que se unen, por lo cual este tipo de estructura es altamente heterogénea [28].

El elemento clave para la unión de estos metales son los residuos de cisteínas que en condiciones fisiológicas se encuentran reducidos y coordinando con los átomos metálicos. Mediante diversas técnicas espectrofotométricas se ha podido determinar en las MT-I y MT-II de mamíferos su estructura espacial. Existen dos agrupamientos diferenciados en los cuales cada átomo metálico divalente está coordinado con cuatro cisteínas. El agrupamiento más cercano al extremo N-terminal es capaz de coordinar 3 iones metálicos mientras que el más cercano al C-terminal une 4 iones. Cada uno de estos agrupamientos se encuentra localizado en un dominio globular denominados dominio β y α respectivamente, unidos por un bucle flexible. Esta independencia se manifiesta también en su formación y en la dinámica de los metales. Así, el primer dominio en formarse es el α que a su vez posee mayor resistencia a ceder los átomos metálicos que el β . Las MTs están formadas por dos dominios prácticamente idénticos con un centro metálico alrededor del cual se estructura la cadena polipeptídica en forma de giros helicoidales hacia la derecha en el caso del dominio β y hacia la izquierda en el caso del α (figura 2) [27, 28].

Las moléculas de MT-I y MT-II, poseen cierta plasticidad estérica debido a la presencia del bucle que une los dos dominios. La estructura flexible de las MTs

les permite aceptar átomos de diferentes tamaños. Adicionalmente a la variabilidad estérica, las MT-I y -II son moléculas dinámicas puesto que pueden intercambiar su contenido metálico con el medio, con otros ligandos o con otras MTs. Este hecho podría ser de especial relevancia para desarrollar sus funciones y/o sobre los factores de transcripción que puedan interactuar con ellas [27].

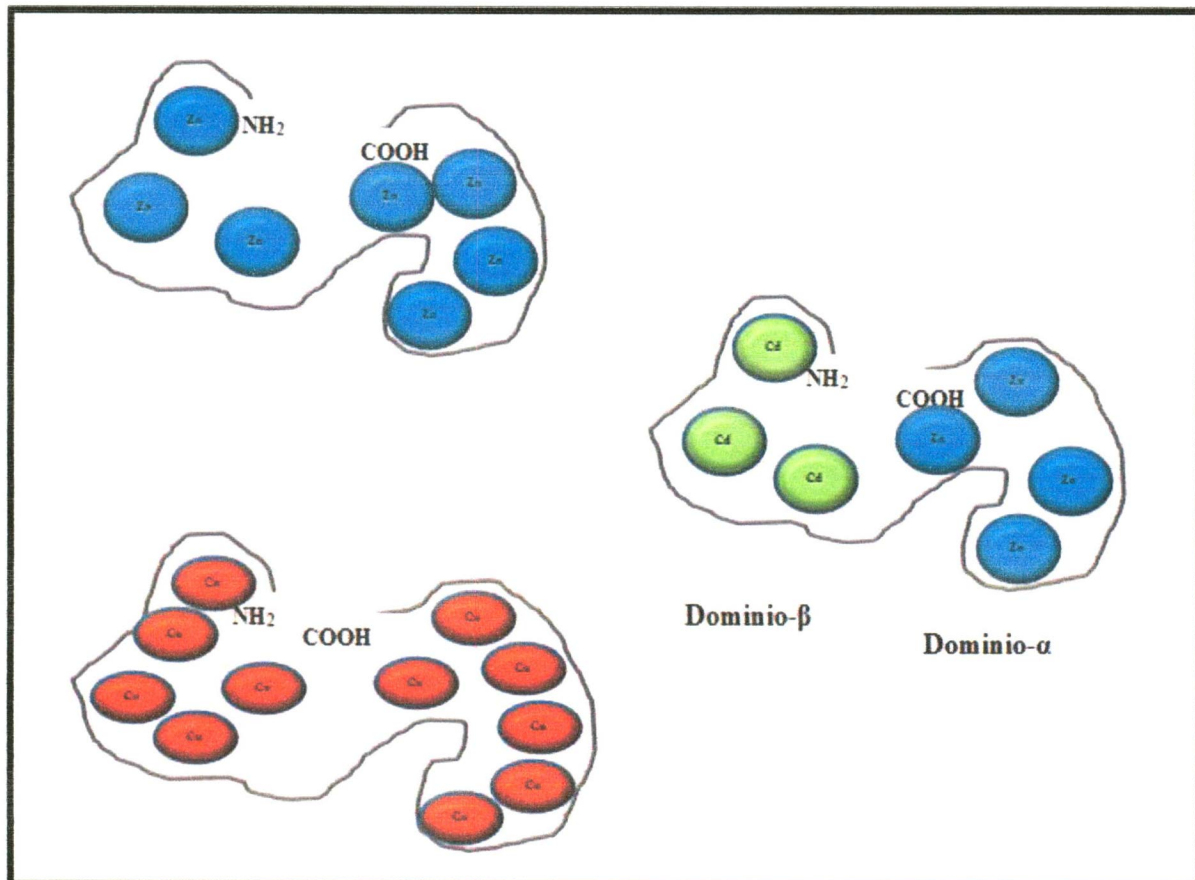


Figura 2. Representación esquemática de una metalotioneína (MT)

Estructura que muestra los dos dominios de una MT en una geometría simplificada. Dependiendo del ion metálico unido diferentes estequiometrías son mostradas: Zn₇MT, Cu₁₁MT y Cd₄Zn₃MT.

1.8.2 Clasificación

Con base en las características estructurales de las MTs se definen tres clases:

La clase I comprende a las MTs aisladas de los mamíferos, e incluye a todos aquellos polipéptidos con las siguientes características:

- Alto contenido de metales (4-12 átomos/mol), unidos a las proteínas exclusivamente por enlaces sulfhidrilo y formando dos agrupamientos o dominios metálicos.
- Alto contenido de cisteínas (típicamente del 23 al 33%), con una localización constante en la secuencia primaria de los aminoácidos de la proteína, ausencia de aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos.
- Baja masa molecular, menor a 10, 000 Daltones.
- Homología estructural o funcional relacionada con las MTs aisladas de los mamíferos.
- En general, las MTs de clase I comparten las siguientes características: son péptidos con 61 a 62 aminoácidos, 20 de ellos corresponden al aminoácido cisteína, 6 a 8 lisinas, 7 a 10 serinas y una metionina acetilada en el extremo amino terminal, no se ha descrito la presencia de histidinas ni de aminoácidos aromáticos [4].

La clase II comprende a las MTs con una secuencia de aminoácido diferente en su distribución a la presentada por las MTs aisladas de mamíferos. En esta clase, la distribución de los aminoácidos cisteína no corresponde a la localización de las cisteínas en las MTs de clase I. Estas MTs han sido encontradas en eucariontes unicelulares como las levaduras y ciertos procariontes como las cianobacterias [4].

Las MTs de la clase I y II se caracterizan por ser proteínas que no forman oligómeros.

Las MTs de clase III son polipéptidos formados por la repetición de 2 a 11 unidades glutamil-cisteinil y reciben el nombre de fitoquelatinas cuando el aminoácido carboxilo terminal corresponde a la glicina, u homofitoquelatinas, cuando el aminoácido terminal corresponde a la β -alanina. Las fitoquelatinas son sintetizadas a partir del glutatión mediante la enzima fitoquelatina sintetasa. Estas MTs son estructuras oligoméricas formadas por 2 ó más cadenas polipeptídicas de longitud variable [4].

1.8.3 Genes que codifican a metalotioneínas

En el caso de las MTs, existen genes funcionales que normalmente se encuentran agrupados en un mismo cromosoma y en algunas especies también encontramos pseudogenes dispersos por el genoma. Estos últimos pueden ser de dos tipos diferentes: i) aquellos que tienen estructura de intrones y exones pero que debido a la presencia de mutaciones no pueden producir ningún tipo de proteínas y ii) pseudogenes sin estructura de intrones y exones que probablemente provienen de mRNA procesados como fragmentos durante su transcripción y que han sufrido transcripción reversa, posteriormente insertándose el producto en el genoma [27].

1.8.4 Mecanismos de regulación

A continuación se presentan los mecanismos de regulación de las MTs, la mayoría del conocimiento aquí presentado es referente a estudios realizados en mamíferos y a las isoformas I y II, debido a que a partir de ellas han surgido los mayores datos experimentales.

1.8.4.1 A nivel de la cromatina.

Los genes codificantes para la MT-I y MT-II tienen un patrón de expresión muy similar y parecen responder de manera coordinada a diferentes estímulos [27]. Debido a esto Palmiter y cols., en 1992 propusieron que a pesar de situarse todos los genes en el mismo locus, los correspondientes a las dos isoformas ubicuas estarían en un dominio de cromatina independiente. Este dominio podría estar estructurado de manera diferente a los adyacentes condicionando así la expresión de los genes contenidos en él o sufrir cualquier tipo de regulación a gran escala de manera independiente al resto de genes del locus. Esto podría conseguirse gracias a la presencia de regiones control del locus (LCR), es decir regiones que controlan la actividad transcripcional de un segmento de DNA que pueden contener varios genes. Flanqueando los genes de la MT-I y –II se han descrito regiones hipersensibles a la DNasa I, que generalmente se consideran indicativas de la presencia de LCR. En algunos experimentos se ha comprobado que estas zonas podrían comportarse como LCR [27].

La amplificación génica, es decir la aparición de un número adicional de copias de un gen, puede incrementar la presencia de proteína sin afectar a la tasa de transcripción de cada gen individual. Este fenómeno se ha observado para los genes codificantes de la MT-I y –II en cultivo de células de ratón, bajo presión selectiva por dosis subletales de cadmio. No obstante, no se conoce si este mecanismo se produce *in vivo* y en condiciones fisiológicas [27].

1.8.4.2 Transcripcional.

En el caso de las MTs de mamífero éste es el principal mecanismo de regulación, ya que ha sido observado que la acumulación de la proteína es proporcional a la inducción del mRNA [27].

En la región promotora de los genes de MTs de diversos organismos se han identificado múltiples secuencias cortas similares entre sí, denominadas MREs (elementos de respuesta a metal). Al parecer los MREs cuya secuencia consenso es TGC(G/A)CNC (donde N es cualquier nucleótido de DNA), están implicados en la expresión basal y activación de la transcripción por algunos metales y estrés oxidativo [18]. Los MREs ejercen su acción independientemente de su posición y orientación, aunque son más activos mientras más cerca del sitio del inicio de la transcripción se encuentren y la presencia de varios MREs genera efectos sinérgicos. Estos sitios realizan su función gracias a la unión de determinados factores de transcripción de los cuales el más importante es el factor de transcripción de respuesta a metal (MTF-1).

MTF-1 es un factor que se encuentra en el núcleo y citoplasma, en la ausencia de tratamiento con metal se encuentra predominantemente en el citoplasma. Durante exposiciones a metales pesados o estrés celular, MTF-1 se transloca al núcleo, donde regula la expresión de metalotioneinas y otros genes.

Diferentes concentraciones de zinc pueden afectar el grado de afinidad con el que MTF-1 se une a los MREs, sugiriendo la existencia de MREs individuales en cada gen que puede cada uno tener una contribución específica al total de la función regulatoria por MTF-1 [30].

MTF-1 tiene como genes blanco aquellos que son inducidos en respuesta a diversos metales como cobre y cadmio, y no solamente a zinc [31].

Todos los metales inductores de las MTs ejercen su acción a través de MTF-1 lo que se ha demostrado en células knockout (KO) para esta proteína o tratados con mRNA antisentido de MTF-1 donde no se incrementa la síntesis de MTs en respuesta a ningún metal. MTF-1 se activa gracias a la disociación de un inhibidor que probablemente actúe como sensor de zinc. No obstante, no se

pueden descartar otros mecanismos como la ruta vía ARE/USF observada para el cadmio a través de estrés oxidativo secundario [27].

Los elementos de respuesta antioxidante (ARE, por sus siglas en inglés) se han encontrado en la zona proximal del promotor de los genes que codifican para MT-I y -II. Los ARE son elementos que intervienen, como su nombre lo indica, en la respuesta a sustancias oxidantes, aunque no se puede descartar que sean inducidos por algunos metales diferentes del zinc, como el cadmio. La presencia de metales redox, como el cobre y el hierro, pueden producir especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) en la célula, lo que causaría un daño al DNA y a las estructuras celulares. MTF-1 y el factor estimulador de unión (USF) interaccionan bajo ciertas circunstancias con los ARE [29, 27].

En seres humanos, la diferencia en sólo 4 aminoácidos de las MTs parece producir una preferencia diferencial por el ion metálico al que se unen las dos isoformas de MTs. MT-I se une preferentemente a cadmio y MT-II a zinc. El nivel de la transcripción de los genes codificantes para estas dos isoformas es 5 veces mayor para *MT-IIA* que para *MT-IA*, aunque el promotor del gen igualmente contiene una secuencia que es estimulada por zinc y cadmio [26].

Los elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE, por sus siglas en inglés) son los responsables de la respuesta a glucocorticoides y se les une el receptor activado de estas hormonas, estos elementos fueron descubiertos en el promotor de MTs humanas a principios de la década de los 80 y recientemente en el ratón [27].

Además de todos los anteriores encontramos sitios de unión para los factores de transcripción Sp1 y Ap-2, que podrían participar en la expresión basal de estos genes [4].

1.8.4.3 Postranscripcional

Al cabo de una hora después de la inducción se suelen encontrar niveles elevados de mRNA de MT-I y-II que unidos a una rápida eliminación (vida media de 2 horas) produce un nivel estable a las 6-8 horas. La vida media del mRNA es baja lo que hace suponer que la estabilidad de éste contribuye en la regulación de la expresión de las MTs. La estabilidad del RNA mensajero depende del tipo de estímulo inductor, pudiendo influir por tanto en la cantidad de proteína total [27].

Por otra parte, se ha observado que dependiendo del estado de la célula y del estímulo inductor puede variar la vida media de las MTs por ejemplo, en cultivos de hepatocitos de rata la vida media de estas proteínas es inversamente proporcional al contenido de zinc celular y varía su estabilidad en función del ion metálico inductor siendo mayor la vida media en presencia de cadmio que en zinc, y a su vez que con cobre. Lo anterior podría ser un reflejo de la eficacia de los sistemas de degradación según el ion metálico unido a estas proteínas [27].

1.8.5 Inductores de la síntesis de metalotioneínas

Además de la inducción de la síntesis de las MTs por diferentes metales, una gran variedad de factores fisiológicos y experimentales han mostrado ser inductores de la síntesis de las MTs. Algunos de estos inductores se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Factores fisiológicos y experimentales que inducen la síntesis de metalotioneínas

-
- | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none">• Iones metálicos: Cd, Zn, Ca, Hg, Au, Ag, Co, Ni, Bi.• Glucocorticoides• Progesterona• Estrógenos• Glucagón• Catecolaminas• Interleucina 1• Interferón• Butirato• Ésteres de forbol• Endotoxinas | <ul style="list-style-type: none">• Etanol• Cloroformo• Tetracloruro de carbono• Inanición• Infección• Inflamación• Laparatomía• Estrés físico• Irradiación por rayos X• Alta tensión de oxígeno• Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno• Diabetes |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
-

Fuente: Colombres y cols. 1999

Los genes que codifican a las MTs son activados cuando las células se exponen a la presencia de iones metálicos divalentes (M^{2+}) como el cadmio, zinc, cobre, etc. Esta activación como se mencionó, requiere de secuencias de bases específicas, que se han denominado elementos de respuesta a metal (MRE). Las secuencias están constituidas por repeticiones de aproximadamente 17 pares de bases [4].

En el año de 1981, Karin y Hershman demostraron que los glucocorticoides promueven la biosíntesis de las MTs en cultivos de células HeLa por un mecanismo independiente al de los metales, aunque al igual que éstos últimos, la inducción ocurre a nivel del inicio de la transcripción. El modelo de inducción parece iniciarse con la unión de la hormona a su receptor, el cual a su vez, estimula la transcripción de la MTs mediante una interacción directa con las secuencias de control contenidas en el DNA nuclear. Otras hormonas importantes en la regulación de la síntesis *de novo* de las MTs son la epinefrina y la norepinefrina [4].

Recientemente han aparecido una serie de trabajos que describen la inducción de las MTs por interleucinas (IL-1 eIL-6), factor de necrosis tumoral (TNF), interferón (IFN) y otros mediadores de la inflamación. Aún no se ha descrito si estas citocinas favorecen la síntesis de las MTs por una interacción directa con los genes de las MTs, o si actúan de manera indirecta. Con ayuda de diferentes modelos de inflamación experimental, se ha puesto de manifiesto que la IL-1 y el TNF promueven la liberación de IL-6 a partir de macrófagos y células polimorfonucleares en el sitio de la inflamación, al parecer esta IL-6 induce finalmente la síntesis de las MTs [4].

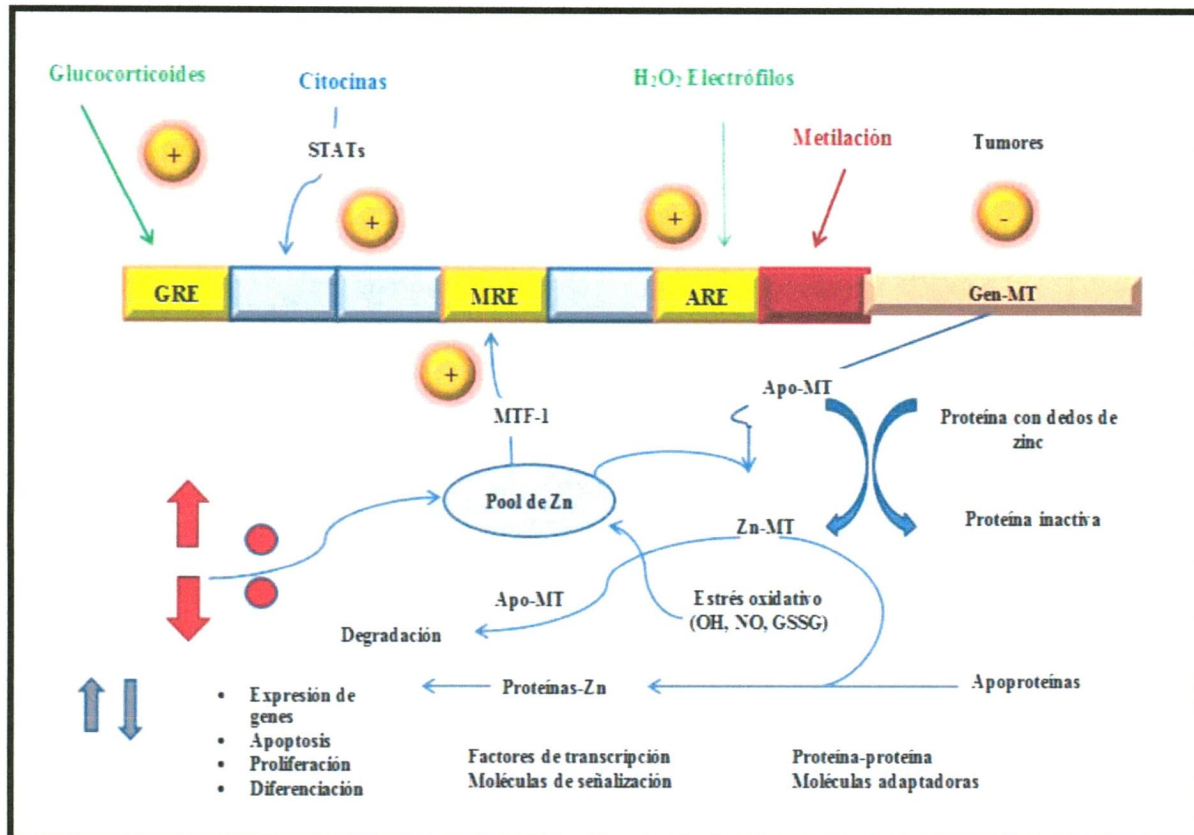


Figura 3. Regulación de la expresión génica de las MTs

El promotor de la MT tiene muchos elementos de respuesta que sobre-regulan la transcripción. Estos incluyen: Elementos de respuesta a metal (MRE), el cual es activado mediante MTF-1; Elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE); elementos activados por STAT (transductores de señales y activadores de la transcripción) que actúan a través de citosinas; Elementos de respuesta antioxidante (ARE) activados en respuesta del estado redox. La metilación puede desregular la expresión en algunas células tumorales.

Fuente: Modificado de Ruttkay-Nedecký y cols. 2013.

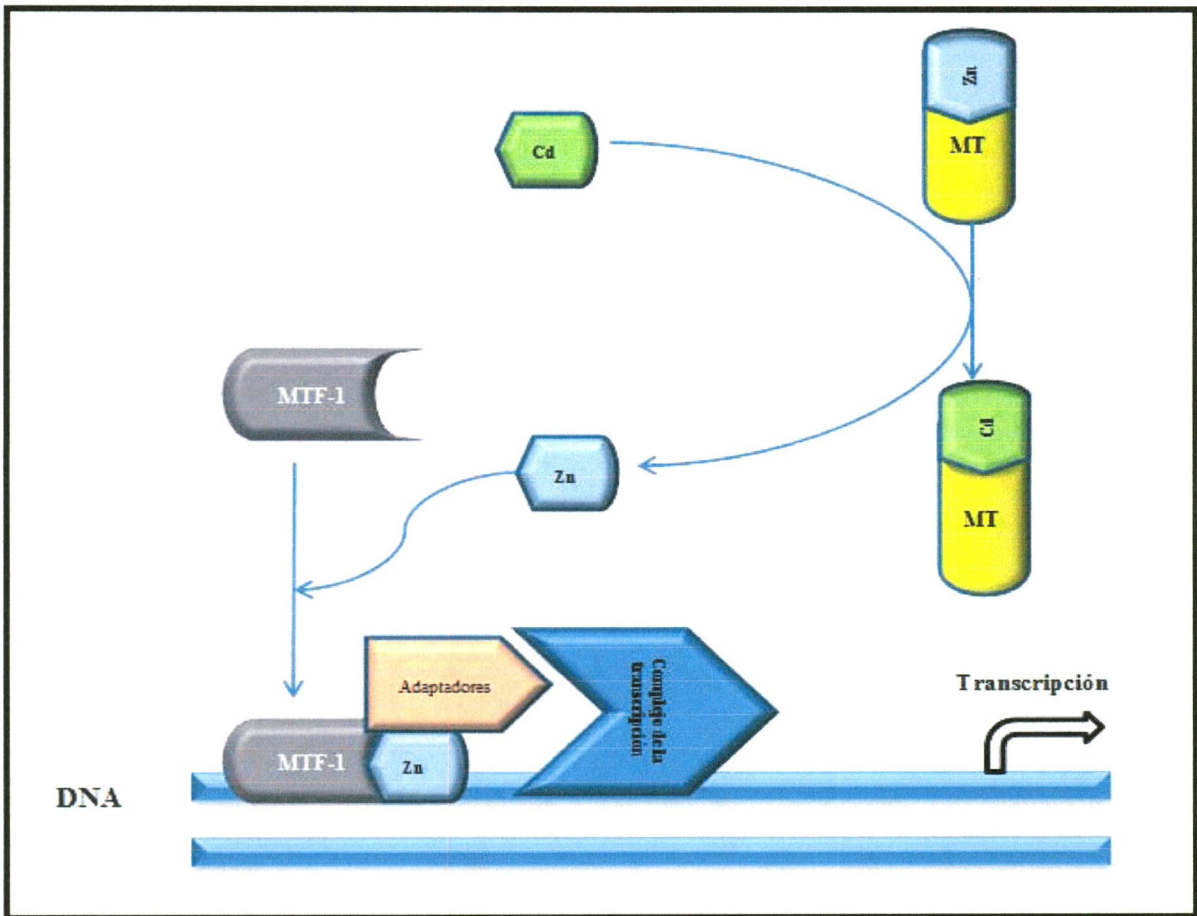


Figura 4. Respuesta a cadmio por MTF-1

MTF-1 responde a cadmio indirectamente, como una función de acceso a zinc. El cadmio se une a la metalotioneína (MT) más fuertemente que con el zinc. El zinc liberado de la metalotioneína es captado por los dedos de zinc de MTF-1, el cual interacciona con elementos de respuesta a metal en el DNA, para efectuar la transcripción de los genes blanco a través de proteínas adaptadoras.

