

Identificación de RAD51 en *Trichomonas vaginalis* en presencia de Zn²⁺ y Cd²⁺.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS

P R E S E N T A:

SHARON ITZEL SOSA MONDRAGON

DIRECTORA

Dra. María Elizbeth Álvarez Sánchez

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.

INTEGRACIÓN DEL JURADO

PRESIDENTA: Dra. Minerva Camacho Nuez, UACM.

SECRETARIA: Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez, UACM.

VOCAL: Dr. Rodrigo Arreola Alemón, Instituto Nacional de Psiquiatría.

1^{er.} suplente: Dr. Mario César López Camarillo, UACM.

2^{do.} suplente: Dr. Jonathan Puente Rivera, UNAM.

Plantel de adscripción:

PLANTEL DEL VALLE, UACM.

DIRECTORA

Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez

Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

***“Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto, y
pensar lo que nadie más ha pensado”***

Albert Szent-Györgi

AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, por permitirme culminar una etapa más de mi vida y por bendecirme con mucho más de lo que merezco.

A la **Universidad Autónoma de la Ciudad de México** y al **Posgrado en Ciencias Genómicas**, por la oportunidad de hacer posible mi superación profesional.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por el apoyo económico recibido para la realización de mis estudios de Maestría, con beca número 962915.

A la **Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez** por permitirme formar parte de su grupo de trabajo y por todas sus enseñanzas.

A mis asesores de tesis: la **Dra. Mar Sarai Hernández García**, la **Dra. Minerva Camacho Nuez**, el **Dr. Máximo Martínez Benítez** y el **Dr. Jonathan Puente Rivera** por orientarme y compartirme sus conocimientos.

Al **Dr. Rodrigo Arreola Alemón**, por orientarme en los análisis bioinformáticos realizados en este trabajo.

A todos los **Drs. del posgrado**, por contribuir en mi formación como Maestra en Ciencias Genómicas.

A la **M. en Ciencias Genómicas Laura Vázquez Carrillo** por facilitarme el material necesario para los experimentos.

A mis compañeros y amigos del posgrado: **Víctor Saúl, Víctor Hugo y Yecenia**, por apoyarme en cuestiones experimentales y brindarme su amistad. A **Rogelio, Antonio, Enrique, José, Iván, Darío, Brisa, Ameyatzin, Karla, Vianey, Fabricio y Fernando**, por su amistad y hacer más amena mi estancia en el posgrado.

A mis amigos de natación: **Elizabeth, Óscar Rojas, Luis Ángel, Sergio e Iván**, por hacerme olvidar un poquito el estrés del posgrado en aquellas tardes estando en el agua y en las cenas post-training.

A mi amigo y colega **Andrés Uriostegui García**, por su amistad y apoyo incondicional.

Al **Ing. Fernando Soria**, por apoyarme personal y profesionalmente durante esta etapa de mi vida y porque sé que lo seguirá haciendo.

De manera especial a mis padres **Victoria y Samuel**, por su apoyo incondicional y ser mi ejemplo de superación profesional. A mi hermano **Víctor** y a mi abuelita **Teresa** por cuidarme, apoyarme y compartir conmigo los días y noches de estrés y desvelo durante la maestría.

A mis sobrinos: **Natalia, Frida y Ángel**, porque con solo su presencia logran desconectarme del mundo y por darme fuerzas cuando sentía rendirme.

A mis **tíos y primos**, principalmente: **Emilio, Alma, Nadia y Aby**, por su cariño incondicional y por creer en mí.

Esta tesis está hecha de pedacitos de todos ustedes.

Por lo que ha sido y será... ¡GRACIAS!

DEDICATORIA

A mi tío **Lalito**, por ser mi motivo y mi más grande inspiración para elegir el mundo de la ciencia como mi vida, por guiarme y cuidarme desde el cielo.

A mis padres **Victoria** y **Samuel**, porque sus palabras han guiado mi camino y su amor ilumina mi vida.