Fuente: Modificado de Waldron y cols. 2009.

1.8.6 Funciones de las metalotioneínas

1.8.6.1 Homeostasis, reservorio y detoxificación de metales

Se acepta generalmente que las MTs participan en la homeostasis de metales esenciales como el zinc y cobre aunque no se conocen los mecanismos concretos. Estos metales son fisiológicos, pero cuando se encuentran a elevadas concentraciones pueden resultar tóxicos. Una de las propuestas supone que las MTs podrían evitar los efectos perjudiciales del exceso de zinc y/o cobre manteniéndolos en forma no tóxica (no iónica). El exceso de zinc y cobre se podría acumular junto con las MTs en forma de agregados insolubles en los lisosomas, de esta manera las MTs podrían contribuir a mantener la concentración de zinc y cobre dentro de un rango fisiológico [27, 32].

Dependiendo del metal presente en la molécula de las MT, éstas pueden desempeñar más de una función. El cadmio es altamente tóxico y no es un metal esencial. El cobre iónico, no obstante su elevada toxicidad, es requerido como un cofactor para la actividad de algunas enzimas. El zinc es un metal esencial, relativamente no tóxico, con importantes funciones de estabilización estructural en múltiples proteínas y es cofactor de una gran cantidad de enzimas relacionadas con la mayoría de los procesos metabólicos [4].

Los complejos MT-metal muestran diferentes constantes de disociación, lo cual depende del metal presente en las MTs. La estabilidad del complejo MT-Cu es aproximadamente 100 veces mayor que la exhibida por el complejo MT-Cd, a su vez, la constante de estabilidad del complejo MT-Cd es 1000 veces mayor que la del complejo MT-Zn [4].

Con base en lo anterior, se ha postulado que las MTs pueden desempeñar al menos tres funciones distintas (homeostasis, reservorio de metales y

detoxificación) en los sistemas biológicos, las cuales dependen del metal contenido en las MTs.

Cobre. En los sistemas biológicos el cobre es más abundante que el cadmio, además tiene funciones esenciales al actuar como cofactor de algunas enzimas involucradas en reacciones de óxido reducción. Debido a que en su forma iónica el cobre es un elemento muy tóxico, se ha propuesto que las MTs tienen una función importante al fijar cobre iónico y así mantener baja su concentración intracelular. Bajo condiciones de alta exposición a cobre, las MTs sintetizadas *de novo* pueden funcionar como un sistema efectivo de detoxificación, dada su elevada afinidad por los iones cobre libres [4].

Zinc. El zinc es un bioelemento ampliamente distribuido en los sistemas biológicos, este metal es considerablemente menos reactivo y tóxico que el cobre y el cadmio. Las enzimas dependientes de zinc catalizan un número considerablemente mayor de reacciones, que las enzimas dependientes de cobre. Las metaloenzimas dependientes de zinc están involucradas en una gran cantidad de procesos de anabolismo, catabolismo y transferencia de información genética. El mecanismo supone que las bajas constantes de afinidad entre las MTs y el zinc permiten que este complejo funcione como una fuente lábil de zinc, permitiendo que el metal sea utilizado para la activación de apoenzimas en diferentes órganos. La activación enzimática puede ocurrir de manera directa con apoenzimas inactivas, o directa mediante la regulación del zinc libre en el interior celular [4].

Cadmio. Los metales como el cadmio se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, lo que hace que se acumule a través de toda la cadena alimenticia, teniendo una vida media de 10 años. Las MTs tienen una función fundamental como un sistema de protección celular contra la toxicidad del cadmio, la elevada afinidad de las MTs por el cadmio y la vida media prolongada del complejo, hacen que estas proteínas sean sumamente adecuadas para esta función. Las MTs también son capaces de fijar otros metales no esenciales como:

hafnio (Hf), plomo (Pb), bismuto (Bi), plata (Ag), oro (Au), platino (Pt), etc. Al igual que con el cadmio, las MTs funcionarían proporcionando un sistema de protección en los tejidos de animales expuestos a metales pesados [26, 4].

Líneas celulares que carecían de MTs fueron sensibles a concentraciones de cadmio en el medio de cultivo que resultó inocuo para células normales. Por el contrario, las células que sobreexpresaron MTs fueron más resistentes al cadmio [27].

Otra de las propuestas fue considerar a las MTs como reservorios de zinc o cobre. No obstante no parece probable que intervengan en el almacenaje a largo plazo de estos metales puesto que su vida media es relativamente corta y su unión al zinc es lábil. Además debemos añadir que su unión a los metales es dinámica y se ha demostrado intercambio tanto inter como intramolecular de átomos metálicos en dímeros de MTs. Por tanto parecen más adecuadas para constituir un depósito dinámico de zinc que proporcione este metal en determinadas condiciones a los constituyentes celulares que lo necesiten en cada caso [27].

1.8.6.2 Metalotioneínas y modulación de la expresión génica

Las MTs son moléculas dinámicas que tienen la capacidad de intercambiar metales entre los dominios de la misma molécula, transferir metales a estructuras químicas como el glutatión y las tioneínas y captar metales de otras proteínas. Esta variabilidad química depende de las constantes de afinidad entre el metal y la tioneína, siendo sumamente útil en el control de muchos procesos bioquímicos. Las tioneínas pueden desplazar al zinc en varios factores de transcripción (SP1 y TFIIA) y donar el metal a otros. Lo anterior ha llevado a suponer que la presencia de tioneínas y las MTs pueden modular algunos procesos genéticos activando o inactivando factores de transcripción por medio de la redistribución del zinc entre estas proteínas [4].

1.8.6.3 Metalotioneínas y estrés oxidativo

Los radicales libres son partículas químicas que contienen uno o más electrones sin aparear, los cuales pueden ser parte de la molécula. Esto causa que la molécula sea altamente reactiva. Los radicales libres son conocidos por tener funciones duales en los sistemas biológicos, lo que los puede hacer benéficos o perjudiciales en los sistemas vivos [29].

Numerosos reportes indican que las MTs protegen a la célula de la exposición de agentes oxidantes y electrofílicos, las cuales pueden reaccionar rápidamente a través de sus grupos sulfhidrilo. Además las MTs tienen una función clave en la regulación de los niveles de zinc y su distribución en el espacio intracelular [29, 32].

La estructura de las MTs provee las bases químicas, las cuales mediante las cisteínas pueden funcionar de ligando que le otorgan propiedades de oxidorreducción, lo cual constituye el ciclo redox de una MT. La hipótesis de las funciones antioxidantes de las MTs contra especies reactivas de oxígeno y nitrógeno está basado en un gran soporte experimental de muchos estudios *in vitro*. Estudios que han utilizado sistemas libres de células han demostrado la capacidad de las MTs como neutralizadoras de radicales libres. Las MTs neutralizan radicales hidroxilo *in vitro* debido a los grupos sulfhidrilo de sus cisteínas [29].

Las MTs neutralizan especies reactivas de oxígeno. La presencia de metales redox, como el cobre y el hierro, en la célula pueden producir especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden ocasionar un daño al DNA y a estructuras celulares. La célula se protege a si misma utilizando diversas moléculas como neutralizadoras de radicales libres. Una de las vías cruciales en la célula para neutralizar radicales es el complejo glutatión redox. Sin embargo los grupos sulfhidrilo (SH) libres de las MTs pueden también estar involucrados en la

neutralización de ROS a través del ciclo redox de la MT. Bajo condiciones fisiológicas el zinc se une a la MT y es liberado a través de la oxidación de los grupos sulfhidrilo cuando en el ambiente existen condiciones de oxidación. La formación de MT-disulfuro podría estar sujeta a degradación, sin embargo cuando existe un ambiente oxidativo este complejo se reduce, por ejemplo un incremento en la proporción de glutatión (GSH)/glutatión disulfuro (GSSG) y MT-disulfuro es reducida a MT-sulfhidrilo. El proceso de reducción es mucho mayor en presencia de selenio. En presencia de zinc, la MT es rápidamente reconstituida. Este proceso constituye el ciclo redox de la MT, el cual tiene una función crucial en la función biológica de la MT [29].

II. ESTADO DEL ARTE

En el 2007 Diaz y cols., realizaron la identificación y caracterización de dos nuevos genes de metalotioneínas (*mtt3* y *mtt5*) en el protozooario ciliado *Tetrahymena thermophila*, los cuales eran inducidos por metales pesados como el cadmio y cobre [6]. Por otra parte, en *Daphnia pulex* (pulga de agua) se llevó a cabo la caracterización de metalotioneínas bajo diversas condiciones de estrés ambiental como: cobre, níquel, cadmio, hidroxiecdisona (20E), paraquat (herbicida cuaternario de amonio) y el estrés oxidativo de cianobacteria (*Microcystis aeruginosa*) [7].

En algunos organismos patógenos como *Candida glabrata* la expresión de metalotioneínas y su relación con la resistencia al cobre que presenta este patógeno ha sido estudiada. La síntesis de la MT-II en *C. glabrata* se vio inducida por la presencia de CuSO_4 1mM en el medio, el cual a esta concentración puede resultar tóxico para esta levadura, del mismo modo se vio inducida la síntesis de una hemolisina like (HLP), por lo cual se sugiere que MT-II y HLP están reguladas bajo un "interruptor" a nivel transcripcional, permitiendo así sobrevivir a *C. glabrata* en presencia de CuSO_4 y desencadenando la expresión de genes vinculados con la virulencia como lo es *HLP* [5, 8]. Un mecanismo similar ha sido encontrado en el patógeno *Cryptococcus neoformans* que infecta los pulmones de seres humanos. Este hongo posee metalotioneínas que participan en la detoxificación de cobre que es crucial para la virulencia y establecimiento del patógeno fúngico. En cepas mutantes de *C. neoformans* a las que se les deletó la expresión de genes codificantes de MTs o que expresaron variantes defectivas se vio severamente afectada la virulencia de este hongo y se redujo la colonización pulmonar [35]. Por otra parte, en bacterias patógenas ha sido evidenciada la presencia de metalotioneínas, tal es el caso de *Mycobacterium tuberculosis* en la cual se identificó el gen *MT0196* que codifica para una proteína rica en cisteínas de 4.9 kDa (MYMT), capaz de unir iones de cobre y cadmio. Por lo anterior, se propuso que MYMT es una metalotioneína de *Mycobacterium* y que es capaz de proteger a

esta bacteria de la toxicidad originada por estos iones [33]. En el patógeno de plantas *Maganaporthe grisea* se encontró un gen que codifica para una metalotioneína formada por 22 aminoácidos con 6 residuos de cisteína (MMT1), la cual es capaz de unir iones de zinc y actuar como un potente antioxidante; al inhibir la síntesis de MMT1 en *M. grisea* este ascomiceto es incapaz de causar enfermedad en las plantas y también de formar apresorios que le permiten llevar a cabo la penetración de la cutícula de las hojas. Estos hallazgos indican que MMT1 puede tener una función esencial en la bioquímica de la pared celular de este hongo que es requerida para la virulencia [34].

En *Trichomonas vaginalis* el gen que codifica para la metalotioneína continúa anotado como putativo en el genoma, por lo que aún queda por confirmar su expresión así como su función en este parásito y de esta manera en un futuro poder conocer si esta proteína contribuye en el establecimiento de la tricomoniasis.

III. JUSTIFICACIÓN

Las metalotioneínas participan en la detoxificación de cationes divalentes (tóxicos o letales) neutralizando el estrés oxidativo en los organismos. Dado el microambiente del tracto genitourinario humano en el que vive *T. vaginalis* resulta importante dilucidar si este parásito posee metalotioneínas que puedan estar contribuyendo en su supervivencia ante la presencia de diversos cationes divalentes, además podría encontrarse en un futuro si esta proteína se encuentra involucrada en un posible “interruptor” génico que permita la expresión de factores de virulencia involucrados en el establecimiento de la tricomoniasis, en una forma similar a la que otros patógenos lo hacen para el establecimiento de la infección en su huésped.

IV. HIPÓTESIS

- *Trichomonas vaginalis* posee metalotioneínas cuya expresión es modulada por la presencia de cationes que se encuentran en el microambiente del tracto urogenital humano.

V. OBJETIVOS

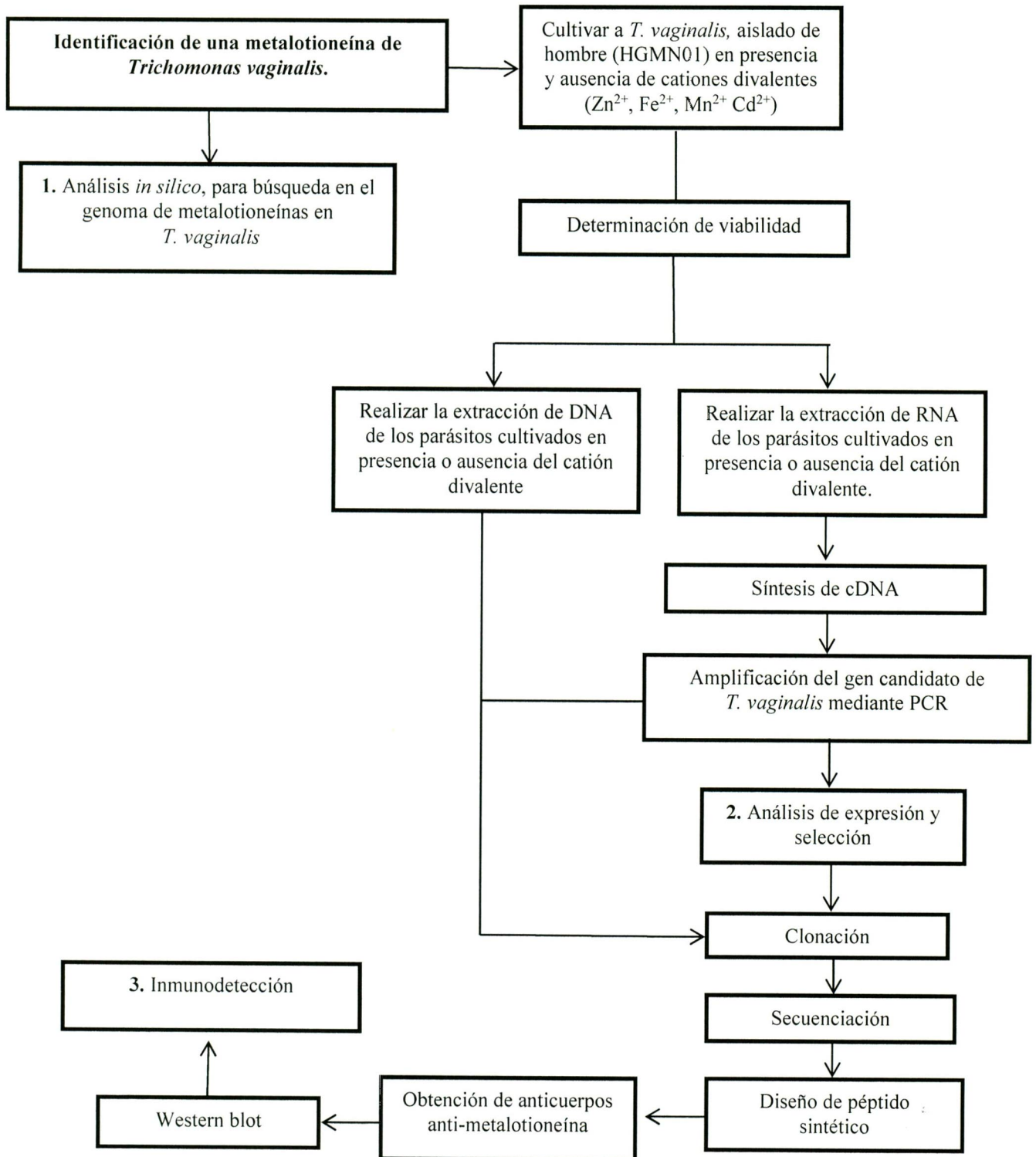
5.1 General

- Identificar e inmunodetectar una metalotioneína de *Trichomonas vaginalis*

5.2 Específicos

1. Realizar el análisis *in silico* de las metalotioneínas en el genoma de *T. vaginalis*
2. Analizar la expresión del transcrito de una metalotioneína en presencia de cationes divalentes (Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} y Mn^{2+})
3. Inmunodetectar a la metalotioneína de *T. vaginalis*.

VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Análisis Bioinformático

7.1.1 Búsqueda de genes codificantes para metalotioneínas (*tvmt's*) en *Trichomonas vaginalis*

Con el objetivo de identificar si *T. vaginalis* posee en su genoma genes codificantes para metalotioneínas, se llevó a cabo un análisis en la base de datos trichdb.org. La búsqueda se realizó mediante Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) e introduciendo directamente el nombre de la proteína, la información encontrada en trichdb.org se contrastó con la base de datos UniProtKB, y de esta forma se completó la información acerca de la descripción y función de esta proteína.

7.1.2 Obtención de las secuencias de genes y proteínas

En este trabajo se buscaron secuencias de genes y proteínas pertenecientes a metalotioneínas de *T. vaginalis* y otros organismos. Las secuencias de los genes y proteínas se obtuvieron para *T. vaginalis* en trichdb.org y para los otros organismos en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), así como de la base de datos de UniProtKB.

7.1.3 Alineamiento de secuencias

Con la finalidad de localizar zonas variables y conservadas en la secuencia de la metalotioneína-like de *T. vaginalis* cepa G3 y aislado HGMN01, así como de otros organismos, se realizaron alineamientos múltiples mediante el programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) y posteriormente fueron editados con Boxshade (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html).

7.1.4 Búsqueda de dominios conservados

A través de una búsqueda en trichdb se encontró la secuencia de un gen codificante para una metalotioneína-like en *T. vaginalis*, posteriormente se realizó una búsqueda de dominios conservados en el CDD (Conserved Domains Database) de NCBI (National Center for Biotechnology Information) (www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml); es importante mencionar que la búsqueda se realizó utilizando la secuencia del gen de la metalotioneína-like (*tvmt*) obtenida del aislado HGMN01 y con el cual fue realizado este trabajo, esta secuencia fue traducida a aminoácidos y posteriormente introducida al CDD para la búsqueda de dominios.

7.1.5 Perfiles de desorden intrínseco

En este análisis se utilizó la secuencia de la metalotioneína-like del aislado HGMN01 (TvMT), así como la secuencia de la metalotioneína II del ser humano y una secuencia más correspondiente a *C. virginica* obtenida en el análisis del CDD. El análisis se realizó con el programa SPINE D (<http://sparks-lab.org/SPINE-D>), del cual se obtuvieron los valores de desorden y con ellos se elaboraron los gráficos comparativos.

7.1.6 Análisis filogenético

La reconstrucción filogenética se realizó utilizando la secuencia de aminoácidos de metalotioneínas de diferentes organismos, mediante el programa Mr. Bayes (<http://mrbayes.sourceforge.net/index.php>), para la construcción se utilizaron 5 millones de generaciones con muestreo cada 100 generaciones, descartando las primeras 25,000 generaciones, con los árboles restantes se construyó un consenso con la regla de la mayoría, además del modelo evolutivo de Dayhoff y enraizado con *Escherichia coli* UM146.

7.2 Extracción de DNA genómico

A partir de 20×10^6 parásitos se hizo la extracción de DNA genómico, para ello se centrifugaron los parásitos a $543 \times g/15 \text{ min}/4^\circ\text{C}$, se lavaron 3 veces con PBS estéril pH 7.0, y se resuspendieron en 2 ml de PBS, se transfirieron a tubos de 1.5 ml y adicionaron 300 μl amortiguador de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, SDS 0.2%, MnCl_2 100 mM, EDTA 10 mM), posteriormente se agregaron 300 μl de fenol y se agitó por inversión durante 30 s. La muestra se centrifugó a $22,673 \times g/5 \text{ min}/4^\circ\text{C}$, la fase acuosa se transfirió a un tubo de 1.5 ml nuevo y se le adicionaron 300 μl de fenol y 300 μl de cloroformo, se mezcló suavemente y se centrifugó a $22,673 \times g/5 \text{ min}/4^\circ\text{C}$, posteriormente se pasó la fase acuosa superior a un tubo nuevo y se cuantificó el volumen, se incubó a $-20^\circ\text{C}/2 \text{ h}$ y se centrifugó a $22,673 \times g/15 \text{ min}$. El sobrenadante se retiró, la pastilla se lavó con etanol frío al 70% y se centrifugó a $22,673 \times g/15 \text{ min}$; la pastilla se secó a temperatura ambiente (TA) y posteriormente se resuspendió en 50 μl de agua inyectable y la cuantificación se realizó por espectrofotometría mediante un NanoDrop®. La muestra se almacenó a -20°C .

7.3 Amplificación por PCR del gen *tvmt* de *T. vaginalis* aislado HGMN01

Para la amplificación del gen, se diseñaron los iniciadores a los cuales se les agregó el sitio de corte para las enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI*. Para la reacción de PCR se utilizaron: amortiguador 10x, 10 μmol de oligonucleótidos sentido y antisentido, dNTPs 0.2 μM , MgCl_2 1.5 mM, cDNA del aislado HGMN01 de *T. vaginalis*, Taq polimerasa y agua inyectable.

Los iniciadores que se utilizaron para la amplificación del gen *tvmt* fueron:

INICIADOR + SITIO DE RESTRICCIÓN Y + COLA PARA ENZIMA DE RESTRICCIÓN

Sentido: 5'G GAA TTC ATG TCT GCT CAA GAA ACA TGC C 3'

Longitud: 29 nt

Antisentido: 5'CCG CTC GAG TTA ATG ATC ACA ATG GCA ATC TGG T 3'

Longitud: 34 nt

El programa que se utilizó para la amplificación del gen fue el siguiente: 1 ciclo de 2 min a 94°C; 30 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 55°C, 30 s a 72°C; 1 ciclo de 7 min a 72°C y finalizando a 4°C α

7.4 Purificación de bandas de DNA

Una vez obtenidos los productos de PCR, se procedió a realizar la purificación de las bandas mediante el kit QIAEX II, para esto se escindió la banda de DNA del gel de agarosa, depositando estos cortes de 250 mg de agarosa en tubos de 1.5 ml, se le agregaron 3 volúmenes del amortiguador QX1 a un volumen de gel (100 mg), se resuspendió con 10 µl de QIAEXII (resina) y se agitó con vórtex durante 30 s; se incubó a 50°C/10 min para solubilizar la agarosa y unir el DNA a la resina, durante este tratamiento se agitó con vórtex cada 2 min (el color de la muestra debe mantenerse amarillo); se centrifugó la muestra durante 30 s y cuidadosamente se removió el sobrenadante con una pipeta; la pastilla se lavó y se resuspendió con 500 µl del amortiguador QX1 y posteriormente se centrifugó durante 30 s. La pastilla se lavó 2 veces con 500 µl del amortiguador PE, se resuspendió y se centrifugó 30 s, el sobrenadante se removió y la pastilla se dejó secar hasta tener un aspecto blanquecino. Para eluir el DNA, se agregaron 20 µl

de de Tris-Cl 10 mM pH 8.5 o agua inyectable y se resuspendió con vórtex, posteriormente se incubó a temperatura ambiente por 5 min, se centrifugó 30 s. El sobrenadante obtenido contiene el DNA purificado, se cuantificó por espectrofotometría mediante un NanoDrop® y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

7.5 Clonación del gen *tvmt*

7.5.1 Preparación de células competentes *E. coli* DH5α y Top10

De 1 a 3 colonias se picaron a partir de la última resiembra de la cepa deseada (DH5α o Top10, crecida en medio LB a 37°C durante 16 h) ésta se inoculó en 10 ml de medio LB, se creció durante toda la noche con agitación (200 rpm, 37°C), y se inoculó en 30 ml de medio LB con 5 ml del cultivo anterior, se incubó a 37°C con agitación durante 2 h o hasta alcanzar una densidad óptica (D.O) de 0.3; se inocularon 200 ml de medio LB con 5 ml del medio anterior, se incubaron a 37°C hasta una D.O de 0.3 a 0.4, las células se transfirieron a tubos de 50 ml y se centrifugaron a 2,146 x g/5 min/4°C, posteriormente se decantó el sobrenadante; se resuspendió cuidadosamente el pellet en 16 ml del amortiguador I (100 mM RbCl₂, MnCl₂ 50 mM, CaCl₂ 10 mM, glicerol 15%) (4ml de amortiguador por cada tubo de 50 ml), se centrifugaron nuevamente las células a 2,146 x g durante 5 min a 4°C y se decantó cuidadosamente el sobrenadante; las células se resuspendieron en 5 ml del amortiguador II (MOPS 10 mM, RbCl₂ 10 mM, CaCl₂ 75 mM, glicerol 15%) e incubaron en hielo durante 10 min. Finalmente se hicieron alícuotas de 200 µl en tubos de 1.5 ml y se almacenaron a -80°C.

7.5.2 Clonación del gen *tvmt* en pJET 1.2/blunt

Reacción de “blunting”: se colocaron 10 µl del amortiguador 2x en un tubo de 1.5 ml, se le agregaron 1.5 µl (15 ng banda de 300 pb) y 1.1 µl (10 ng banda de 200 pb) del producto de PCR purificado (la reacción inserto-vector recomendada es 3:1), se adicionó 1 µl de enzima DNA “blunting” y se agregó agua

hasta un volumen final de 18 μ l, se agito con vórtex y centrifugó, se incubaron durante 5 min a 70°C, y se enfriaron en hielo durante varios segundos.

Reacción de ligación: para la ligación de los productos de PCR se agregó 1 μ l de vector PJET/blunt (50 ng/ μ l) y se le agregó 1 μ l de DNA ligasa T4 (50 U/ μ l), posteriormente se mezcló mediante vórtex y se centrifugó e incubó durante 5 min a 22°C.

La transformación de las células se realizó como se describe a continuación:

Se tomaron 50 μ l de células competentes y se le agregaron 5 μ l de la reacción de ligación, se incubaron en hielo durante 15 min y después en un baño a 42°C durante 45 s, se transfirieron rápidamente a hielo durante 2 min; se agregaron 300 μ l de medio LB (sin ampicilina) y después se incubaron a 37°C con agitación a 200 rpm durante 1 hora, se plaquearon 100 μ l por cada placa de agar LB-ampicilina y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

7.5.3 Extracción de DNA plasmídico por Miniprep de Roche®

El volumen de medio de cultivo utilizado donde creció *E. coli* fue de 4 ml con una D.O de 1.5 a 5.0 por ml.

A la pastilla de bacterias se le agregaron 250 μ l del amortiguador de suspensión + RNasa, después fue resuspendida la pastilla y se agregaron 250 μ l del amortiguador de lisis, mezclándose por inversión, se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y agregaron 350 μ l del amortiguador de unión frío, lo anterior fue mezclado por inversión e incubó en hielo durante 5 min, se centrifugó a 13,000 x g durante 10 min, posteriormente fue colocado un filtro de alta purificación dentro del tubo colector y transferido por completo el sobrenadante dentro del filtro del tubo y se centrifugó durante 1 min a alta velocidad; el tubo del filtro colector fue removido, se desechó el líquido y reinsertó el filtro del tubo en el mismo tubo colector; las células fueron lavadas agregando 700 μ l del

amortiguador II de lavado en el depósito superior del filtro del tubo, se centrifugó durante 30-60 s a alta velocidad y se desechó el líquido, la centrifugación se repitió nuevamente durante 1 min. Para eluir el DNA se agregaron 100 μ l del amortiguador de elución en el depósito del filtro y centrifugó durante 1 min a alta velocidad. Los tubos de microcentrifuga (1.5 ml) contenían el DNA plasmídico eluido, se cuantificó por espectrofotometría en un NanoDrop® y almacenó a -20°C.

7.5.4 Clonación del gen *tvmt* en el vector pCR 4-TOPO TA

Para la clonación se utilizaron 4.5 μ l del producto de PCR purificado, 1.0 μ l de solución de sales y 0.5 μ l del vector TOPO TA; se mezcló la reacción gentilmente e incubó durante 5 min a temperatura ambiente, después se puso la reacción en hielo y se procedió a la transformación de las células competentes.

7.5.5 Extracción de DNA plasmídico por Miniprep

A partir de 2 ml de medio de cultivo de bacterias se centrifugaron a 2,146 x g durante 5 min. Posteriormente fueron agregados 150 μ l del buffer de extracción, el pellet fue desprendido de las paredes del tubo con la punta de la pipeta sin liberar el buffer de extracción. Posteriormente el buffer de extracción fue agregado al pellet y resuspendido. La suspensión bacteriana fue incubada a 65°C durante 5 min y luego fue centrifugada a 26,295 x g durante 10 min o hasta que se formó el pellet. Después el pellet fue removido con un mondadientes. Posteriormente fueron agregados 120 μ l de isopropanol, se mezclaron y centrifugaron a 6,574 x g durante 10 min a temperatura ambiente. El DNA usualmente forma precipitados que se adhieren a las paredes del tubo y que son invisibles en solución de isopropanol. Después fue descartado el sobrenadante y el DNA fue centrifugado después de agregarle etanol al 70%. El etanol fue removido, se dejó secar y el pellet fue resuspendido en 20 μ l de agua libre de DNAsas.

La composición del buffer de extracción fue: 5% de sacarosa, 50 mM de EDTA, 50 mM Tris pH 8, 0.75 M NH₄Cl, 0.5% de Tritón X-100, lisozima 100 µg/ml y RNasa 25 µg/ml y 50 mM de CaCl₂, el cual reduce la extracción de DNA cromosómico en el buffer y facilita la de DNA plasmídico.

7.6 Secuenciación

El DNA plasmídico obtenido de las clonas positivas para los fragmentos de interés fue utilizado como molde y se agregó una cantidad de 350-500 ng con la cual se preparó una reacción con el primer forward y otra con el reverse, y se marcaron con el siguiente programa de secuenciación: 40 ciclos de 6 min a 96°C, 10 s a 96°C, 5 s a 50°C, 4 min a 60°C, 10 s a 60°C y finalizando a 4°C α

Posteriormente fueron purificadas con las columnas DyeEX 2.0 spint kit. Lo colectado se llevó al equipo de secado por vacío, se colocó durante 40 min hasta evaporar todo, se cubrieron de la luz y se almacenaron a -20°C hasta la inyección en el equipo.

7.7 Análisis de expresión

7.7.1 Cultivo de *T. vaginalis* en presencia de cationes divalentes

Teniendo como antecedente que la expresión de genes de metalotioneínas puede ser inducida por la presencia de cationes divalentes en el medio, se cultivó a *T. vaginalis* aislado HG MN01 en presencia de diversos cationes: zinc (Zn²⁺), hierro (Fe²⁺), manganeso (Mn²⁺) y cadmio (Cd²⁺).

El cultivo del parásito se hizo en medio TYM (tripticosa-extracto de levadura-maltosa), complementado con 10% de suero de caballo inactivado por calor (30 min a 56°C) por 24 h a 37°C en presencia y ausencia de los cationes mostrados en la siguiente tabla:

Tabla 4. Concentraciones de cationes en los que fue cultivada *T. vaginalis*

Catión	Concentración
Zn²⁺	1.6 mM
Fe²⁺	0.25 mM y 1.6 mM
Cd²⁺	0.1 mM
Mn²⁺	0.25 mM
Putrescina (NH₂(CH₂)₄NH₂)	40 mM

Como controles se utilizó el cultivo del parásito en medio TYM sin la adición de ningún catión y el cultivo en presencia de putrescina la cual es un policatión de origen no metálico.

La viabilidad de los parásitos fue evidenciada mediante tinción con azul de tripano.

7.7.2 Extracción de RNA total de los parásitos por el método de Trizol

A partir de 20×10^6 parásitos: se centrifugaron los parásitos y lavaron con 1 ml de PBS estéril a pH 7.0, se volvieron a centrifugar a $543 \times g/5$ min, se descartó el sobrenadante y se adicionó 1 ml de trizol (Invitrogen®). Las muestras se almacenaron a -80°C para su uso posterior.

Para hacer uso de las muestras congeladas de trizol fue necesario incubar durante 30 min a 4°C . Una vez descongeladas las muestras se procedió a realizar la extracción de RNA como se menciona a continuación: Se añadieron 200 μl de cloroformo (Sigma-Aldrich®) por cada ml de trizol, se mezcló durante 15 s a temperatura ambiente y centrifugó a $13,416 \times g$ durante 15 min a 4°C . Del paso anterior se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo, se añadió 1 ml de isopropanol (Sigma-Aldrich®) por cada 10×10^6 parásitos, se mezcló e incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Se centrifugó a $13,416 \times g$ durante 15 min a 4°C , el sobrenadante fue descartado y se lavó la pastilla 2 veces con etanol al 75% en agua DEPC o inyectable (600 μl de etanol en cada lavado). La pastilla fue centrifugada nuevamente a $13,416 \times g$ durante 5 min a 4°C (no resuspender en

cada lavado), el secado de la pastilla fue a temperatura ambiente y posteriormente resuspendida en 60µl de agua DEPC. Se cuantificó y almacenó a -80°C.

7.7.3 Síntesis de cDNA

Antes de iniciar con la síntesis de cDNA, al RNA extraído se le dio un tratamiento con DNasa I (Promega®), para esto a 5 µg del RNA se le añadió 1 µl de amortiguador 10x y 1 µl de DNasa I (1U-1µg de RNA) agua c.b.p 10 µl. Posteriormente se incubó durante 30 min a 37°C (si se utiliza una menor cantidad de enzima, incubar durante un tiempo más prolongado), se adicionó 1µl de solución de paro de DNasa I e incubó a 65°C durante 10 min y se cuantificó por espectrofotometría en un NanoDrop® el RNA tratado.

A partir de los 5 µg de RNA tratado con DNasa I, se utilizó 1µg para la síntesis de cDNA.

A 1 µg de RNA se le adicionó 1 µl de oligo dT y c.b.p 12.5 µl de agua DEPC, después se incubó a 65°C durante 5 min y se colocó en hielo, posteriormente se le agregaron 2 µl de dNTPs 10 mM, 4 µl de amortiguador 5x, se agregó 1 µl de transcriptasa reversa (Revert Aid®) y agua DEPC c.b.p 20 µl, se mezcló y centrifugó brevemente (microcentrifuga) e Incubó la mezcla a 42°C durante 60 min y a 70°C durante 10 min.

Para la amplificación del gen de la *β-tubulina*, el cual fue utilizado como control de carga para las diferentes condiciones, se utilizaron los siguientes iniciadores:

Sentido: BTUB9 5' CATTGATAACGAAGCTCCTTTACGAT 3'

Antisentido: BUTB2 5' GCATGTTGTGCCGGACATAACCAT 3'

Para la reacción de PCR se utilizaron 10 pmol de los iniciadores sentido y antisentido, dNTPs 0.2 μ M, MgCl₂ 1.5 mM, cDNA del aislado HGMN01 de *T. vaginalis* crecida en presencia y ausencia de cationes, Taq polimerasa y agua inyectable.

El programa que se utilizó para la amplificación del gen fue el siguiente: 1 ciclo de 2 min a 94°C; 30 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 48°C, 30 s a 72°C; 1 ciclo de 7 min a 72°C y finalizado a 4°C α

7.7.4 Amplificación por PCR del gen *tvmt* de *T. vaginalis* aislado HGMN01

Para el análisis del transcrito del gen *tvmt*, se diseñaron los siguientes iniciadores:

Sentido: 5'TGC TCA AGA AAC ATG CCA GTG 3'

Longitud: 21 nt

Antisentido: 5'TGC AGC CTT CGT TGC ATT T 3'

Longitud: 19 nt

Para la reacción de PCR se utilizaron: amortiguador 10x, 10 pmol de los iniciadores sentido y antisentido, dNTPs 0.2 μ M, MgCl₂ 1.5 mM, cDNA del aislado HGMN01 de *T. vaginalis* crecido en presencia y ausencia de cationes, Taq polimerasa y agua inyectable.

El programa que se utilizó para la amplificación del gen fue el siguiente: 1 ciclo de 2 min a 94°C; 30 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 59°C, 30 s a 72°C; 1 ciclo de 7 min a 72°C y finalizado a 4°C α

7.7.5 Análisis densitométrico

El análisis densitométrico se efectuó midiendo la intensidad de cada una de las bandas correspondientes a cada condición, para ello se utilizó el programa Image Lab de Bio-Rad®, la medición se hizo considerando como el 100% la expresión de *tvmt* en la condición normal (cultivo no tratado con cationes), los datos fueron normalizados con respecto a la expresión del gen de *β-tubulina*.

7.8 Diseño de péptido sintético

Se diseñó un péptido sintético con la finalidad de inmunizar ratones y obtener anticuerpos para realizar la inmunodetección de la metalotioneína-like en el parásito.

Para el diseño del péptido se tomó como template la secuencia del gen *tvmt* del aislado HGMN01 obtenida en la secuenciación y se hizo la traducción a aminoácidos, se analizaron los sitios que potencialmente podían ser epitopos mediante los servidores ABCpred (www.imtech.res.in/raghava/abcpred) y Bepipred (www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred). Se obtuvieron distintos péptidos candidatos de los cuales se descartaron los de menor inmunogenicidad, mayor inestabilidad fisicoquímica, menor identidad y menor reconocimiento por el MHCII de ratón. Algunos de los péptidos candidatos se muestran en la figuras 24 y 25, los picos amarillos pertenecen a aquellos aminoácidos con mayor potencial antigénico y los picos verdes a los de menor. A través del servidor ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>) se realizaron los análisis de hidrofobicidad para poder determinar cuáles eran las regiones más expuestas del polipéptido y por tanto las de mayor potencial antigénico. (figs. 26 y 27). También se consideraron las metalotioneínas presentes en el ratón, por lo que se llevó a cabo un alineamiento entre dichas secuencias, utilizando ClustalW y posterior edición con Boxshade (fig. 22).

7.9 Producción de anticuerpos policlonales anti-TvMT

La inmunización se hizo en 5 ratones Balb/c machos, de 4 semanas. Se obtuvo el suero preinmune previo a la inmunización. La inmunización se realizó vía intraperitoneal utilizando como adyuvante TiterMax® en una relación 1:1 con el antígeno administrado.

Tabla 5. Esquema de inmunización

Semana	Cantidad de antígeno $\mu\text{g}/\text{ratón}$	TiterMax® μl	Sangrado
1	100	100	---
2	100	100	X
3	100	100	---
4	100	100	X
5	100	100	---
6	100	100	X

7.10 Ensayo de Western Blot

El aislado HG MN01 de *T. vaginalis* fue cultivado en medio TYM, se centrifugaron los parásitos a 543 x g durante 5 min a 4°C, la pastilla obtenida se lavó 5 veces con PBS pH 7.0, se centrifugó a 543 x g durante 5 min. A la pastilla obtenida se le adicionaron 900 μl de PBS pH 7.0 y 100 μl de ácido tricloroacético al 100% (TCA), se dejó durante toda la noche a 4°C y al día siguiente se lavó la pastilla con PBS pH 7.0 durante 5 veces y se centrifugó a 543 x g a 4°C, se descartó el sobrenadante, posteriormente se agregaron 400 μl del amortiguador de carga 1x, se resuspendió la pastilla y se hirvió durante 3 min, la muestra se corrió en un gel de poliacrilamida al 12% a 100 V, durante 60 min, terminada la corrida el gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa. Se verificó la transferencia de las proteínas tiñendo con rojo de Ponceau, después se lavó 5 veces con PBS pH 7.0 y se bloqueó la membrana con PBS-Tween 20 al 0.1%, con leche al 5% a 4°C durante toda la noche. Al siguiente día se lavaron las

membranas con PBS-Tween al 0.1% pH 7 y se incubó con el suero preinmune en una dilución 1:500. Al siguiente día se incubaron los sueros inmunes en una dilución 1:500, con agitación durante toda la noche a 4°C, al siguiente día se lavó la membrana con PBS-Tween al 0.1% pH 7, 5 veces durante 5 min y se incubó con el anticuerpo secundario (conejo anti-ratón) conjugado a peroxidasa de rábano (HRP) en una dilución 1:3000, se incubó durante 2 h en agitación, posteriormente se realizaron 5 lavados durante 5 min con PBS-Tween al 0.1% pH 7. El revelado se realizó por quimioluminiscencia en el equipo ChemiDoc de Bio-Rad.

VIII. RESULTADOS

8.1 Análisis bioinformático

Con base en la búsqueda realizada, introduciendo directamente el nombre de la proteína se encontró un gen codificante para metalotioneína-like en el genoma de *T. vaginalis* cepa G3, cuyo gen está identificado con el nombre TVAG_220940 en la base de datos Trichdb. Este ORF tiene un tamaño de 267 pb y se encuentra flanqueado por genes que codifican a proteínas hipotéticas como se pueden observar en la figura 5, panel A (contorneado en amarillo).

Utilizando como sonda la secuencia encontrada en trichdb (TVAG_220940) se hizo un Delta-blast para poder identificar otras posibles metalotioneínas-like además de la encontrada en trichdb. Adicional a la metalotioneína-like anotada (TVAG_220940) se encontraron otras tres proteínas similares a la metalotioneína putativa en *T. vaginalis*: TVAG_485930 con un score de 101, cobertura 100%, valor de "expect" (E)= 4e-24; TVAG_486210 score de 97.1, cobertura 97%, E= 5e-22 y TVAG_182840 con un score de 99.4, cobertura 100%, E= 7e-24. ProtoNet indica que estas secuencias son muy similares a la proteína A2EEG8 de *T. vaginalis* con base en su función, la cual está anotada que pertenece a la familia de las metalotioneínas. Un alineamiento realizado con las secuencia de la metalotioneína putativa de *T. vaginalis* y las otras probables metalotioneínas mostraron una identidad del 75.00 al 76.39% respectivamente (fig. 6), en el alineamiento se encontró una región conservada entre las secuencias, que se localiza aproximadamente en la parte media y se extiende hacia el extremo carboxilo (fig. 6).

Una búsqueda en el CDD (Conserved Domain Database) de NCBI utilizando como sonda la secuencia de la metalotioneína-like de *T. vaginalis* aislado HGMMN01 con un valor de E= 0.02, dio como resultado dominios de metalotioneínas pertenecientes a organismos marinos como ostras (*Crassostrea virginica*), ranas (*Xenopus laevis*) y cangrejos (*Potamon potamius*), entre otros

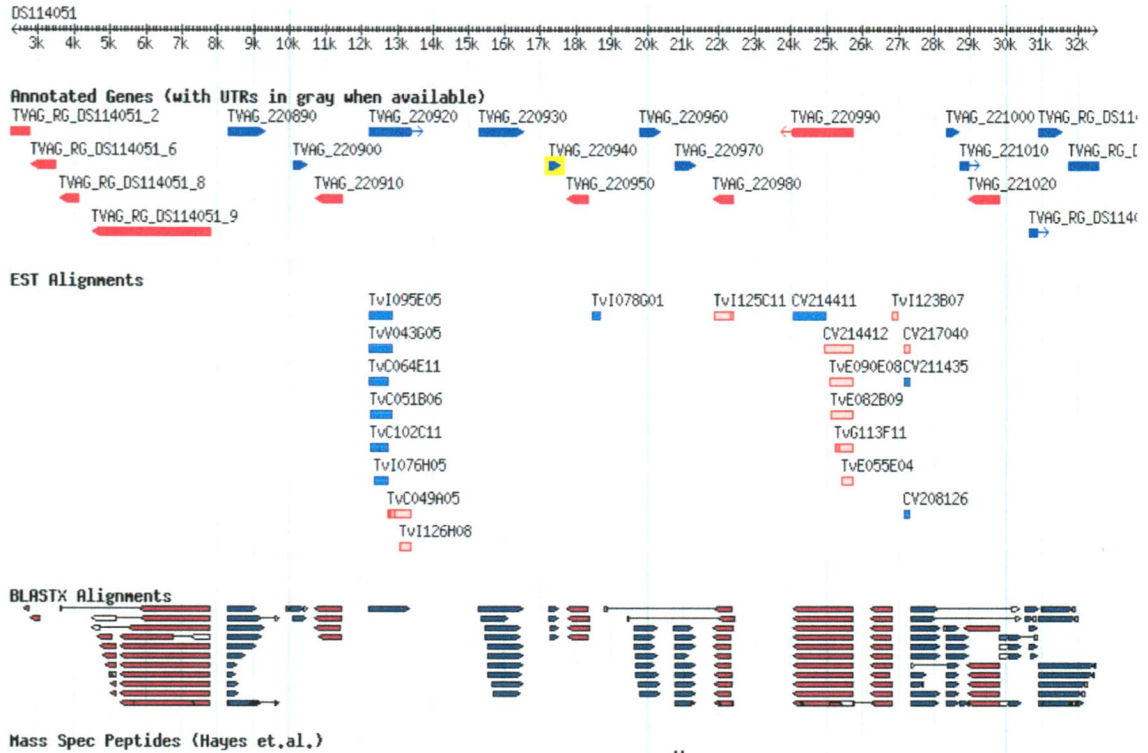
(con un valor de $E=1.51e-13$). Un alineamiento con estas secuencias y la del aislado HGMN01 muestran que la mayor similitud entre ellas son los aminoácidos cisteína, algunas lisinas, serinas y treoninas (fig. 7).