A mi hermano **Víctor**, por estar siempre a mi lado y por ser mi motivo para seguir superándome porque sé que sigues mis pasos.

A mi abuelita **Teresa**, por ser mi mejor ejemplo de fortaleza, de amor y de apoyo incondicional.

A ustedes les dedico este y todos los logros que llegue a obtener en mi vida profesional.

LOS AMO

Sharon

ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN	14
1.1 Tricomoniasis	14
1.2 Epidemiología	15
1.3 Morfología	15
1.4 Ciclo biológico	17
1.5 Características génicas de <i>T. vaginalis</i>	18
1.6 Metabolismo.....	18
1.7 Propiedades de virulencia.....	19
1.7.1 Mecanismos dependientes de contacto	20
1.7.2 Mecanismos independientes de contacto	21
1.8 Función biológica de los metales.....	24
1.8.1 El Zn ²⁺ en la célula.....	25
1.9 Daño al DNA por metales en células de mamíferos	25
1.10 Recombinación homóloga	26
2. ANTECEDENTES PARTICULARES	29
2.1 Regulación génica en <i>T. vaginalis</i>	29
2.2 Iones metálicos en el tracto urogenital masculino.....	32
2.2.1 Presencia de Zn ²⁺ en el fluido prostático.....	33
2.2.2 Presencia de Cd ²⁺ en el fluido prostático.....	33
2.3 Factores de virulencia de <i>T. vaginalis</i> regulados por Zn ²⁺	34
2.4 Factores de virulencia de <i>T. vaginalis</i> regulados por Cd ²⁺	36
2.5 Daño al DNA por Zn ²⁺ y Cd ²⁺	37
2.7 Diferencias funcionales entre RAD51 y RECA.....	40
2.8 RAD51 en parásitos.....	41
3. JUSTIFICACIÓN.....	43
4. HIPÓTESIS.....	43
5. OBJETIVOS.....	44
GENERAL.....	44
PARTICULARES.....	44
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	45

7. MATERIALES Y MÉTODOS	46
7.1 Análisis <i>in-silico</i>	46
7.2 Análisis de expresión del gen <i>tvrad51</i>	48
7.2.1 Cultivo de <i>T. vaginalis</i> en presencia de cationes metálicos	48
7.2.2 Extracción de DNA genómico	49
7.2.3 Exposición de parásitos a luz UV-C	49
7.2.4 Extracción de RNA total de <i>T. vaginalis</i> en condiciones normales, bajo tratamiento con luz UV-C y presencia de cationes Zn²⁺ o Cd²⁺	50
7.2.5 Síntesis de cDNA	50
7.2.6 Amplificación por PCR semicuantitativa	51
7.3 Identificación de TvRAD51 en <i>T. vaginalis</i>	52
7.3.1 Extracción de proteínas totales del aislado HGMN01 de <i>T. vaginalis</i> en condiciones normales, bajo tratamiento con luz UV-C y presencia de cationes Zn²⁺ o Cd²⁺ por precipitación con ácido tricloroacético (TCA al 10%)	52
8. RESULTADOS	54
8.1 Análisis <i>in-silico</i>	54
8.2 Análisis de expresión del gen <i>tvrad51</i> en el aislado HGMN01 de <i>T. vaginalis</i>	86
8.3 Inmunodetección de TvRAD51 en el aislado HGMN01 de <i>T. vaginalis</i>	89
9. DISCUSIÓN	94
10. CONCLUSIONES	107
11. PERSPECTIVAS	108
12. REFERENCIAS	109