Las metalotioneínas son proteínas desordenadas, por lo que esta característica puede ser útil para la comparación de metalotioneínas ya caracterizadas y la identificación de otras que se encuentran en este proceso. Por lo anterior se realizaron análisis de desorden intrínseco con la secuencia de la MT de ser humano, la MT-like del aislado HGMN01 de *T. vaginalis* y de la cepa G3 y la de un organismo marino (*C. virginica*) derivado del análisis de dominios conservados. Las secuencias fueron analizadas mediante SPINE-D y se elaboraron los gráficos a partir de los datos obtenidos. Un primer perfil comparativo entre la MT-like del aislado HGMN01 de *T. vaginalis* y la MT-like de la cepa G3, muestran un grado de desorden muy similar, encontrándose una mayor tendencia al desorden en los extremos amino y carboxilo, siendo la parte media la que guarda un mayor orden en la secuencia (fig. 8). Para el caso de la MT-like del aislado HGMN01 y la del ser humano, es igualmente apreciable una mayor tendencia al desorden en los extremos amino y carboxilo, presentándose en la parte central de las secuencias un mayor grado de orden, siendo aún mayor para la MT de humano. En el perfil comparativo con la MT de *C. virginica* la tendencia de desorden sigue apreciándose igualmente en los extremos de las secuencias, sin embargo en la parte central de éstas, la correspondiente a *C. virginica* muestra una mayor tendencia al desorden que la del aislado HGMN01.

Como podemos observar en la figura 12 correspondiente al análisis filogenético, los distintos organismos se agruparon en clados pertenecientes a plantas, mamíferos y organismos marinos. También se formaron clados pertenecientes a las secuencias de metalotioneínas de un mismo organismo, tal es el caso de *Entamoeba invadens*, *Candida glabrata* y *Trichomonas vaginalis*. La MT-like de *T. vaginalis* analizada en este trabajo con número de secuencia XP001304130.1 se agrupó con la XP001321197, con un valor de soporte de 1. Es

importante mencionar que esta proteína se encuentra anotada en la base de datos UniprotKB como perteneciente a la familia de las metalotioneínas. Otras secuencias de proteínas de *T. vaginalis* agrupadas en el clado, pero en otro subnodo fueron la XP001584034.1 y XP001321169.1, con un valor de soporte de 0.71; estas secuencias surgieron como otras posibles MT-like de *T. vaginalis* a través de un análisis *in silico* en el cual se utilizó como sonda la MT-like con la que se trabajó en esta investigación (XP001304130.1).

A



B

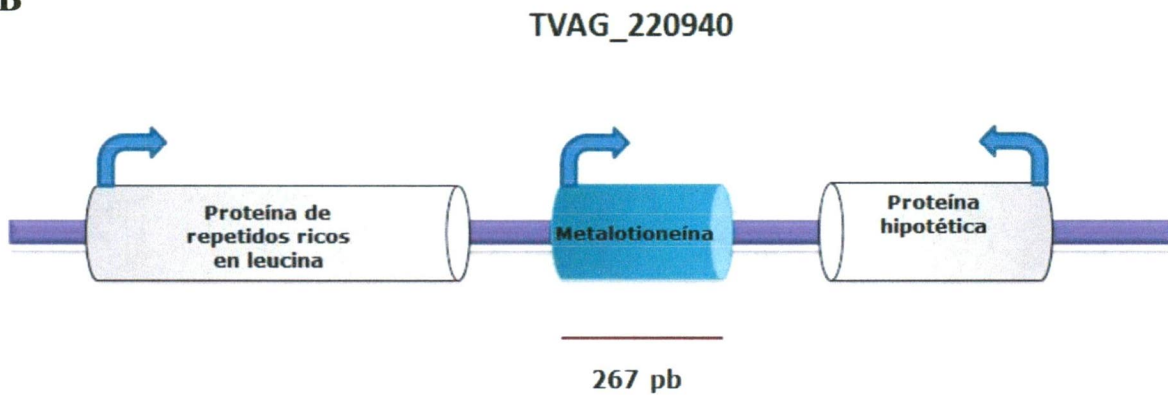


Figura 5 Localización del gen codificante de metalotioneína-like (*tvmt*) en el genoma de *T. vaginalis*

En el panel A se muestra la ubicación en el genoma del gen codificante para la metalotioneína putativa de *T. vaginalis* (*tvmt*), éste se encuentra identificado con el nombre TVAG_220940 y tiene un tamaño de 267 pb (remarcado en amarillo), está rodeado por un gen que codifica a una proteína hipotética de repetidos ricos en leucina en el mismo sentido de la transcripción que *tvmt* y en el sentido contrario se encuentra un gen que codifica para una proteína hipotética. En el panel B se muestra un esquema que representa el gen codificante de la metalotioneína putativa y los genes flanqueantes.

TABLA 6. Características de posibles metalotioneínas de *T. vaginalis*

Acceso NCBI/UniProtKb	ID Trichdb	Nombre	Descripción
XP_001304130.1/ A2FV64	TVAG_220940	Metalotioneína putativa	<ul style="list-style-type: none"> • Tamaño: 9.66 kDa • Función molecular: unión de iones metálicos • Familia: superfamilia de las metalotioneínas
XP_001321169.1/ A2EEEE0	TVAG_485930	Proteína putativa sin caracterizar	<ul style="list-style-type: none"> • Tamaño: 23.699 kDa • Función molecular: unión de iones metálicos • Muy similar con la superfamilia de las metalotioneínas
XP_001584034.1/ A2D922	TVAG_182840	Proteína putativa sin caracterizar	<ul style="list-style-type: none"> • Tamaño: 16.527 kDa • Función molecular: unión de iones metálicos • Muy similar con la superfamilia de las metalotioneínas
XP_001321197.1/ A2EEG8	TVAG_486210	Proteína de la familia de las metalotioneínas	<ul style="list-style-type: none"> • Tamaño: 32.588 kDa • Función molecular: unión de iones metálicos • Familia: superfamilia de las metalotioneínas

```

TVAG_182840 102 CKCGFDCHCTKDNKCCPECKCGEGCHCCGCKCGPDCHCTKDNKCCPE-----
TVAG_220940 36 CMCGNDCHCTKDNKCSFDCHCGEGCHCNEGCKCGNDCHCTKDNKCSFD-----
TVAG_485930 149 -----KCSFDCHCGEGCHCNEGCKCGADCHCTKDNKCSFDCHCGEGC
TVAG_486210 166 CKCGSNCHCTKDNKCSFDCHCGEGCHCNEGCKCGSNCHCTKDNKCSFDCHCGEGC

```

Secuencia	% de identidad			
	TVAG_220940	TVAG_182840	TVAG_485930	TVAG_486210
TVAG_220940	100	73.86	76.39	75.00

Figura 6. Posibles metalotioneínas codificadas en el genoma de *T. vaginalis*

La secuencia de la metalotioneína-like de *T. vaginalis* (TVAG_220940) fue utilizada como sonda para encontrar otras posibles metalotioneínas-like codificadas en el genoma de *T. vaginalis*; se realizó un alineamiento con las secuencias obtenidas y se identificó la zona más conservada entre ellas (enmarcada en rojo), en la figura se muestra la parte del alineamiento donde se encontró la mayor similitud entre estas secuencias. La tabla que se encuentra debajo del alineamiento muestra el % de identidad de cada secuencia con respecto a la metalotioneína putativa de *T. vaginalis*.

A

```

          10      20      30      40      50      60      70
          .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
Crassostrea virginica 2 SDP-----CNCIETGTGACSD-SCP-ATGCKCGPGCKCG-DDCKCAGCkvkCSCTeeGGCKGEGkCTGPATCKCGS 69
Xenopus laevis       1 MDPq----dCKCETGASCSCGT-TCS-CSNCKCTSCXKSC-CSCCPAEC---SKCS--QGCHCEK-GSK--KCSCCN 62
Potamon potamius    1 FDPpaaegtCECEEG---KCKA-GCK-CTSCRCSPECKCT-SECECKSK---EECA--KNCTKP-----CSCCP 58
Callinectes sapidus IIB 2 PDPpcn-dkCECKEG---ECKT-GCK-CKSCRCPDCKCS-SECKTSK---EECS--KTCSKP-----CSCCP 58
Callinectes sapidus IB 2 PGPpcn-dkCVCEG---GCKA-GCQ-CTSCRCSPOQKCT-SGCKCATK---EECS--KTCTKP-----CSCCP 58
Dreissena polymorpha 2 SDP-----CNCVETGDCRCADqSCSdCSNCKCGDSCKCS-KPNCCGKNv-tCKCG--ENCQCGVgCTGPDSCTCDS 68
Crassostrea angulata 2 SDP-----CNCIETGTVCVSE-SCP-ATGCKCGLGCKCG-DGCKCSGCKvkCNCS--GSCGCGKqCTGPENCKCAN 67
Mytilus edulis      2 PAP-----CNCIETNVICIDT-GCS-GEGCRCGDACKCSgADCKCSGCKvkvCKCS--GRCEGKqCTGPSTCKCAP 68
Mytilus galloprovincialis 2 PGP-----CNCIETNVICIGT-GCS-GKCCQCGDACKCA-SGCGCSGCKvkvCRCS--GTACGCGdCTGPINCKCES 67
Perna viridis       2 PSP-----CNCIETQVICIGT-GCS-GEGCRCGDACKCS-SGCGCSGCKvkvCKCQp-GEACGKqCTGPDTCKCDS 68

```

B

```

C.angulata          1 MS-DPCNCTETGTGCVCS-SCP--ATGCKCGLGCKCGD-GCKCSGCKVKC-NCS--GSCGG
C.sapidusIB        1 MP-GPC-CN--DKVCOGGGCK--AGCQCT-SCRCSP---CQKCTSGC-KCA--TKEEC
C.sapidusIIB       1 MP-DPC-CN--DKCECKGGECK--TGCKCK-SCRCP---CDKCSSEC-KCT--SKEEC
C.virginica        1 MS-DPCNCTETGTGACSD-SCP--ATGCKCGPGCKCGD-DCKCAGCKVKC-SCISEGGCK
D.polymorpha       1 MS-DPCNCTETGDCRCADGSCSdCSNCKCGDSCKCSKP--NCCGKNVTC-KCG--ENCOC
T.vaginalis       1 MS-AQ-----ETCQCNKQ-S--SENCDCGEGCKCHQKDC-----KCN--EGCKC
M.edulis           1 MP-APCNCIETNVICIDT-GCS--GEGCRCGDACKCSGADCKCSGCKVVC-KCS--GRCEC
M.galloprovincialis 1 MP-GPCNCTETNVICIGT-GCS--GKCCQCGDACKCAS-GGCGSGCKVVC-RCS--GTCAC
P.potamius         1 -P-DPC-CA-EGTCECEEGKCK--AGCKCT-SCRCSP---CEKCTSEC-ECK--SKEEC
P.viridis          1 MP-SPCNCIETQVICIGT-GCS--GEGCRCGDACKCSS-GGCGSGCKVVC-KCQP-GEAC
X.laevis           1 MDPQDCRCETGASCSCGT-TCS--CSNCKCT-SCRKSC---CSCCPAEC-CKCS--QGCHC
consensus          1 mp pcnciet C C egc gCkCg Ckcs c c gc v c kCs c C

C.angulata          54 GRGCTGPENCKCANDSGCVCKVKCN-C-S 80
C.sapidusIB        47 SKCTKP-----CSCCPK 59
C.sapidusIIB       47 SKTCSKP-----CSCC-P 58
C.virginica        56 GEKCTGPATCKCG--S-----GCSCK-K 75
D.polymorpha       55 GVGCTGPDSCICD-S-----GCS-C-K 73
T.vaginalis       39 GNDCHCTKDNKCS--P-----DCHCD-H 58
M.edulis           55 GRGCTGPSTCKCA--P-----GCS-C-K 73
M.galloprovincialis 54 GCDCTGPINCKCE--S-----GCS-C-K 72
P.potamius         47 ARNCTKP-----CSCC-P 58
P.viridis          55 GKQCTGPDTCCKD-S-----GCS-C-K 72
X.laevis           52 ERG-----S--K-----KSCC-N 62
consensus          61 gk ctgp ckc Cscck

```

Figura 7. Búsqueda de dominios conservados

La búsqueda en la base de datos de dominios conservados de NCBI (CDD) utilizando como sonda la secuencia de la MT-like *T. vaginalis* aislado HGMN01 dio como resultado dominios de metalotioneínas pertenecientes a organismos marinos como ostras (*C. virginica*), ranas (*X. laevis*) y cangrejos (*P. potamius*) como se puede observar en el panel A. Por otra parte en el panel B se muestra el alineamiento de las secuencias y la correspondiente a *T. vaginalis* aislado HGMN01, los aminoácidos sombreados en negro son aquellos que son idénticos en la secuencia y en gris aquellos que son semejantes, en azul se muestra la secuencia consenso estando en mayúsculas aquellos aminoácidos que son idénticos y en minúsculas aquellos que son similares.

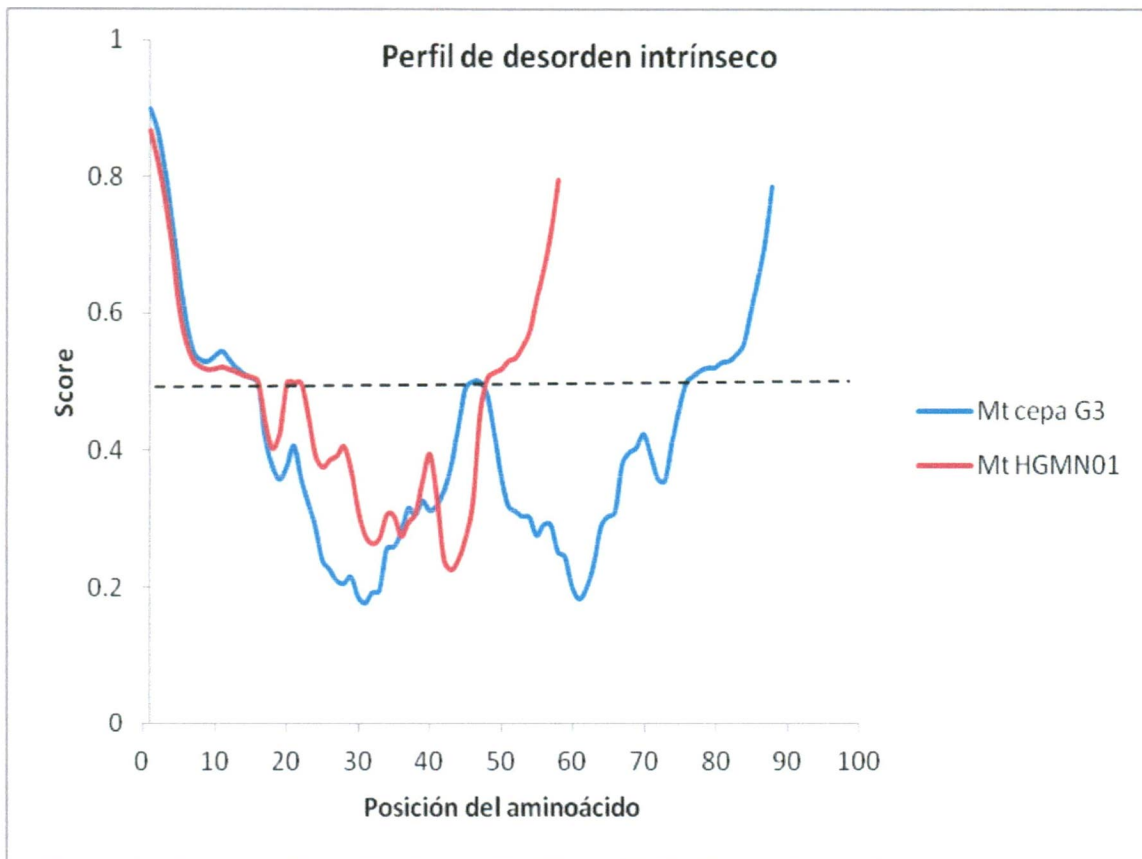


Figura 8. Perfil de desorden intrínseco de MT-like de *T. vaginalis* aislado HGMN01 y cepa G3.

En el gráfico se muestran los perfiles de desorden para las MTs-like de ambos aislados, en azul el correspondiente a la cepa G3 y en rojo el de HGMN01. El perfil se observa muy similar para ambas secuencias, considerando que un score mayor a 0.5 es indicativo de desorden para dicho aminoácido en la secuencia proteica. El mayor grado de desorden es presentado en los extremos de la proteína, manteniéndose la parte central de la secuencia con una mayor tendencia al orden.

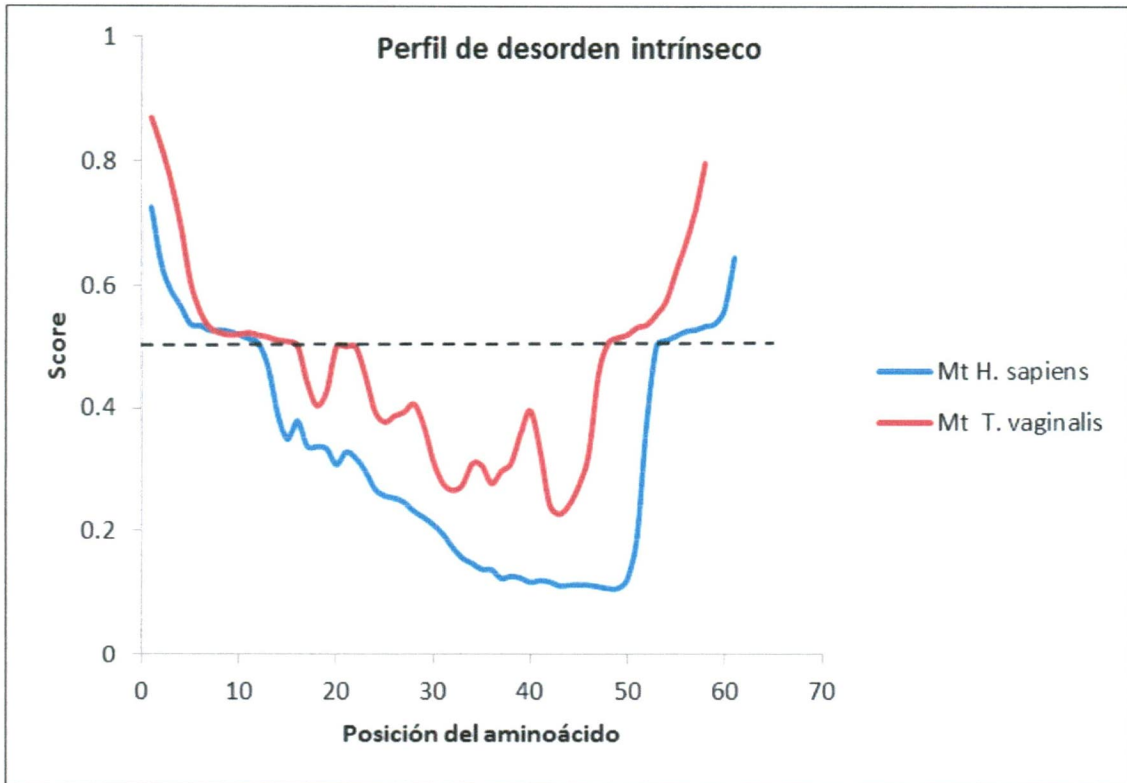


Figura 9. Perfil de desorden intrínseco de MT-like de *T. vaginalis* aislado HGMN01 y de *H. sapiens*

En azul se muestra la secuencia de la MT correspondiente al humano y en rojo a la de *T. vaginalis* aislado HGMN01. Un score mayor a 0.5 es indicativo de desorden para dicho aminoácido. Los perfiles de desorden son similares para ambas secuencias, presentándose ligeramente un mayor grado de desorden en el extremo amino terminal con un valor máximo de 0.87 para la MT-like de HGMN01 y 0.73 para la de humano, en el extremo carboxilo terminal con un score de 0.80 y 0.65 respectivamente. En la parte central de las secuencias es donde se observa una mayor tendencia al orden, siendo aún mayor para la MT de humano.

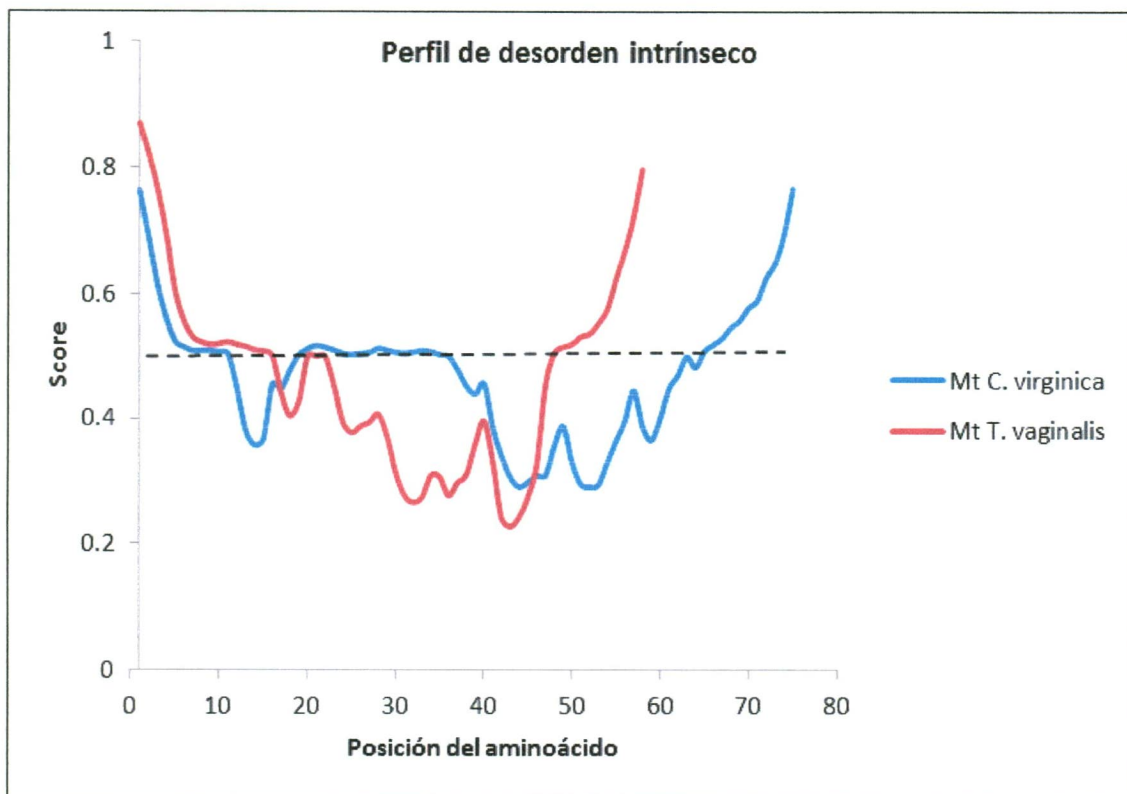


Figura 10. Perfil de desorden intrínseco de MT-like de *T. vaginalis* aislado HGMN01 y de *C. virginica*

La secuencia de la MT de *C. virginica* guarda similitud con la del aislado HGMN01 por lo que se compararon los perfiles de desorden para ambas secuencias. Un valor mayor a 0.5 es considerado como desorden para dicho aminoácido. El mayor grado de desorden para ambas secuencias se puede observar en los extremos y con valores de desorden muy similares entre ellos, sin embargo en la parte central de las secuencias, la correspondiente a *C. virginica* muestra una mayor tendencia al desorden que la del aislado HGMN01.

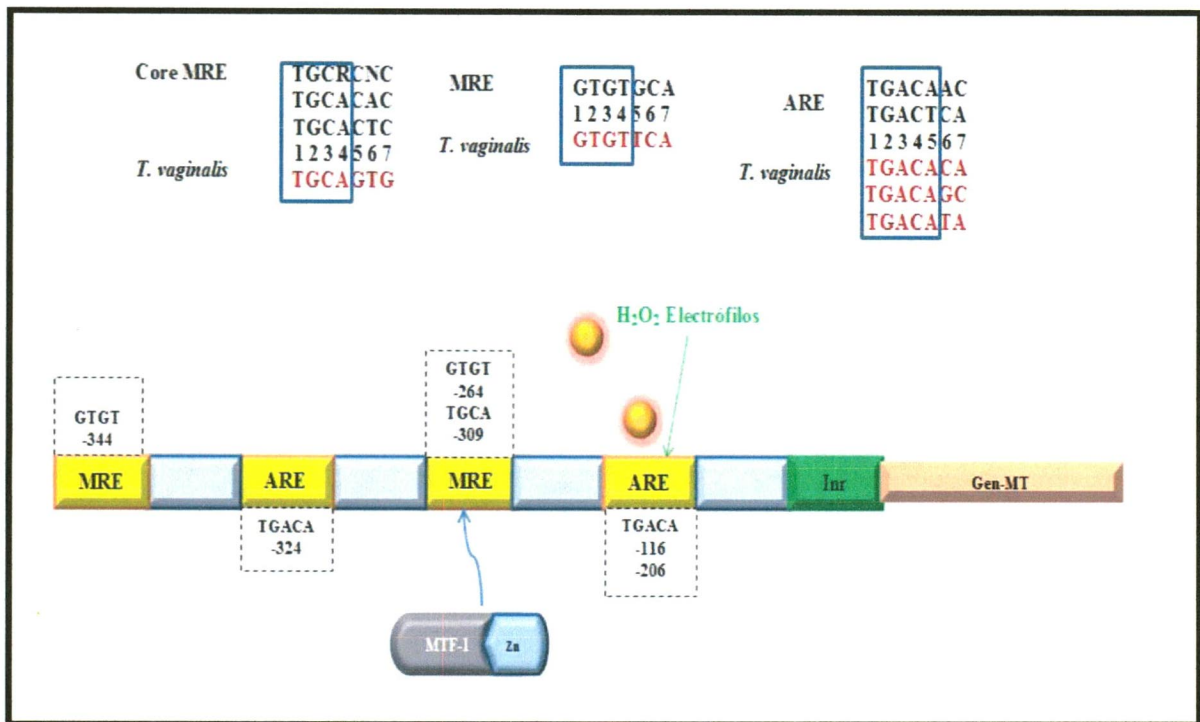


Figura 11. Elementos MREs y AREs en el promotor de *tvmt* de *T. vaginalis*

En la imagen se muestran los elementos de respuesta a metal (MREs) que son el sitio de unión para el factor de transcripción MTF-1 y los elementos de respuesta antioxidante (AREs) que es una vía secundaria activada por estrés oxidativo para la transcripción de *tvmt*. Los números en las cajas punteadas muestran la posición de cada una de estas secuencias con respecto al sitio de inicio de la transcripción del gen. La secuencia consenso de los MREs generalmente comprende de siete nucleótidos, de los cuales en *tvmt* se conservan cuatro. Los AREs también cuentan generalmente con siete nucleótidos de los cuales cinco son los más conservados y que son los mismos que se encuentran en *tvmt*.

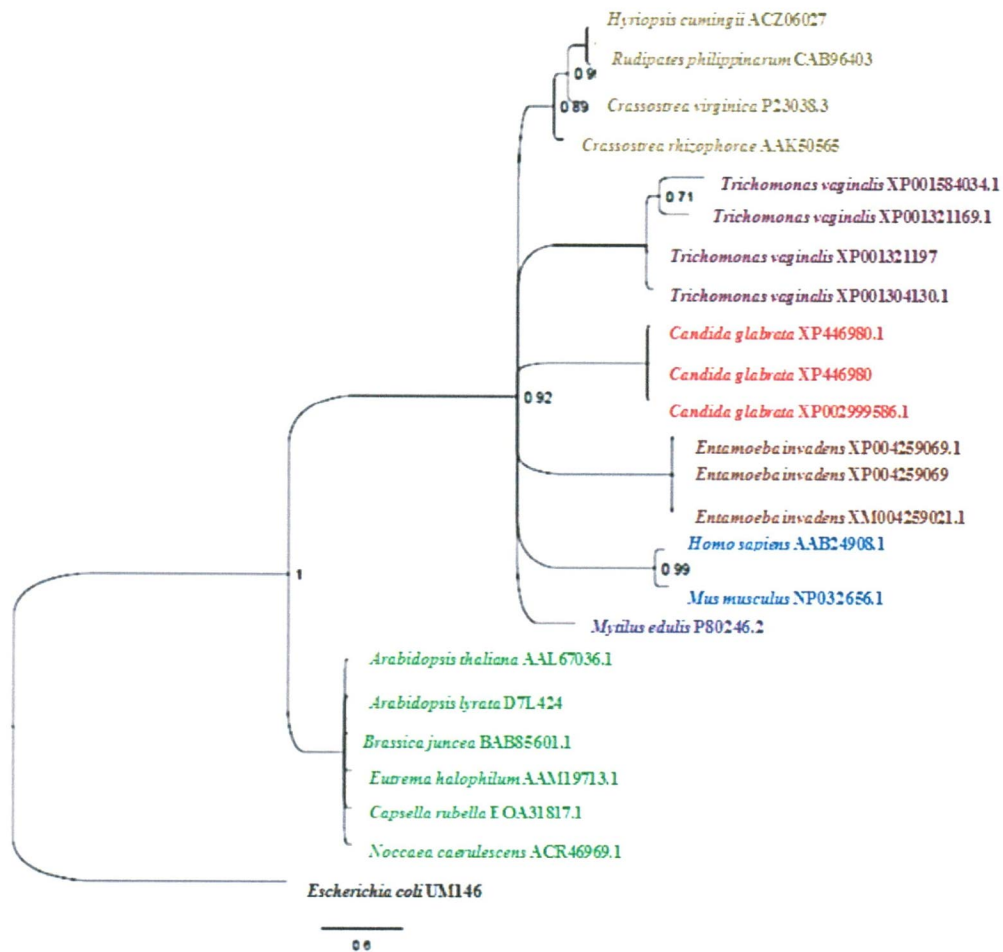


Figura 12. Análisis filogenético de las MTs-like de *T. vaginalis* y de diversos organismos

El árbol filogenético se construyó con las secuencias de las MTs-like de *T. vaginalis* y las de diversos organismos, se incluyó a *Candida glabrata* el cual es otro patógeno del tracto urogenital de humanos, así como otro parásito protozoario: *Entamoeba invadens*. También se incluyen organismos marinos como *Crassostrea virginica*, *Mytilus galloprovincialis*, *Crassostrea rhizophorae*, *Hyriopsis cumingii* y *Rudipates philippinarum*; mamíferos como *Homo sapiens* y *Mus musculus*; plantas: *Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis lyrata*, *Brassica juncea*, *Eutrema halophilum*, *Capsella rubella* y *Noccaea caerulea* así como un organismo procarionte: *Escherichia coli*.

En las ramas se muestran los valores de probabilidad posterior obtenidos, expresados en decimales.

Frente al nombre de cada organismo aparecen los nombres de acceso de NCBI para cada secuencia.

8.2 Amplificación mediante PCR y RT-PCR del gen *tvmt* de *T. vaginalis* aislado HGMN01

Utilizando como molde DNA genómico de *T. vaginalis* aislado HGMN01 se procedió a la amplificación del gen de interés, para ello se utilizaron los iniciadores que se diseñaron a partir de la secuencia de la metalotioneína putativa de *T. vaginalis* cepa G3 (TVAG_220940), esperando un amplicón de 267 pb. Se corrió un gel de agarosa al 2% y se observaron 2 bandas, con un tamaño aproximado de 200 y 300 pb (fig. 13). Para poder descartar la presencia de intrones se realizó una RT-PCR utilizando los mismos iniciadores, presentándose nuevamente las dos bandas, de 200 y 300 pb (fig. 13).

8.3 Clonación y secuenciación del gen *tvmt* de *T. vaginalis* aislado HGMN01

Los fragmento para la clonación se obtuvieron mediante amplificación por PCR utilizándose como molde DNA genómico de *T. vaginalis* aislado HGMN01. Como se mencionó anteriormente, en la amplificación mediante PCR se presentaron dos bandas (200 y 300 pb) por lo que se procedió al corte y purificación de cada una de ellas, se corroboró la correcta purificación de los fragmentos corriendo un gel de agarosa al 2% (fig. 14). Una vez obtenidas las bandas purificadas se procedió a la clonación de cada uno de los fragmentos, el vector utilizado fue pJET 1.2/blunt. Este vector contiene un sistema de selección positiva en el cual la expresión de un gen letal es interrumpida cuando el inserto de DNA de interés es ligado dentro del sitio de clonación, como resultado solamente las células que contienen el plásmido recombinante podrán propagarse. La selección de clonas positivas se realizó mediante PCR-colony, identificándose clonas para cada uno de los fragmentos de 200 y 300 pb (fig. 15), estas clonas se propagaron y posteriormente se extrajo el DNA plasmídico el cual fue purificado.

Para conocer la secuencia del gen y verificar que se encontraba en marco de lectura, se secuenció el DNA plasmídico de cada uno de los fragmentos (200 y 300 pb), en el secuenciador Genetic Analyser (Applied Biosystem), las secuencias obtenidas fueron analizadas utilizando el programa Bioedit.

El fragmento clonado de aproximadamente 300 pb tuvo un tamaño real de 267 pb, esto obtenido mediante secuenciación, sin embargo, este fragmento presentó una secuencia invertida que no alineaba con la de *T. vaginalis* cepa G3 (fig. 16, panel A). Se realizó el cambio de esta secuencia a la reversa complementaria y se obtuvo una secuencia casi idéntica a la de *T. vaginalis* cepa G3 pero presentó cambios en dos nucleótidos, uno en la posición 110 y otro en la posición 208 (fig. 16, panel B).

El fragmento clonado de 200 pb tuvo un tamaño real de 177 pb, es decir 100 pb menos con respecto a la de *T. vaginalis* cepa G3, realizando un alineamiento de esta secuencia con la de la cepa G3 pudimos observar que la secuencia de nucleótidos en la que alinearon fue idéntica a excepción de que la del aislado HGMN01 es una secuencia más corta en 100 pb con respecto a la de la cepa G3 (fig. 17).

Dentro del procedimiento de clonación en el vector pJET 1.2/blunt se realiza una reacción de “blunting” (por medio de la enzima DNA-blunting) previo al paso de ligación; para corroborar que el fragmento de 177 pb no había sido afectado por este tratamiento se clonó nuevamente, ahora en el vector pCR 4-TOPO TA, para la clonación en este vector no es necesario llevar a cabo la reacción de “blunting” e implica básicamente la mezcla del producto de PCR con la solución de sales incluidas en el kit y el vector; igualmente se seleccionaron las clonas positivas, se extrajo el DNA plasmídico y se secuenció. El resultado de la secuenciación fue nuevamente el de una secuencia de 177 pb que alineaba en forma idéntica con la secuencia de referencia (*T. vaginalis* cepa G3) con la diferencia de las mismas 100 pb menos (figs. 18 y 19).

Una vez realizada la traducción de nucleótidos del fragmento de 177 pb a aminoácidos de la MT-like del aislado HGMN01, se obtuvo una secuencia de 58 aminoácidos, que fueron 30 aminoácidos menos con respecto a la de la cepa G3 (fig. 20).

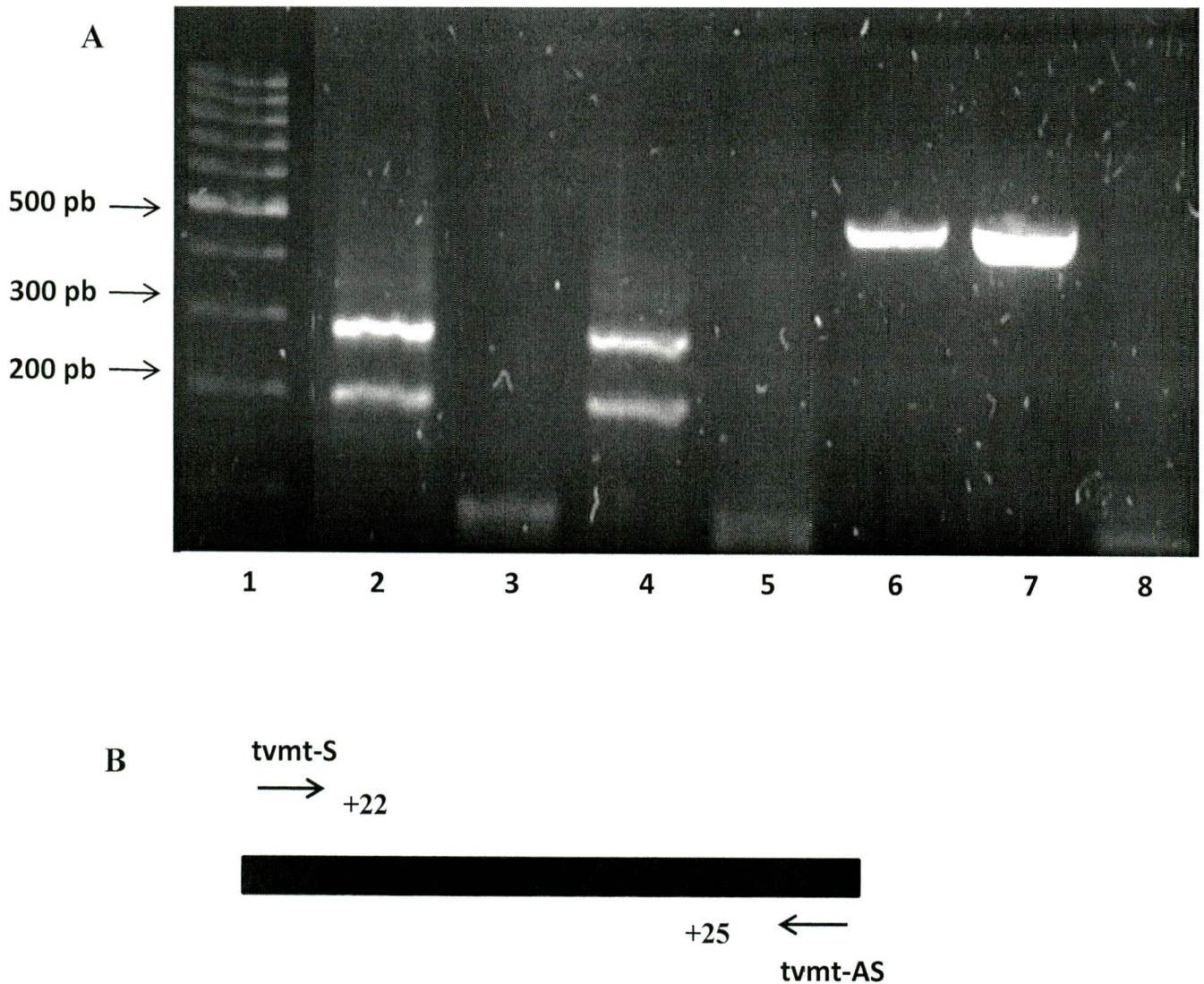


Figura 13. Amplificación del gen *tvmt* de *T. vaginalis* aislado HGMN01

Las amplificaciones de *tvmt* se hicieron a partir de DNA genómico y cDNA con el objetivo de verificar la presencia de intrones en este gen.

A) Carriles: 1) Marcador de 100 pb, 2) Amplificación de *tvmt* a partir de DNA genómico, 3) Control negativo de la reacción, 4) Amplificación de *tvmt* a partir de cDNA, 5) RT- de la reacción, 6) Amplificación de *tveIF-5A* a partir de DNA genómico, 7) Amplificación de *tveIF-5A* a partir de cDNA, 8) RT- de la reacción. B) Esquema que representa la posición de los iniciadores sentido (S) y antisentido (AS) diseñados a partir de la secuencia de la metalotioneína putativa de *T. vaginalis* cepa G3.

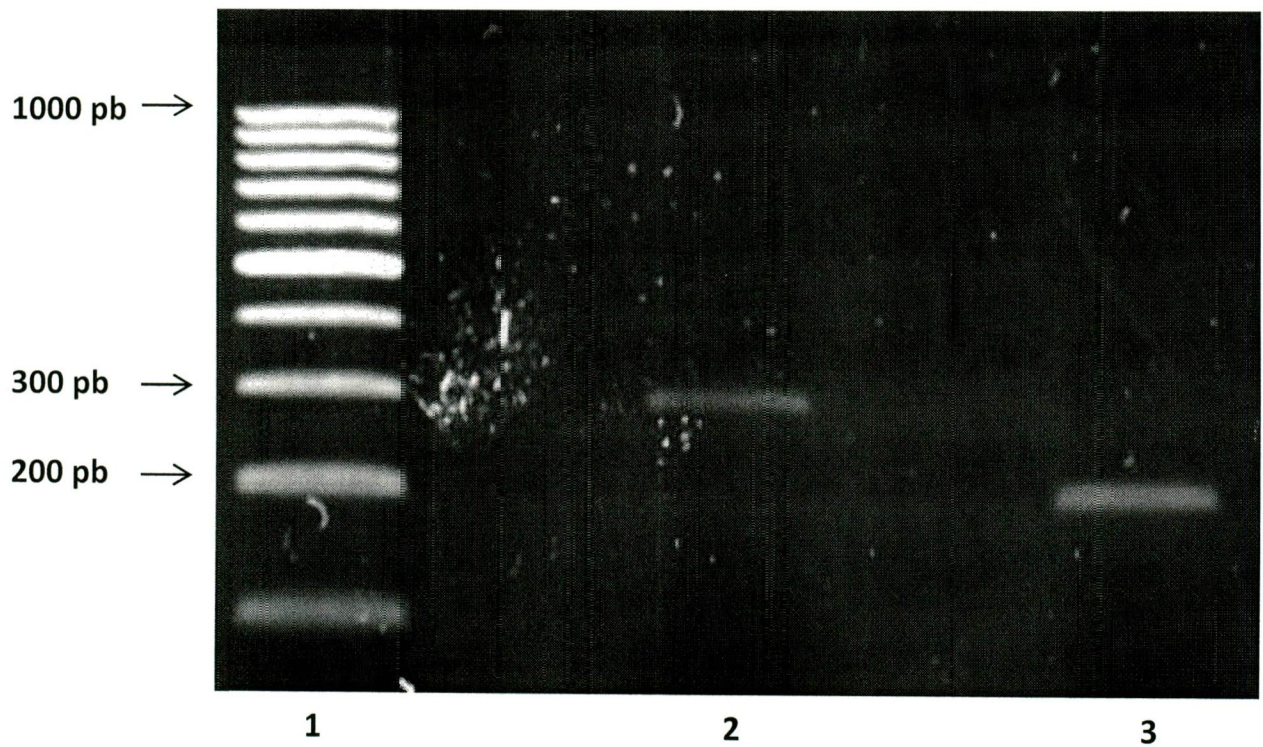


Figura 14. Bandas purificadas, obtenidas de la amplificación del gen *tvm*t de *T. vaginalis* aislado HGMN01.

Las bandas obtenidas en las amplificaciones utilizando los iniciadores diseñados a partir de la secuencia de la metalotioneína putativa de *T. vaginalis* cepa G3 fueron purificadas y corridas en un gel de agarosa al 2%. En el carril 1) Marcador de 100 pb, 2) Banda de 300 pb, 3) Banda de 200 pb.

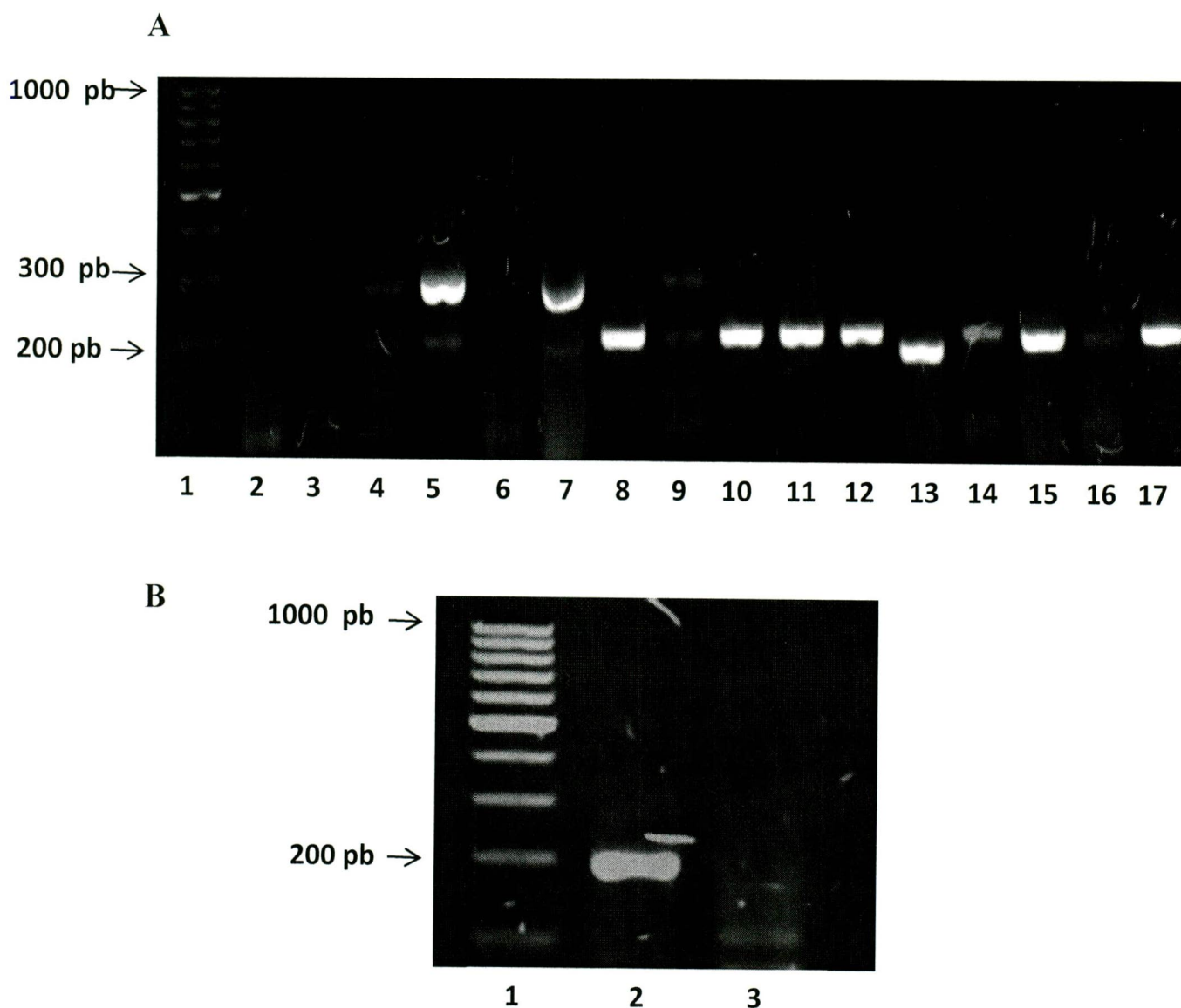
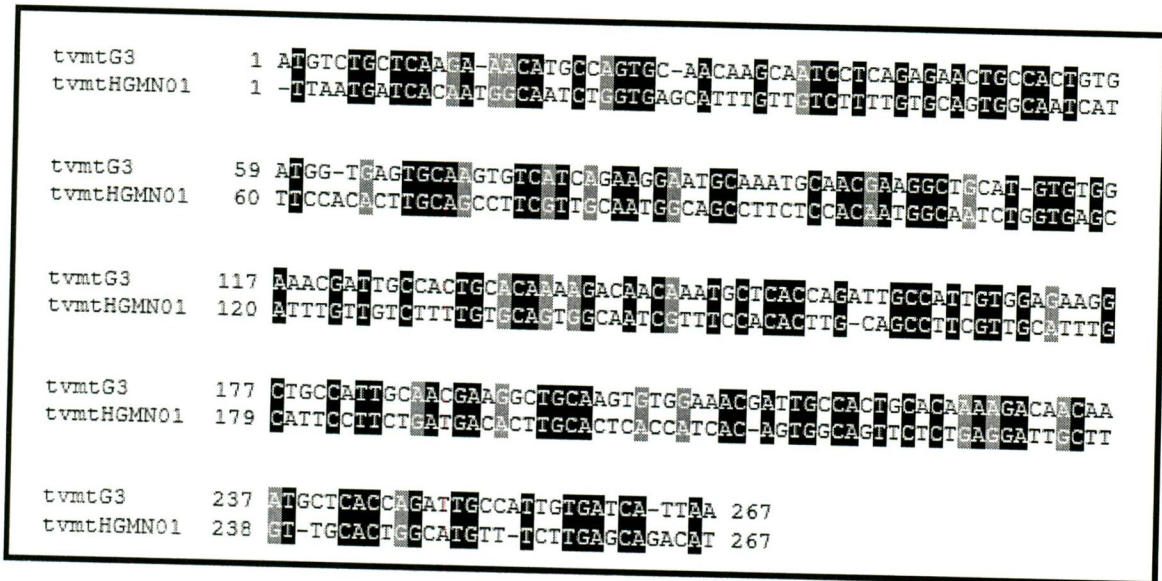


Figura 15. PCR-colony para la verificación de clonas positivas, usando el vector pJET 1.2/blunt

Células DH5 α fueron transformadas utilizando como vector de clonación el pJET 1.2/blunt. Las clonas positivas fueron verificadas mediante PCR-colony. En el panel A) carril 1) Marcador, carriles 2-10) clonas positivas y negativas para el inserto de 300 pb, carriles 11-17) clonas positivas y negativas para el inserto de 200 pb. En el panel B) carril 1) Marcador de 100 pb, 2) Control positivo de la reacción, 3) Control negativo de la reacción.