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de <i>T. vaginalis</i>	16
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Trichomonas vaginalis</i>	17
Figura 3. Mecanismo de recombinación homóloga en eucariontes (tomado de Rivera-Martínez, 2007)	28
Figura 4. Localización genómica del gen <i>tvrads51</i> , el pseudogen <i>tvrads51-1</i> y el gen <i>tvdmc1</i>	60
Figura 5. Alineamiento de la secuencia del gen <i>tvrads51</i> y el pseudogen <i>tvrads51-1</i>	61
Figura 6. Representación esquemática de las proteínas TvRAD51 codificadas por el gen <i>tvrads51</i> y el pseudogen <i>tvrads51-1</i>	62
Figura 7. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de RAD51 en parásitos protozoarios, <i>S. cerevisiae</i> y <i>H. Sapiens</i>	64
Figura 8. Representación esquemática de la proteína RAD51 de <i>T. vaginalis</i> , <i>H. sapiens</i> , <i>S. cerevisiae</i> y otros parásitos protozoarios.....	66
Figura 9. Modelado por homología de la estructura tridimensional de la proteína TvRAD51	68
Figura 10. Modelado por homología de la estructura tridimensional de la proteína TvRAD54 y TvDMC1	69
Figura 11. Gráficos de Ramachandran	70
Figura 12. Comparación de la estructura tridimensional de las proteínas RAD51 de <i>H. sapiens</i> , <i>S. cerevisiae</i> y <i>T. vaginalis</i>	72
Figura 13. Evaluación de los modelos de TvRAD54 y TvDMC1 obtenidos por homología.....	73
Figura 14. Motivos funcionales en la estructura de la proteína TvRAD51 modelada con Swiss-Model	75
Figura 15. Motivos de polimerización en la estructura de la proteína TvRAD51 modelada con Swiss-Model.....	76
Figura 16. Sitio putativo de unión de TvRAD51 a DNA.....	77
Figura 17. Estructura del complejo presináptico de recombinación homóloga en <i>H. sapiens</i>	78

Figura 18. Filamento putativo de tres monómeros de TvRAD51	79
Figura 19. Sobreposición del filamento de tres monómeros de TvRAD51 en la estructura del complejo presináptico de recombinación homóloga en <i>H. sapiens</i>	80
Figura 20. Red de interacción putativa del grupo epistático RAD52 en <i>T. vaginalis</i>	82
Figura 21. Docking molecular de TvRAD51 con TvRAD54.....	83
Figura 22. Docking molecular de TvRAD51 con TvDMC1	84
Figura 23. Propuesta de la maquinaria de reparación de DSB mediante recombinación homóloga en <i>T. vaginalis</i>	85
Figura 24. DNA genómico y RNA total del aislado HGMN01 de <i>T. vaginalis</i>	87
Figura 25. Expresión del gen <i>tvrad51</i> y β - <i>tubulina</i> del aislado HGMN01 de <i>T. vaginalis</i> en condiciones normales, bajo tratamiento con luz UV-C y presencia de cationes.....	88
Figura 26. Extracto de proteínas totales del aislado HGMN01 de <i>T. vaginalis</i>	90
Figura 27. Expresión de TvRAD51.	91
Figura 28. Comparación de las recombinasas TvRAD51 y TvDMC1 de <i>T. vaginalis</i>	92
Figura 29. Complejos presinápticos putativos de recombinación homóloga en <i>T. vaginalis</i>	93

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Concentraciones de iones metálicos en el plasma seminal de hombres sanos	32
Tabla 2. Proteínas ortólogas a HsRAD51 de <i>H. sapiens</i> en parásitos protozoarios.....	63
Tabla 3. Valoración de los modelos de TvRAD51, TvRAD54 y TvDMC1 obtenidos por homología.....	74
Tabla 4. Predicciones de Docking. Valores de Delta G (DG) y Fullfitness (FFN) de las 20 mejores predicciones	77
Tabla 5. Proteínas putativas involucradas en la maquinaria de recombinación homóloga <i>Trichomonas vaginalis</i> identificadas a partir de ortólogos.....	81