A



B

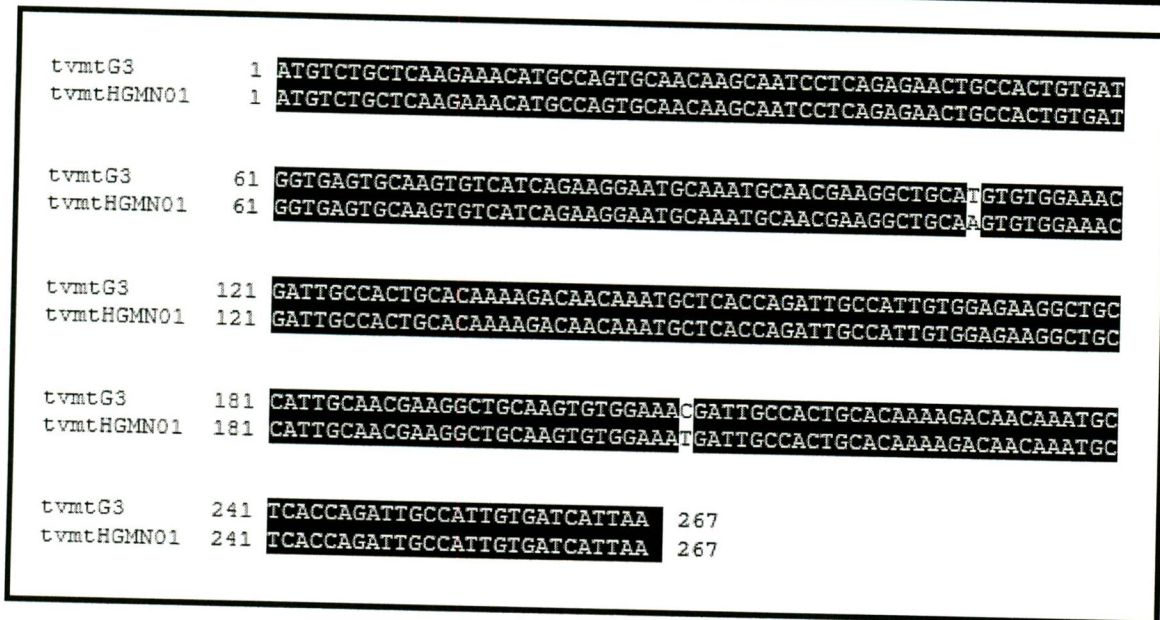


Figura 16. Alineamiento de secuencias de tvmt de *T. vaginalis* cepa G3 y fragmento de 267 pb del aislado HGMN01.

Las secuencia perteneciente al gen *tvmt* de *T. vaginalis* cepa G3 (tvmtG3) y la secuencia obtenida del aislado HGMN01 (tvmtHGMN01) fueron alineadas. En el panel A se muestra la secuencia original obtenida del aislado HGMN01, la cual está invertida. Al hacer el cambio en esta secuencia a la reversa complementaria como se muestra en el panel B, se puede apreciar que dichas secuencias (tvmtG3 y tvmtHGMN01) difieren por 2 nucleótidos.

Dentro de los alineamientos los nucleótidos idénticos se muestran en negro y los nucleótidos divergentes en blanco.

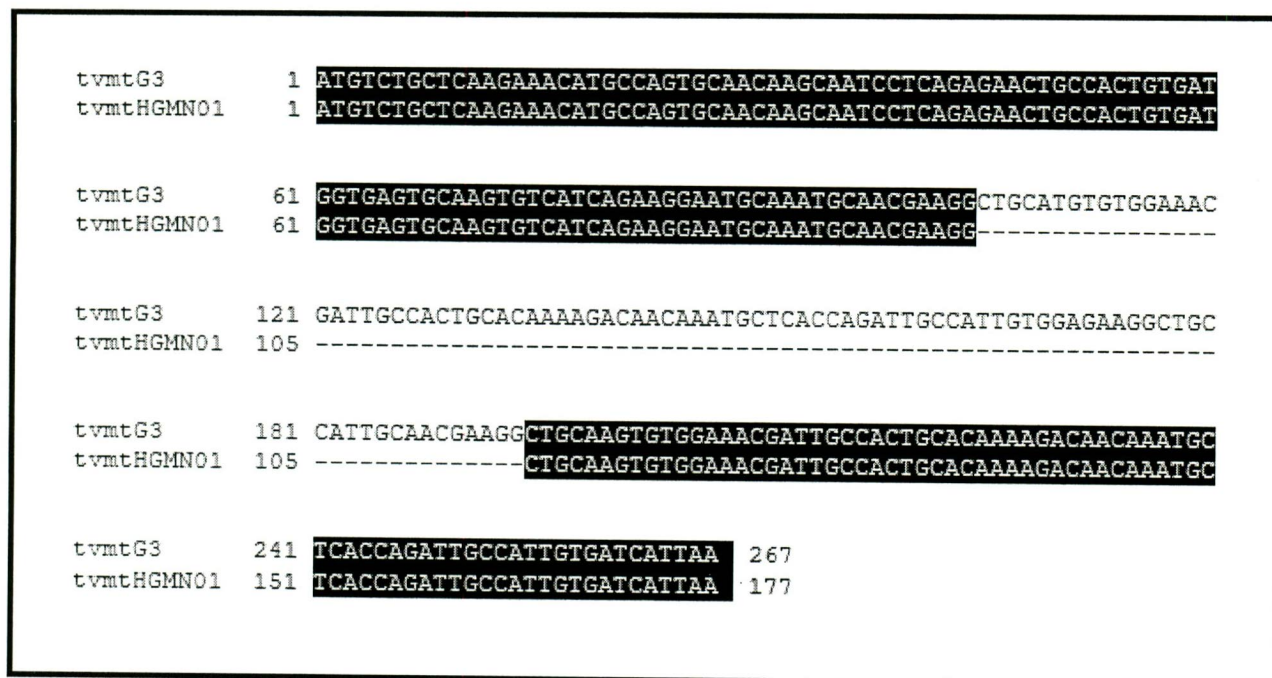


Figura 17. Alineamiento de secuencias de *tvmt* de *T. vaginalis* cepa G3 y fragmento de 177 pb del aislado HGMN01.

Se alinearon las secuencias pertenecientes a *tvmt* de *T. vaginalis* cepa G3 (tvmtG3 de 267 pb) y a la secuencia obtenida de 177 pb del aislado HGMN01 (tvmtHGMN01). Dentro del alineamiento los nucleótidos idénticos se muestran en negro y los nucleótidos divergentes en blanco.

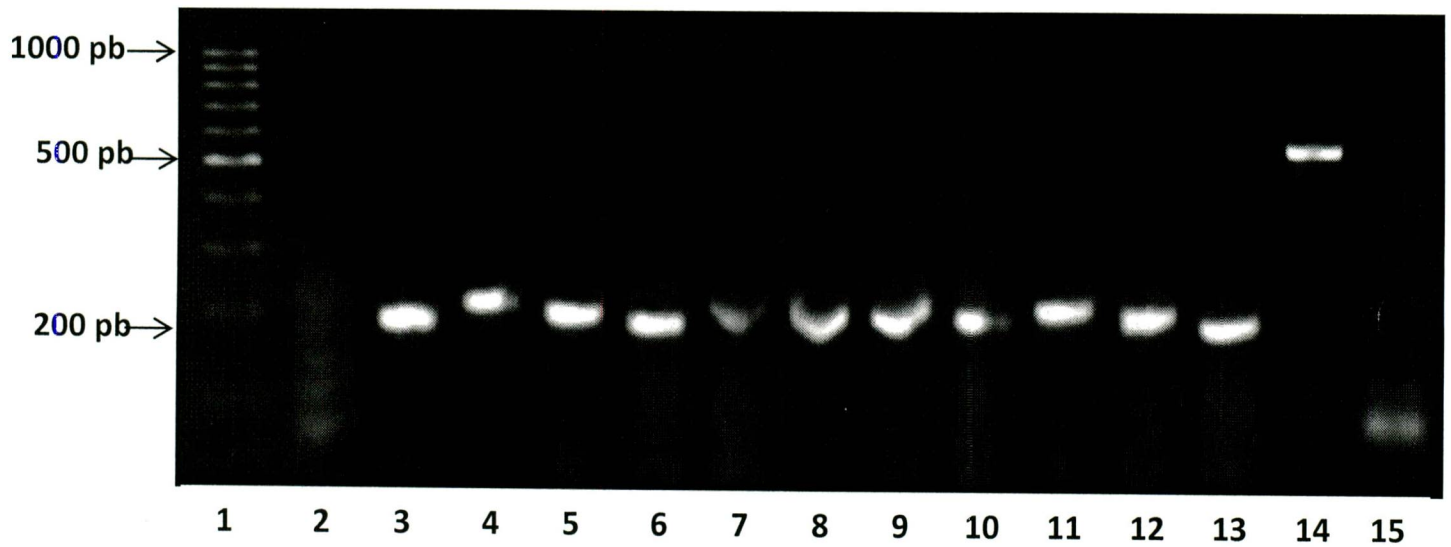


Figura 18. PCR-colony para la verificación de clonas positivas, usando el vector pCR 4-TOPO TA

Células Top10 fueron transformadas con el fragmento de 177 pb utilizando como vector de clonación el pCR 4-TOPO TA. Las clonas positivas fueron verificadas mediante PCR-colony. Carril 1) Marcador, carriles 2-13) clonas positivas y negativas para el inserto de 177 pb, carril 14) Control positivo de la reacción, 15) Control negativo de la reacción.

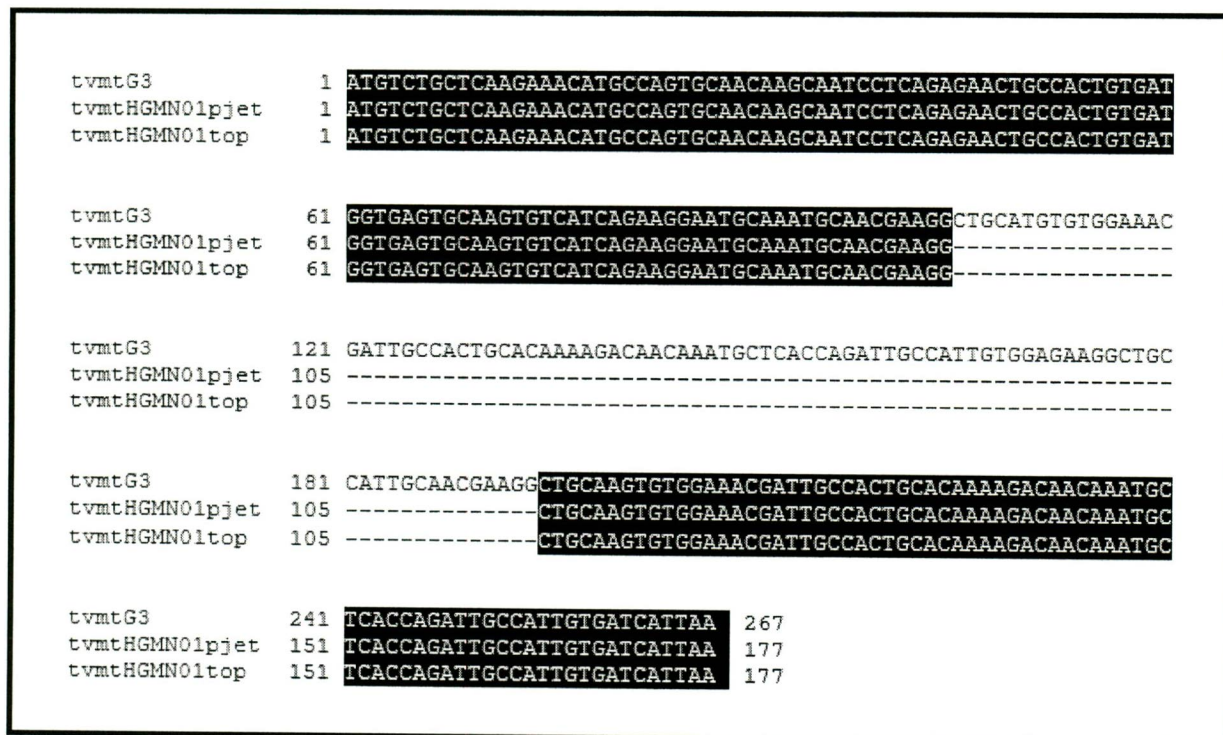


Figura 19. Alineamiento de secuencias de *tvmt* de *T. vaginalis* cepa G3 y fragmento de 177 pb del aislado HGMN01, clonado en vector pJET 1.2/blunt y pCR 4-TOPO TA.

En la figura se muestra un alineamiento hecho con las secuencias pertenecientes a *tvmt* de *T. vaginalis* cepa G3 (tvmtG3 de 267pb) y la secuencia del fragmento de 177 pb del aislado HGMN01, clonado en el vector pJET 1.2/blunt (tvmtHGMN01pjet) y en el vector pCR 4-TOPO TA (tvmtHGMN01top). Dentro del alineamiento los nucleótidos idénticos se muestran en negro y los nucleótidos divergentes en blanco.

Como se puede observar, aunque el fragmento haya sido clonado en distintos vectores es idéntico en tamaño (177 pb) y en secuencia.

```

MtG3      1  MSAQETCQCNCQSSENCHCDGECKCHQKECKCNEGCMCGNDCHCTKDNKCSPDCHCGEGC
MtHGMN01  1  MSAQETCQCNCQSSENCHCDGECKCHQKECKCNEG-----

MtG3      61  HCNEGCKCGNDCHCTKDNKCSPDCHCDH  88
MtHGMN01  36  -----CKCGNDCHCTKDNKCSPDCHCDH  58

```

Figura 20. Alineamiento de secuencias de las MTs-like de *T. vaginalis* cepa G3 y del aislado HGMN01.

A partir de la secuencia del fragmento de 177 pb del aislado HGMN01 se hizo la traducción a aminoácidos y se hizo un alineamiento con la de *T. vaginalis* cepa G3. En este alineamiento se pueden apreciar en color rojo los aminoácidos que son idénticos entre las secuencias, destacando las cisteínas en color azul. La diferencia de aminoácidos entre las secuencias es de 30, pero conservándose en su mayoría las cisteínas que son parte del sitio activo de estas proteínas.

8.4 Expresión del transcrito de *tvmt* en presencia de cationes divalentes

Para el análisis de expresión del transcrito de *tvmt* en presencia de cationes divalentes se diseñó un nuevo par de iniciadores, con la finalidad de obtener una sola banda. El tamaño del fragmento esperado fue de 104 pb, se realizó la amplificación mediante PCR y se corrió un gel de agarosa al 2% para verificar el tamaño del amplicón (fig. 21).

T. vaginalis se cultivó en presencia de los siguientes cationes: Zn^{2+} [1.6 mM], Fe^{2+} [0.25 mM] y [1.6 mM], Cd^{2+} [0.1 mM], Mn^{2+} [0.25 mM], putrescina ($NH_2(CH_2)_4NH_2$) [40 mM]. Como controles se utilizó el cultivo del parásito en medio TYM sin la adición de ningún catión y el cultivo en presencia de putrescina la cual es un policatión de origen no metálico. La viabilidad de los parásitos para cada una de las condiciones fue confirmada mediante la prueba de azul de tripano, siendo esta del 99 al 100%. Se extrajo el RNA de estos parásitos por el método de trizol, se sintetizó cDNA y se realizó la amplificación del gen por PCR. Los datos fueron normalizados contra los valores obtenidos con el gen control usando β -*tubulina*.

Mediante el análisis densitométrico por medio de la intensidad de cada una de las bandas correspondientes a cada condición y utilizando el programa Image Lab de Bio-Rad® se hizo la medición considerando como el 100% la expresión de *tvmt* en la condición normal (sin cationes).

La tendencia en los niveles de expresión relativa de *tvmt* bajo las condiciones descritas fue la siguiente:

Un mayor nivel de inducción con Cd^{2+} [0.1 mM] seguido de Fe^{2+} [1.6 mM], Zn^{2+} [1.6 mM], Fe^{2+} [0.25 mM], Mn^{2+} [0.25 mM] (fig. 22).

Cd^{2+} [0.1 mM] > Fe^{2+} [1.6 mM] > Zn^{2+} [1.6 mM] > Fe^{2+} [0.25 mM] > Mn^{2+} [0.25 mM]

La inducción con Cd^{2+} [0.1 mM] fue 6.2 veces mayor con respecto a la condición normal, con Fe^{2+} [1.6 mM] 1.2 veces mayor, con Zn^{2+} [1.6 mM] 0.8 veces más, con Fe^{2+} [0.25 mM] 0.7 veces más, con Mn^{2+} [0.25 mM] 0.2 veces más. La putrescina utilizada como control por ser un policationo no metálico no presento ningún incremento con respecto a la condición normal.

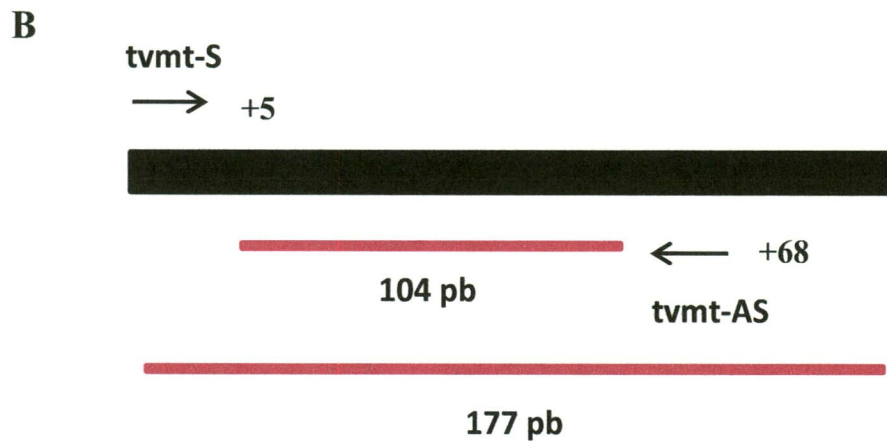
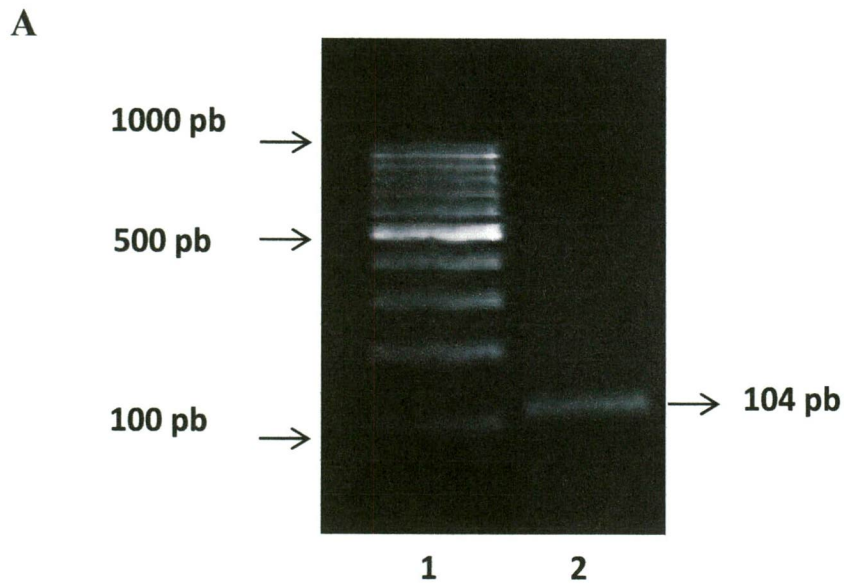
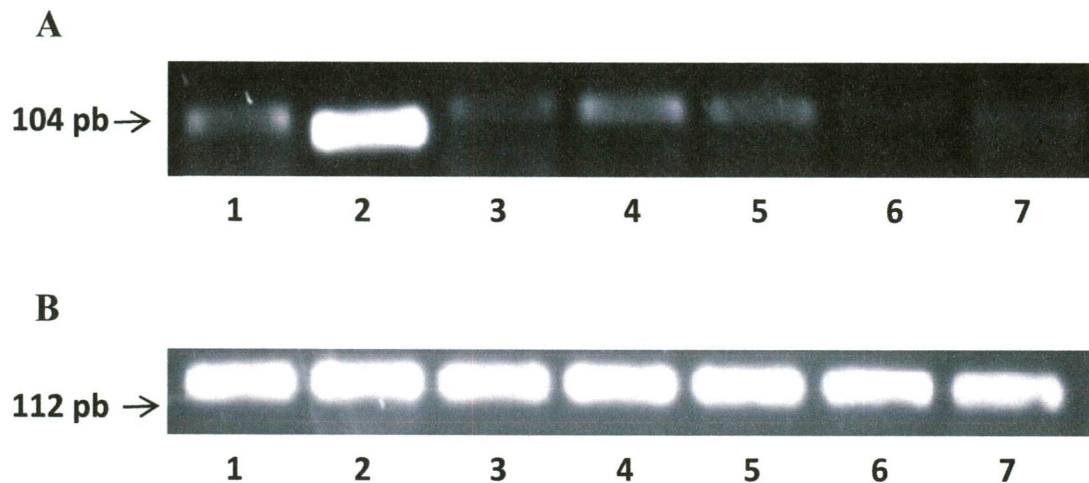


Figura 21. Amplificación del gen *tvmt* del aislado HG MN01 (104 pb)

Panel A. Se diseñaron iniciadores del gen *tvmt* del aislado HG MN01 para obtener un amplicon de 104 pb. Carril 1) marcador de 100 pb, 2) amplicon de 104 pb. Estos iniciadores fueron los que se utilizaron para hacer el análisis de expresión de este gen.

En el panel B se puede apreciar la ubicación de los iniciadores, encontrándose estos en una posición más interna de la secuencia del gen *tvmt* del aislado HG MN01.



C

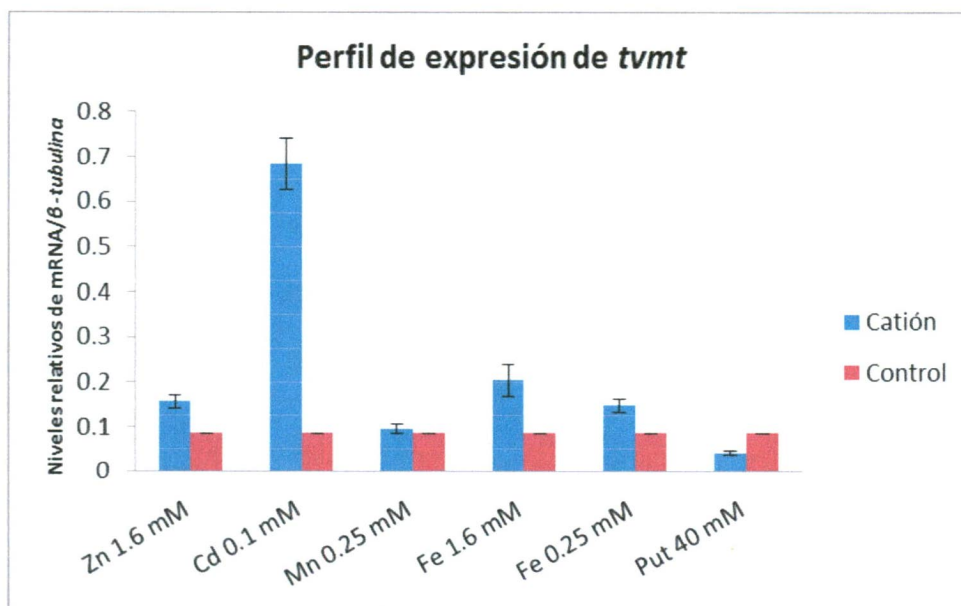


Figura 22. Expresión del gen *tvmt* en presencia y ausencia de cationes divalentes.

Panel A. Expresión del gen *tvmt* en presencia y ausencia de distintos cationes divalentes. Carril 1) Zn 1.6 mM, 2) Cd 0.1 mM, 3) Mn 0.25 mM, 4) Fe 1.6 mM, 5) Fe 0.25 mM, 6) putrescina 40 mM, 7) control (ausencia de cationes divalentes). Panel B. Control de carga con el gen β -*tubulina*, carriles: 1) Zn 1.6 mM, 2) Cd 0.1 mM, 3) Mn 0.25 mM, 4) Fe 1.6 mM, 5) Fe 0.25 mM, 6) putrescina 40 mM, 7) control (ausencia de cationes divalentes). Panel C. Densitometría de la expresión del gen *tvmt*. Las barras azules representan el nivel de expresión relativa respecto al cultivo control no tratado con cationes (barras rojas), y normalizados respecto a la expresión del gen de β -*tubulina*.

8.5 Inmunodetección de TvMT

Los anticuerpos anti-TvMT se obtuvieron inmunizando ratones Balb/c con el péptido sintético diseñado (secuencia: TKDNKCSPDCHCDH-MAP4). Una vez obtenidos los sueros preinmunes e inmunes se procedió a realizar los ensayos de western blot, usando membrana de nitrocelulosa y con extractos totales de proteínas de *T. vaginalis*.

En los ensayos de western blot se aprecia el reconocimiento por anticuerpos anti-TvMT de una proteína de aproximadamente 9.6 kDa (fig. 29), el peso de esta proteína es coincidente con el reportado para la metalotioneína putativa de *T. vaginalis*. Otras proteínas reconocidas por los anticuerpos anti-TvMT es una que tiene un peso aproximado de 32.6 kDa y otra de 35 kDa (fig. 29). En los análisis *in silico* para la búsqueda de otras posibles metalotioneínas en *T. vaginalis* (tabla 4) se encontró un gen que codifica para una proteína que está identificada pertenece a la superfamilia de las metalotioneínas y tiene un peso de 32.6 kDa, este hallazgo es coincidente con la inmunodetección y sugerente que además de la metalotioneína putativa de *T. vaginalis*, este parásito probablemente posea otras isoformas de esta proteína.

BIBLIOTECA UACM

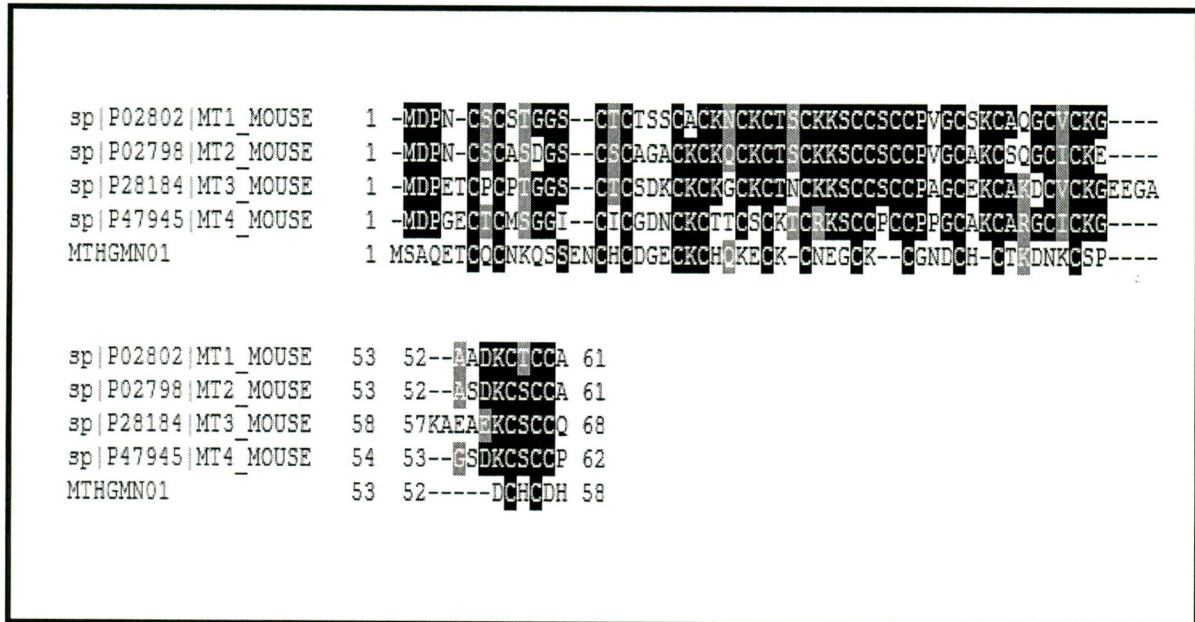


Figura 23. Alineamiento de secuencias de metalotioneínas de ratón y del aislado HGMN01.

En el alineamiento se muestran las secuencias de las metalotioneínas presentes en el ratón y la del aislado HGMN01. Los aminoácidos similares se encuentran sombreados en gris y los idénticos en negro, como se puede observar la mayor similitud que existe entre las secuencias del ratón y la de HGMN01 son las cisteínas, mostrando divergencia en la mayor parte de la secuencia.

Secuencia analizada:

MSAQ**ETCQCNKQSSENCH**CDG**ECKC**HQKECKCNEGCKCGN
DCH**CTKDNKCSPDCH**CDH

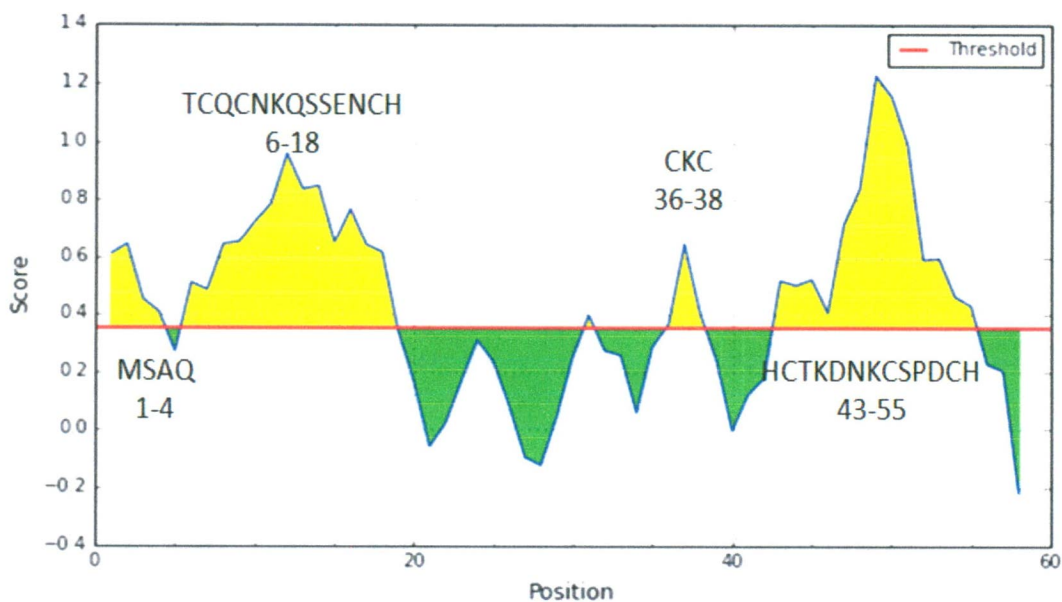


Figura 24. Análisis de antigenicidad de MT-like del aislado HGMN01 mediante Bepipred Linear Epitope Prediction.

En este gráfico se muestra el análisis de antigenicidad de la secuencia completa de la MT-like del aislado HGMN01, para la elaboración de este gráfico se consideraron parámetros de hidrofobicidad, flexibilidad, accesibilidad, superficie expuesta, polaridad y antigenicidad de la cadena polipeptídica. Los picos mostrados en amarillo pertenecen a una secuencia de aminoácidos con posibilidad de ser potenciales epitopes (aminoácidos marcados en azul en la secuencia completa) y los verdes a los de menor; en cada pico amarillo se muestra la secuencia de aminoácidos a la que pertenece así como su posición en el polipéptido.

A Análisis de antigenicidad de MT-like de HGMM01 con ABCpred y NetMHCII

Rank	Sequence	Start position	Score	Score H-2-IAb	Score H-2-IAd
1	KCGNDCHCTKDNKCSP	37	0.94	0.0141	0.0259
2	HCTKDNKCSPDCHCDH*	43	0.90*	0.0293	0.0434
3	HQKECKCNEGCKCGND	26	0.88	0.0116	0.0597
4	QSSENCHCDGECKCHQ	12	0.79	0.0084	0.0212
5	ETCQCNCQSENCHCD	5	0.72	0.0279	0.0428

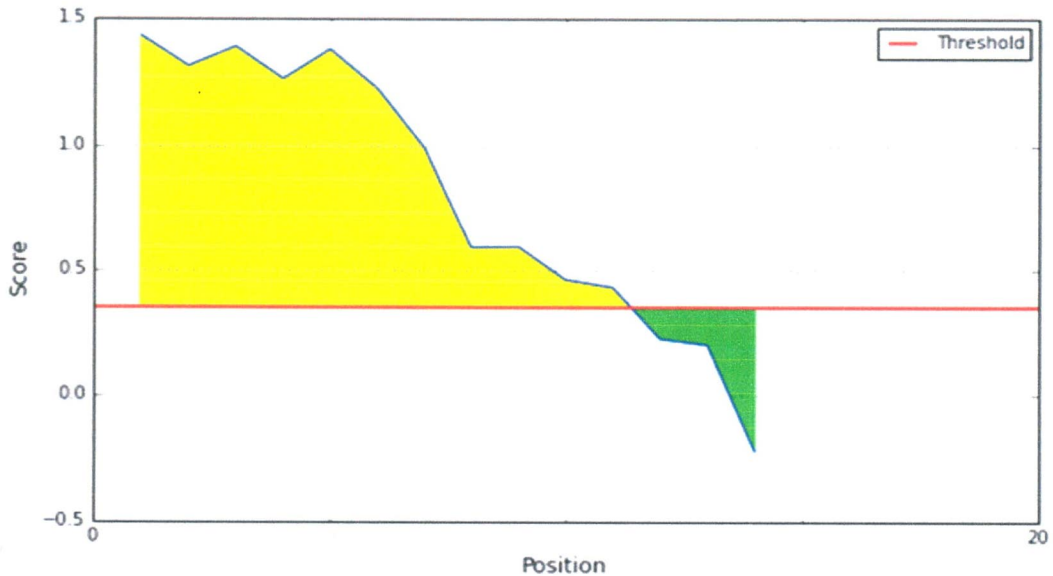
B Secuencia analizada:

MSAQETCQCNCQSENCHCDGECKCHQKECKCNEGCKCGNDCHCTKDNKCS PDCHCDH⁵⁸
 -----KCGNDCHCTKDNKCSP-----
 -----HCTKDNKCS PDCHCDH-----
 -----HQKECKCNEGCKCGND-----
 -----QSSENCHCDGECKCHQ-----
 -----ETCQCNCQSENCHCD-----

Figura 25. Análisis de antigenicidad mediante ABCpred y NetMHCII

En el panel A se muestra la tabla con los valores del análisis de antigenicidad para la MT-like del aislado HGMM01 mediante ABCpred, también se realizó el análisis para el complejo mayor de histocompatibilidad de ratón mediante NetMHCII, la secuencia marcada con asterisco (enmarcada con rojo en el panel B) indica al péptido candidato que es coincidente con el análisis realizado con Bepipred Linear Epitope Prediction. En el panel B se despliegan en color azul las secuencias de aminoácidos correspondientes a las enlistadas en la tabla del panel A.

A Secuencia analizada:
TKDNKCSPDCHCDH



B

Sequence	Start position	Score	Score H-2-IAb	Score H-2-IAd
TKDNKCSPDCHCDH	45	0.80	0.025	0.021

Figura 26. Análisis de antigenicidad de péptido sintético.

En el panel A se muestra el análisis de antigenicidad hecho con Bepipred Linear Epitope Prediction., los aminoácidos con mayores valores de antigenicidad son mostrados en amarillo en el gráfico y en color azul en la secuencia. En el panel B se muestran los valores del análisis de antigenicidad obtenidos con Bepipred Linear Epitope Prediction y del complejo mayor de histocompatibilidad de ratón con NetMHCII.

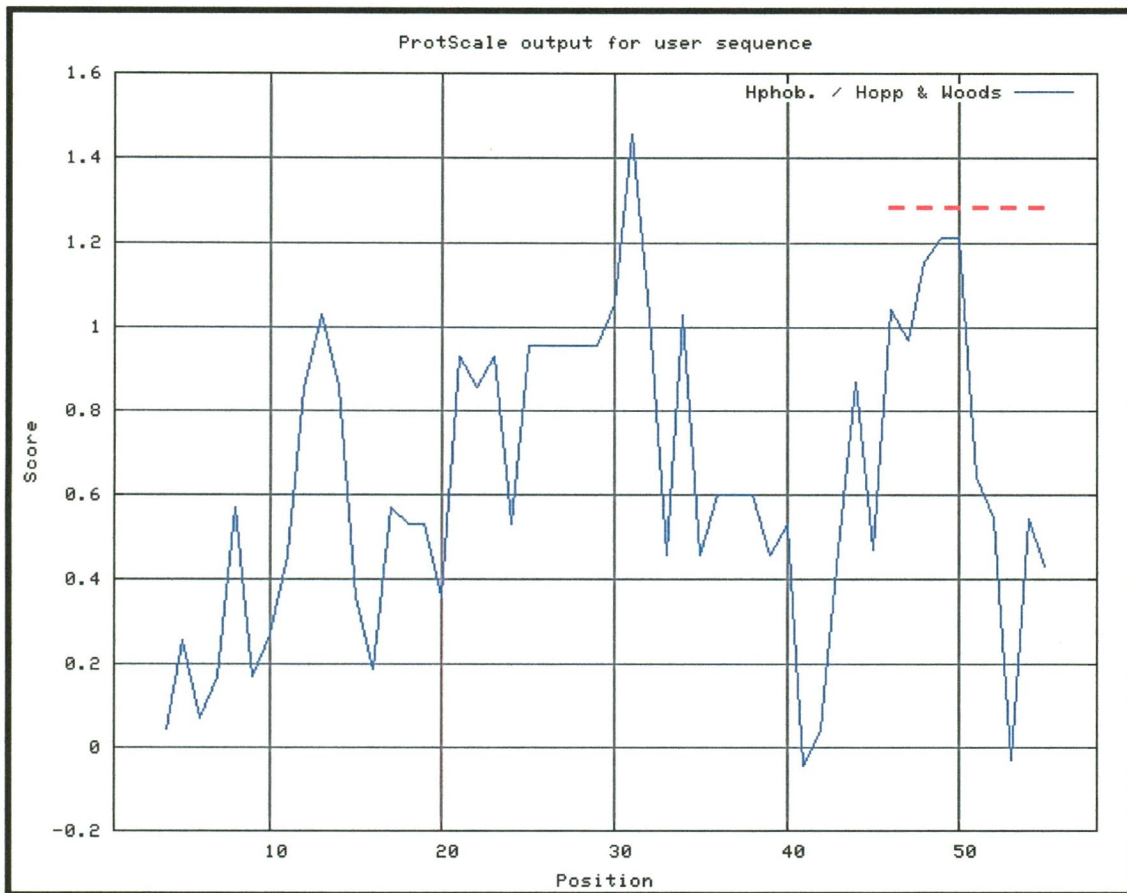


Figura 27. Análisis de hidrofobicidad en la escala Hopp & Woods

La secuencia de la MT-like del aislado HGMN01 fue analizada en la escala de hidrofobicidad de Hopp & Woods, aminoácidos con valores mayores a cero son hidrofílicos y por consiguiente probables de estar expuestos en la superficie de una proteína en su conformación nativa. La porción correspondiente al péptido sintético se encuentra marcada con línea punteada roja.

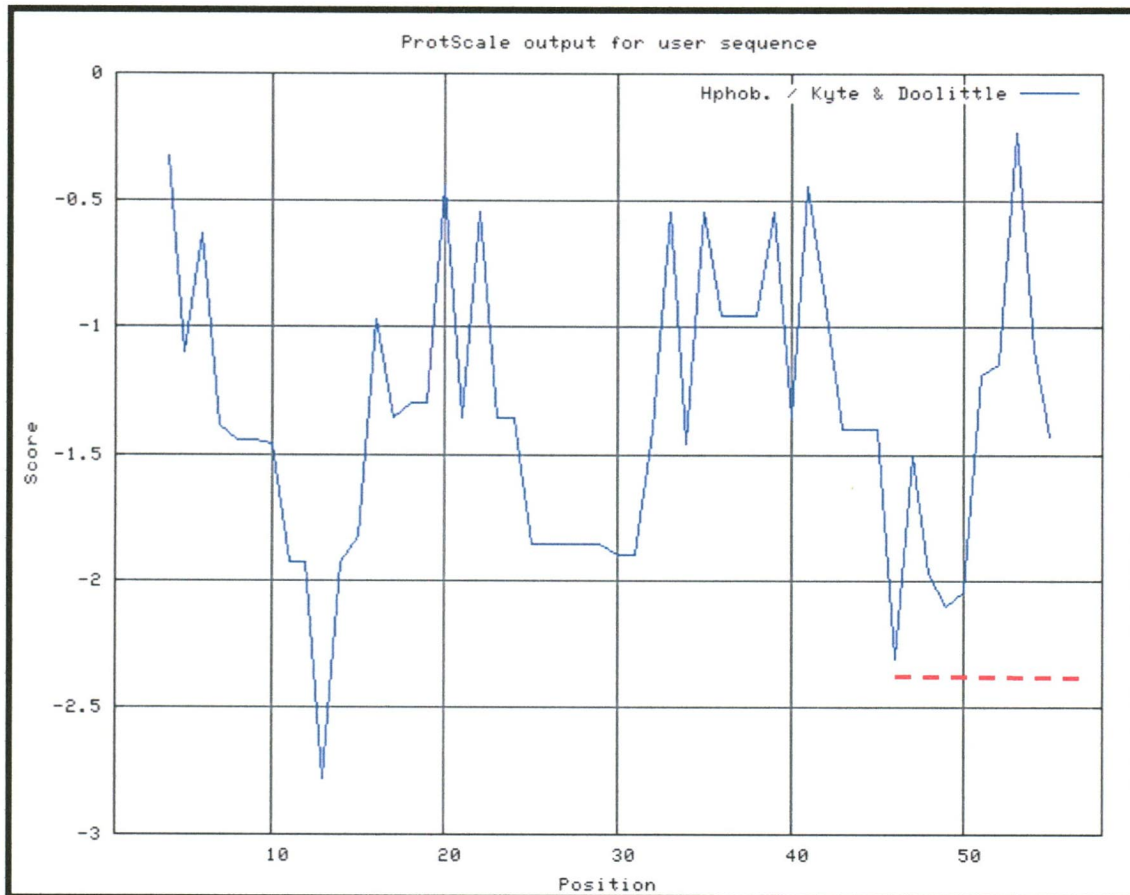


Figura 28. Análisis de hidrofobicidad en la escala Kyte & Doolittle

La secuencia de la MT-like del aislado HGMN01 fue analizada en la escala de Kyte & Doolittle, aminoácidos con valores mayores a cero indica que son hidrofóbicos y los menores a cero hidrofílicos. Con línea punteada roja se encuentra señalada la secuencia correspondiente al péptido sintético.