ABREVIATURAS

°C	grados Celsius
μM	micro Molar
Ac	anticuerpo
ATP	Trifosfato de adenosina
BM	amortiguador de muestra
CBB	tinción con azul de Coomassie
cDNA	DNA complementario
DEPC	Dietil pirocarbonato
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
h	horas
HRP	peroxidasa de rábano
kDa	kilo Daltones
min	minutos
ml	mililitros
mM	milimolar
nm	nanómetros
PBS	amortiguador salino de fosfatos
pH	potencial de Hidrógeno
RH	recombinación homóloga
RNA	Ácido Ribonucleico
rpm	revoluciones por minuto
SC	suero de caballo
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
TCA	Ácido tricloroacético
TYM	Triptona-Extracto de levadura-Maltosa
WB	Western Blot
cols	colaboradores
Mb	Megabase
RNAm	Ácido Ribonucleico mensajero
CP	Cisteína-Proteinasas
LPG	Lipofosfolucano

RESUMEN

La tricomoniasis es la infección de transmisión sexual causada por el parásito protozoario *Trichomonas vaginalis*. En el microambiente urogenital masculino se han identificado iones metálicos como el Zn^{2+} y el Cd^{2+} . Se sabe que la presencia de estos metales en concentraciones excesivas en el ambiente celular puede dar lugar a la generación de radicales libres, ocasionando estrés oxidativo en las células induciendo rupturas de DNA de doble cadena. *T. vaginalis* debe contar con mecanismos para reparar los daños en su material genético y permitirle mantener una infección crónica. El objetivo de este trabajo fue estudiar la expresión de la recombinasa RAD51 de *T. vaginalis* a nivel de RNAm y de proteína como respuesta a la reparación de daño del DNA mediante recombinación homóloga por la presencia de cationes tales como Zn^{2+} y Cd^{2+} . Los resultados del análisis bioinformático mostraron que este parásito contiene un gen que codifica a la TvRAD51 y otro que codifica para la recombinasa específica de meiosis TvDMC1. Además, existe la presencia de un pseudogen para TvRAD51 y un gen parálogo de TvDMC1. Los datos indicaron que la proteína TvRAD51 de *T. vaginalis* conserva motivos y dominios presentes en otras proteínas RAD51 de otros organismos, lo que sugiere que conserva propiedades y funciones bioquímicas similares. En el genoma de *T. vaginalis* se encontraron 11 genes que codifican para proteínas involucradas en la recombinación homóloga, de las cuales, 8 interaccionan con la recombinasa TvRAD51. Además, de manera interesante identificamos una mutación puntual en TvRAD51 que podría explicar el por qué no hay interacción de esta proteína con TvRAD54. Esto podría sugerir la participación de la recombinasa TvDMC1 en el mecanismo de recombinación homóloga de *T. vaginalis* al interaccionar directamente con la recombinasa TvRAD51. Los resultados bioinformáticos muestran que *T. vaginalis* podría contar con un mecanismo de RH híbrido (bacteriano y eukariota). Finalmente, los análisis experimentales mostraron que la presencia de cationes metálicos, como Zn^{2+} y Cd^{2+} , induce la sobreexpresión de TvRAD51 de *T. vaginalis* a nivel de RNAm y de proteína.

ABSTRACT

Trichomoniasis is the sexually transmitted infection caused by the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. Metals such as Zn^{2+} and Cd^{2+} have been identified in the male urogenital microenvironment. It is known that the presence of metals in excessive concentrations in the cellular environment can lead to the generation of free radicals, causing oxidative stress in cells, inducing double-stranded DNA breaks, so this parasite must have mechanisms to repair the damage in its genetic material and allow you to maintain a chronic infection. The objective of this work was to study the expression of the *T. vaginalis* RAD51 recombinase at the transcript and protein level in response to DNA damage repair by homologous recombination (HR) by the presence of cations such as Zn^{2+} and Cd^{2+} . The results of the bioinformatic analysis showed that this parasite contains one gene that codes for TvRAD51 and one that codes for the meiosis-specific recombinase TvDMC1. The TvRAD51 protein from *T. vaginalis* preserves motifs and domains present in other RAD51 proteins, suggesting that it retains similar biochemical properties and functions. In the genome of *T. vaginalis* we find 11 genes that code for proteins involved in HR, of which 8 interact with the TvRAD51 recombinase. We identified a point mutation in TvRAD51 that could be the cause of the non-interaction of this protein with TvRAD54 and to compensate for this deficiency, TvDMC1 recombinase could participate in the HR mechanism of *T. vaginalis*, interacting directly with TvRAD51 recombinase. The bioinformatic results show that *T. vaginalis* could have a hybrid HR mechanism (bacterial and *eukariota*). Finally, in the experimental analyzes, it is realized that the presence of metal cations, such as Zn^{2+} and Cd^{2+} , induces the overexpression of TvRAD51 of *T. vaginalis* at the transcript level and at the protein level.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Tricomoniasis