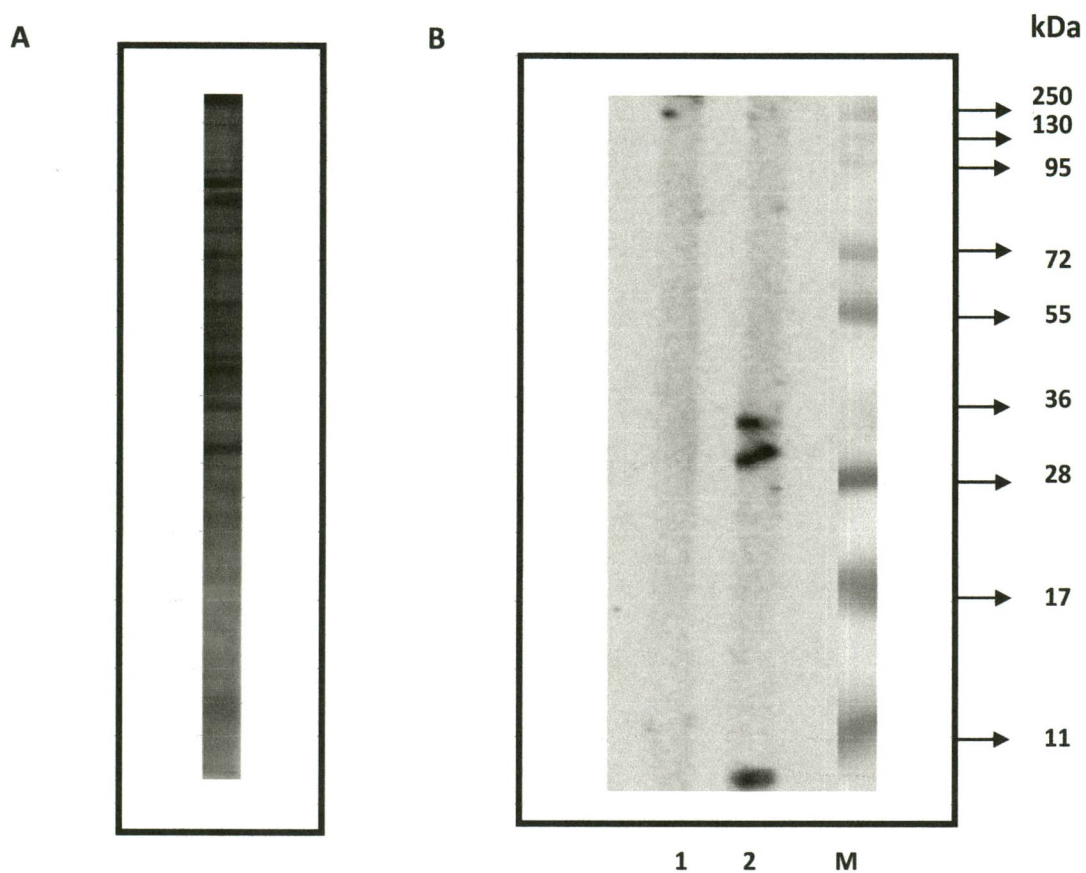


Figura 29 Ensayo de western blot

Panel A. SDS-PAGE al 12 % correspondiente a los extractos totales de proteínas de *T. vaginalis*. Panel B. Ensayo de western blot en membrana de nitrocelulosa con extractos totales de proteínas de *T. vaginalis*, revelado por quimioluminiscencia. Carriles: 1) Incubado con el suero preinmune; 2) Incubado con el anticuerpo anti-TvMT (dilución 1:500); 3) Marcador de peso molecular.

IX. DISCUSIÓN

Todos los metales, especialmente los no esenciales, tienen efectos tóxicos sobre los seres vivos. Por esta razón la célula presenta una serie de mecanismos de detoxificación y homeostasis en la concentración de estos iones metálicos. Uno de estos mecanismos sería la quelación del ion metálico esencial en exceso o de aquellos que son altamente tóxicos, como el cadmio. La existencia de biomoléculas quelantes como las metalotioneínas son una forma eficiente de resguardar a la célula del daño ocasionado por estos iones.

Con base en los análisis *in silico* realizados encontramos que *T. vaginalis* cepa G3 tiene un gen codificante de metalotioneína-like, identificado con el número de acceso TVAG_220940. Algo característico de estas proteínas es la diversidad de isoformas que pueden existir, las MTs de humanos presentan el polimorfismo genético más complejo, se ha descrito la existencia de al menos 12 genes que dan origen a diferentes isoformas, algunas de ellas características de algún tejido en particular [4]. Sin embargo este polimorfismo no sólo es aplicable para seres humanos; diversos estudios realizados en el protozooario ciliado *Tetrahymena*, revelan que aunque existe homología entre secuencias éstas pueden diferir en su tamaño en la misma especie y con otras especies del mismo género. Por ejemplo, *T. rostrata* presenta dos isoformas de MTs, el ORF de MT1 es de 342 pb que corresponden a una proteína de 113 a.a. (11.5 kDa); ORF de MT2: 237 pb y una proteína de 78 a.a. (8.2 kDa). Otra especie de este género es *T. thermopila*, la cual presenta 5 isoformas de MTs, la MT1 es una proteína de 162 a.a. (16.757 kDa) y la MT2 de 108 a.a. (11.200 kDa) [18].

Al parecer el tamaños de las MTs no es un determinante para que lleven a cabo su función, la metalotioneína del patógeno fúngico *Magnaporthe grisea*, agente causal de la piricularia en plantas de arroz, tiene tan sólo 22 aminoácidos y una masa de 2.112 kDa [34].

Teniendo en consideración que no sólo en los mamíferos existen diversas isoformas de esta proteína se puede plantear la existencia de otras isoformas en *T. vaginalis*. Los análisis *in silico* mostraron otros tres posibles genes codificantes de MTs en el genoma de *T. vaginalis*, lo cual es coincidente con lo previamente reportado para estas proteínas dada su diversidad de isoformas.

Al hacer una búsqueda de dominios conservados en el CDD de NCBI usando como sonda la secuencia de la MT-like del aislado HGMMN01, se despliega como resultado la superfamilia de las metalotioneínas. En términos biológicos el dominio de una proteína hace referencia a una región que define su estructura o función, sin embargo las metalotioneínas son proteínas desordenadas por lo que la repetida aparición de cisteínas en las secuencias obtenidas del CDD son un indicio de su función como quelantes biológicos.

Como se mencionó previamente las MTs son proteínas desordenadas, característica que quedó evidenciada por los análisis de desorden intrínseco. Todas las secuencias de MTs mostraron un grado de desorden en los extremos amino y carboxilo. Las proteínas desordenadas poseen una elevada flexibilidad estructural y, por tanto, reconocen diversos ligandos conservando la especificidad en el reconocimiento de los mismos [38]. Está reportado que las metalotioneínas son moléculas versátiles, capaces de unir diversos iones metálicos cuyo tamaño del átomo es distinto, por ejemplo la MT de delfín puede unir un total de siete átomos de zinc (Zn_7MT) y si son átomos de cobre puede unir once ($Cu_{11}MT$). La tioneína (apoenzima) no presenta una estructura secundaria definida y adopta su estructura tridimensional después de unirse al ion metálico, estas estructuras han sido descritas como agrupamientos de sulfhidrilos tri o tetranucleares unidos con el ion metálico divalente, estos complejos están caracterizados por una alta estabilidad termodinámica, mientras que los iones metálicos en el agrupamiento de sulfhidrilos se encuentran en un estado dinámico con una redistribución continua de los iones metálicos dentro de la MT, favorecido por la no rigidez de estas proteínas [28]. En las metalotioneínas generalmente el agrupamiento de

sulfhidrilos más cercano al extremo amino es capaz de coordinar 3 átomos metálicos mientras que el más cercano al extremo carboxilo une 4 átomos. Cada uno de estos agrupamientos se encuentra localizado en un dominio globular denominado dominio β y α respectivamente [27]. Cada dominio está totalmente separado del otro y se unen entre sí por un bucle flexible; de acuerdo con los análisis de desorden intrínseco estos extremos son los que mayor grado de desorden presentan, siendo coincidente con lo reportado de que es en estos sitios en donde se presenta la mayor actividad de unión a iones metálicos; la parte media de las MTs analizadas son las zonas que presentan menor tendencia al desorden y deben corresponder por lo tanto al sitio que forma el bucle flexible encargado de separar los dominios β y α , y que se encuentra en un menor grado encargado de la unión a iones metálicos.

En el análisis filogenético se incluyó la secuencia de la MT-like de *T. vaginalis* y a las otras tres posibles isoformas de esta proteína. Las MTs-like de *T. vaginalis* se agruparon dentro de un clado, por lo cual podemos sugerir que estas proteínas aunque codificadas por diferentes genes podrían estar participando en la misma función celular.

Para la amplificación del gen *tvmt* se diseñaron iniciadores que permitieran la obtención del fragmento completo (267 pb), sin embargo se obtuvo como resultado un fragmento de menor tamaño y otro completo pero con la secuencia invertida, por lo que es probable que en el proceso de amplificación del gen se generaran estructuras secundarias, homodímeros o heterodímeros que dieron como resultado estos amplicones y que no pudieron ser evidenciados en los análisis *in silico* realizados para estos iniciadores.

El análisis de expresión de genes codificantes para MTs en células S2 de *Drosophila* mostró que el cambio de un solo nucleótido en la secuencia consenso de elementos de respuesta a metal (MRE) en la expresión del gen *MtnA* es dependiente del tipo de ion metálico, por lo que muchos de estos mecanismos de

regulación ocurren a nivel de la transcripción y que la proteína mayoritariamente responsable es el factor de transcripción de respuesta a metal (MTF-1), el cual se une bajo diferentes situaciones de estrés y exposición a metales. A través de análisis con inmunoprecipitación de la cromatina, microarreglos, alineamientos y consulta en base de datos, se pudo determinar que la secuencia consenso TGCRNC (donde R es G o A y N es cualquier nucleótido de DNA) del MRE puede tener variantes de un solo nucleótido y esta variante determina la especificidad de respuesta al ion metálico al que se haya expuesto, así ante una exposición a cobre el MRE fue TGCACAC y para el cadmio fue TGCACCC, por lo que MTF-1 se une a regiones que pueden variar en un nucleótido con respecto a la secuencia MRE consenso dependiendo del metal al que se fue expuesto [39].

En el análisis de expresión realizado en este trabajo para el gen *tvm*t del aislado HGMN01 se observó que el mayor incremento lo indujo el cadmio, siendo hasta 6.2 veces mayor con respecto a la condición control; Hillel y cols., en el 2012 demostraron que los niveles de inducción entre cobre y cadmio, correspondían a una secuencia preferencial en los MREs y que la variación de un solo nucleótido en la secuencia consenso del MRE tiene una función clave en la especificidad del ion metálico y los genes regulados por MTF-1. Con base en estos hallazgos se puede sugerir un comportamiento similar para el gen *tvm*t del aislado HGMN01 en el cual variantes en la secuencia de respuesta de unión a metal sean preferenciales para cadmio y pueda facilitar la unión de coactivadores que permitan el inicio y aumento en la tasa de la transcripción para este gen. Otra propuesta a este incremento en la expresión por cadmio es que las metalotioneínas ya expresadas que hayan quelado iones de zinc, lo liberarán, ahora se unirá el cadmio en lugar del zinc quedando éste último disponible para ser captado por los dedos de zinc de MTF-1, el cual interaccionará con los elementos de respuesta a metal en el DNA, para efectuar la transcripción de los genes blanco a través de proteínas adaptadoras [31]. Como se había mencionado anteriormente, puede existir una secuencia preferencial para la unión de coactivadores y proteínas adaptadoras al DNA y de esta forma se inicie la

transcripción del gen de la metalotioneína, sin embargo los promotores de los genes de las MTs tienen muchos elementos de respuesta que sobre-regulan la transcripción y no sólo aquellos por metales, también cuenta con elementos ARE (elementos de respuesta antioxidante) y que son activados en respuesta del estado redox de la célula. Aún aquellos metales que son esenciales para la célula (como hierro, zinc y manganeso), en exceso pueden generar radicales libres; por ejemplo, en células J774 que fueron expuestas a 100 μ M de zinc durante 12 y 24 h resultó en una substancial sobre-regulación de MTs y un incremento en la resistencia a estrés oxidativo que ocasionaba muerte celular por apoptosis [32]. Por lo que no se pueden descartar otros mecanismos de activación en la expresión de MTs, como la vía ARE/USF observada para el cadmio y otros metales, a través de estrés oxidativo secundario [27].

En la inmunodetección anticuerpos anti-TvMT reconocieron a una metalotioneína-like con un peso aproximado de 9.6 kDa, lo que es coincidente con la anotada en *T. vaginalis* cepa G3. Otras proteínas reconocidas por estos anticuerpos fueron una de aproximadamente 35 kDa y otra de 32.6 kDa, siendo esta última coincidente con nuestra predicción *in silico* para las posibles isoformas de MTs-like en *T. vaginalis*, sin embargo esto requiere una mayor caracterización para poder determinar si exhiben un comportamiento similar al de la metalotioneína-like analizada en esta investigación.

X. CONCLUSIONES

1. *T. vaginalis* posee un gen codificante para metalotioneína-like (*tvmt*) que se encuentra identificado con el nombre TVAG_220940 en el genoma. Existen otras secuencias de genes (TVAG_485930, 18240 y 486210) que codifican para proteínas relacionadas con la metalotioneína-like de *T. vaginalis* (TvMT) con una identidad de al menos 75%.
2. TvMT posee dominios pertenecientes a la superfamilia de las metalotioneínas.
3. El análisis de desorden intrínseco muestra que TvMT del aislado HGMMN01 sigue una tendencia de desorden en sus extremos terminales, comportamiento similar al de metalotioneínas de mamíferos.
4. La inducción de la expresión del gen *tvmt* del aislado HGMMN01 es producida por cationes divalentes, principalmente cadmio, coincidente con lo previamente reportado para genes que codifican estas proteínas.
5. La tendencia de inducción de la expresión del gen *tvmt* con los cationes divalentes empleados en este trabajo fue la siguiente:
$$\text{Cd}^{2+} [0.1\text{mM}] > \text{Fe}^{2+} [1.6\text{mM}] > \text{Zn}^{2+} [1.6\text{mM}] > \text{Fe}^{2+} [0.25\text{mM}] > \text{Mn}^{2+} [0.25\text{mM}]$$
6. *T. vaginalis* posee una metalotioneína-like que es inmunoreconocida por anticuerpos anti-TvMT, con un peso de 9.6 kDa.

Conclusión

Podemos decir que *T. vaginalis* posee un gen (*tvmt*) que codifica para una metalotioneína-like (TvMT) de 9.6 kDa. TvMT tiene un alto contenido de cisteínas (27%), es una proteína desordenada lo cual es apreciable en sus extremos amino y carboxilo. Por otra parte, la expresión del gen *tvmt* es inducida por cationes divalentes (Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} y Mn^{2+}), coincidente con lo reportado para genes que codifican estas proteínas.

XI. PERSPECTIVAS

- Clonar y expresar el gen *tvm*t de *Trichomonas vaginalis*
- Inmunolocalizar a la metalotioneína-like (TvMT) de *T. vaginalis*
- Identificar las posibles isoformas de TvMT
- Determinar la participación de TvMT en el establecimiento de la tricomoniasis

XII. BIBLIOGRAFÍA

1. Hirt R. 2013. *Trichomonas vaginalis* virulence factors: an integrative overview. Faculty of Medical Sciences, Institute for Cell and Molecular Biosciences, New Castle University. 89: 439-443
2. Petrin D, Delgaty K, Bhatt R, y Garber G. 1998. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Reviews*, American Society for Microbiology. 11: 300-317
3. Figueroa E, Rendón F, Puente J, Calla J, Cárdenas R, Ortega J, Quintas L.I, Álvarez M.E, y Arroyo R. 2012. The effects of environmental factors on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. *ELSEVIER, Microbes and Infection*. 14: 1411-1427
4. Brambila E, y Lozano P. 1999. Metalotioneínas, bioquímica y funciones propuestas. BEP, Universidad Autónoma de Puebla, Instituto de Ciencias. 18: 21-27
5. Lachke S, Srikantha T, Tsai L, Daniels K, y Soll D. 2000. Phenotypic switching in *Candida glabrata* involves phase-specific regulation of the metallothionein gene MT-II and the newly discovered hemolysin gene HLP. *Infection and Immunity, American Society for Microbiology*. 68: 884-895
6. Diaz S, Amaro F, Rico D, Campos V, Benítez L, Martín A, Hamilton E, Orias E, y Gutiérrez J. 2007. *Tetrahymena* metallothioneins fall into two discrete subfamilies. *Plos One*. 3: 1-14

7. Asselman J, Glaholt S .P, Smith Z, Smagghe G, Jansen C.R, Colbourne J.K, Shaw J.R, y De Schamphelaere K.A.C. 2012. Functional characterization of four metallothionein genes in *Daphnia pulex* exposed to environmental stressors. NIH Public Acces. 0: 54-65
8. Schwartz J.A, Olarte K.T, Michalek J.L, Jandu G.S, Michel S y Bruno B.M. 2013. Regulation of copper toxicity by *Candida albicans* GPA2. Journals ASM. Eukaryotic Cell. 12: 954-961
9. Schwebke J, y Burgess D. 2004. Trichomoniasis. Clinical Microbiology Reviews. American Society for Microbiology. 17: 794-803
10. Sutcliffe S, Alderete J.F, Till C, Goodman P.J, Hsing A.W, Zenilman J.M, De Marzo A.M, y Platz E.A. 2009. Trichomonosis and subsequent risk of prostate cancer in the prostate cancer prevention trial. NIH Public Acces. 9: 2082-2087
11. OMS. Tricomoniasis. Disponible en:
http://apps.who.int/rhl/rti_sti/gscorm/es/index.html
12. Información Epidemiológica de Morbilidad, Anuario 2011, versión ejecutiva. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Disponible en:
www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/publicaciones/2012/ver_ejecutiva_2011.pdf
13. Información Epidemiológica de Morbilidad, Anuario Ejecutivo 2012. Dirección General de Epidemiología. Disponible en:
www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/boletin/intd_boletin.html

14. Boletín Epidemiológico, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Sistema Único de Información, 2015. Disponible en:
www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/boletin/intd_boletin.html
15. Campo N, Horváthová L, Jedelský P.L, Sedinová M, Rada P, Marcinciková M, Hrdý I, y Tachezy J. 2013. Iron-induced changes in the proteome of *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes. PLOS ONE. 8: 1-9
16. Yong-Seok K, Song H.O, Choi I.H, Park S.J, y Ryu J.S. 2006. Hydrogenosomal activity of *Trichomonas vaginalis* cultivated under different iron conditions. Korean Journal of Parasitology. 44: 373-378
17. Krieger J.N, y Rein M.F. 1982. Canine prostatic secretions kill *Trichomonas vaginalis*. Infection and Immunity. 37: 77-81
18. Amaro, F. 2010. La familia de las metalotioneínas en *Tetrahymena* y su aplicación en el desarrollo de biosensores celulares para la detección de metales pesados. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Biológicas. 1: 1-22
19. Foster A.W, Osman D, y Robbinson N.J. 2014. Metal preferences and metallation. Journal of Biological Chemistry. 289: 28095-28103
20. Mendiola J, Moreno J.M, Roca M, Vergara N, Martínez M.J, García A, Rendueles B.E, Moreno S, López J, Ten J, Bernabeu R, y Torres A.M. 2011. Relationships between heavy metal concentrations in three different body fluids and male reproductive parameters: a pilot study. Environmental Health, BioMed Central. 10: 1-7

21. Telisman S, Cvitkovic P, Jurasovic J, Pizent A, Gavella M, y Rocic B. 2000. Semen quality and reproductive endocrine function in relation to biomarkers of lead, cadmium, zinc, and copper in man. *Environmental Health Perspectives*. 108: 45-53
22. Siu E.R, Mruk D, Porto C.S, y Cheng C.Y. 2009. Cadmium-induced testicular injury. *NHI Public Acces*. 238: 240-249
23. Meeker J, Rossano M.G, Protas B, Diamond M.P, Puscheck E, Daly D, Paneth N, y Wirth J.J. 2008. Cadmium, lead, and other metals in relation to semen quality: Human evidence for molybdenum as a male reproductive toxicant. *Environmental Health Perspectives, University of Michigan School of Public Health USA*. 116: 1473-1479
24. Abdul, O.F. 2010. Association between seminal plasma copper and magnesium levels with oxidative stress in Iraqi infertile Men. *Oman Medical Journal*. 25: 168-172
25. Schmid T, Grand P.G, Marchetti F, Weldon R.H, Eskenazi B, y Wyrobek A.J. 2012. Elemental composition of human semen is associated with motility and genomic sperm defects among older man. *Human Reproduction, Reproductive Genetics*. 28: 274-282
26. García-Rico L, Roble M, y Valenzuel E.M. 1999. Las metalotioneínas y su relación con la toxicidad del cadmio en los mamíferos. *Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Hermosillo, Sonora, México*. 15: 113-120

27. Carrasco, J. 2000. Regulación de las metalotioneínas durante el estrés y la inflamación, y su influencia durante la respuesta inflamatoria. Universitat Autònoma de Barcelona, Facultat de ciències, Departament de Biologia Celular, Fisiologia e Immunologia. 1: 1-13
28. Isani G, y Carpené E. 2014. Metallothioneins, unconventional proteins from unconventional animals: A long journey from nematodes to mammals. *Journal Biomolecules*. 4: 435-457
29. Ruttkay-Nedecky B, Nejdli L, Gumulec J, Zitka O, Masarik M, Eckschlager T, Stiborova M, Adam V, y Kizek R. 2013. The role metallothionein in oxidative stress. *International Journal Molecular Sciences*. 14: 6044-6066
30. Stoytcheva Z.R, Vladimirov V, Douet V, Stoychev I, y Berry M.J. 2010. Metal transcription factor-1 regulation via MREs in the transcribed regions of selenoprotein H and other metal-responsive genes. *NIH Public Acces*. 1800: 416-424
31. Waldron K, Rutherford J.C, Ford D, y Robinson N.J. 2009. Metalloproteins and metal sensing. *Cell and Molecular Biosciences, Medical School, Newcastle University*. 460: 823-830
32. Baird, S.K, Kurz T, Brunk U.T. 2006. Metallothionein protects against oxidative stress-induced lysosomal destabilization. *Journal Biochemical, Biochemical Society, University of Newcastle*. 394: 275-283
33. Gold B, Deng H, Bryk R, Vargas D, Eliezer D, Roberts J, Jiang X, y Nathan C. 2008. Identification of a copper-binding metallothionein in pathogenic *Mycobacteria*. *NIH Public Acces*. 4: 609-616

34. Tucker S.L , Thorton C.R, Tasker K, Jacob C, Giles G, Egan M, y Talbot N.J. 2004. A fungal metallothionein required for pathogenicity of *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell*, American Society of Plant Biologists. 16: 1575-1588
35. Ding C, Festa R.A, Chen Y.L, Espart A, Palacios O, Espin J, Capdevila M, Atrian S, Heitman J, y Thiele D.J. 2013. *Cryptococcus neoformans* copper detoxification machinery is critical for fungal virulence. *NIH Public Acces*. 3: 265-276
36. Benoff, S. 2000. Male infertility and environmental exposure to lead and cadmium. *Human Reproduction Update*, European Society of Human Reproduction and Embryology.
37. Fidel P.L, Vazquez J, y Sobel J.D. 1999. *Candida glabrata*: Review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. 12: 80-96
38. Cuevas-Velázquez, C.L. 2011. Las proteínas desordenadas y su función: Una nueva forma de ver la estructura de las proteínas y la respuesta de las plantas al estrés. *Revista Especializada en Ciencias Químico Biológicas*. Redalyc.org. 14: 97-105
39. Hillel I.S, Chirn G.W, y Marr M.T. 2012. Single nucleotide in the MTF-1 binding site can determine metal-specific transcription activation. Department of Biology, Brandeis University. *PNAS*. 109: 16516-16521

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 26 de enero del 2016, en la Ciudad de México D.F. para optar al Grado de Maestro en Ciencias Genómicas, al Q.F.B. Jorge Antonio Moreno Reyes

Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez

Dra. Minerva Camacho Nuez

Dra. Claudia Selene Zárate Guerra

Dra. Rosalía Lira Carmona





Av. Instituto Politécnico Nacional 1891
Col. Lindavista Gustavo A. Madero D.F.
Tel. 5754-3924
Nextel 1089-0507



Hda. Zotoluca No. 9 Local B
estamos sobre AV. RANCHO SECO
Col. Impulsora Edo. de México
Tel. 5712-0055 6285-6819
Nextel 1089-0506