La tricomoniasis es una infección de transmisión sexual (ITS) causada por el parásito protozoario flagelado *Trichomonas vaginalis*. Su nombre se forma combinando los vocablos *Tricho* (pelo) y *-Monas* (movimiento) basándose en sus características morfológicas al microscopio (Barbier, 1979; Campbell, 2001), y *vaginalis* haciendo referencia a la localización anatómica de la que se aisló por primera vez (Thorburn, 1974). Siguiendo la taxonomía según Dyer (Dyer y cols., 1990), *T. vaginalis* se clasifica en: **Reino:** *Protista*, **Orden:** *Trichomonadida*, **Subreino:** **Protozoa**, **Familia:** *Trichomonadidae*, **Phylum:** *Zoomastigina*, **Género:** *Trichomonas*, **Clase:** *Parabasalia*, **Especie:** *vaginalis*.

Los síntomas de la tricomoniasis se desarrollan entre 4 y 30 días después de haber adquirido al parásito (Rein y Müller, 1990). Los signos y síntomas de esta parasitosis son más frecuentes en las mujeres, siendo los más comunes: prurito vulvar, ardor, irritación genital dolorosa, vaginitis, cervicitis, secreciones vaginales malolientes y dolor abdominal; también se pueden presentar complicaciones severas que incluyen: infertilidad o partos prematuros, bebés de bajo peso al nacer, *colpitis macularis* (cérvix de fresa) que consiste en lesiones puntiformes hemorrágicas en la mucosa del cérvix, además de que aumenta el riesgo de desarrollar cáncer cervical (Botero y Restrepo, 1992).

En los hombres la mayoría de las veces la infección es asintomática y pasa desapercibida, aunque en pocos casos puede causar uretritis, prostatitis, epididimitis, predisposición al cáncer de próstata e incluso afectar la motilidad y viabilidad de los espermatozoides (Dao, 1963). Además, tanto en hombres como en mujeres la infección está asociada a un incremento en el riesgo de infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) y Virus del Papiloma Humano (VPH) (Sutcliffe y cols., 2009).

1.2 Epidemiología

La incidencia de la tricomoniasis es de aproximadamente 156 millones de casos anuales, según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS: <https://www.who.int/bulletin/volumes/97/8/18-228486-ab/es/>). En el 2020 se presentaron 39,375 casos en toda la República Mexicana (DGEPI, semana 53 de 2020: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/605105/sem53.pdf>). Sin embargo, estas cifras podrían estar subestimadas, ya que aproximadamente el 3% de las mujeres infectadas no presentan los signos y síntomas característicos de la enfermedad y el 75% de los hombres infectados son portadores asintomáticos (Santos-Diéguéz, 2014).

La tasa de la tricomoniasis en México es de 108 casos por cada 100,000 habitantes (Petrin y cols., 1998). Los estudios epidemiológicos coinciden en que el mayor número de casos se presentan en mujeres en edad reproductiva (Johnston y Mabley, 2008; Satterwhite y cols., 2013), pudiendo llegar hasta quintuplicar el número de pacientes en comparación con el número de infecciones en varones (Bachmann y cols., 2011).

1.3 Morfología

T. vaginalis mide aproximadamente 10 μm de longitud y 7 μm de ancho (Honigberg y Brugerolle, 1990). Este parásito se caracteriza por presentar cuatro flagelos anteriores y uno recurrente adosado a la membrana ondulante. Cada flagelo está anclado a un cinetosoma mediante su extremo anterior. Los cuatro cinetosomas de los flagelos anteriores se disponen rodeando a un quinto que da origen al flagelo posterior o recurrente (FR). La membrana ondulante está soportada por una costa delgada no contráctil, y junto con los flagelos, es la responsable del movimiento ondulante del parásito.

T. vaginalis tiene un núcleo ovalado, de gran tamaño, excéntrico y localizado en el extremo anterior, su citoplasma es rico en carbohidratos y contiene un gran número de vacuolas que incluyen liposomas, además de una estructura hialina tipo varilla denominada axostilo, que divide longitudinalmente al parásito, desde el núcleo hasta

el extremo contrario, terminando en una punta afilada, por lo que se ha propuesto que esta estructura sea la responsable del anclaje al epitelio genitourinario (Costamagna y Prado-Figueroa, 2001; Alderete y cols., 2001). Este parásito adquiere una forma piriforme en los medios de cultivo líquidos (Nielsen y Nielsen, 1975; González-Robles y cols., 1995); una forma ameboide cuando se encuentra adherido a células del epitelio vaginal (Santos-Diéguéz, 2014), y cuando se encuentran en contacto con células DU-145 (células de cáncer de próstata derivadas del sitio metastásico de cerebro), los parásitos muestran una forma ovalada y forman pseudópodos, pero no adquieren la forma ameboide (Quintas-Granados y cols., 2013).

Hasta el momento no se conoce una forma de resistencia o quiste de *T. vaginalis* (Sorvillo y cols., 2001), aunque se han descrito formas pseudoquísticas que se caracterizan por la internalización de los flagelos y de la membrana ondulante (Pereira-Neves y cols., 2003) cuando el parásito se encuentra en ambientes desfavorables o cultivos agotados, pero se ha visto que este estado es reversible en cuanto el parásito vuelve a encontrarse en un medio adecuado y rico en nutrientes (Pereira-Neves y cols., 2003).

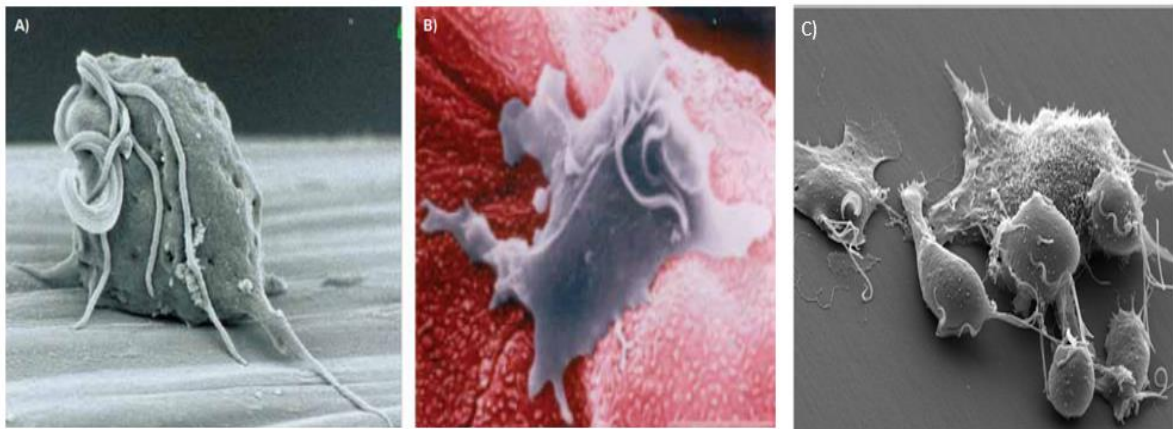


Figura 1. Morfología de *T. vaginalis*. A) Forma piriforme, donde se observan los flagelos, la membrana ondulante y el axostilo (Arroyo y cols., 1993). B) Forma ameboide al contacto con células del epitelio vaginal (Arroyo y cols., 1993). C) Forma ovalada al contacto con células del epitelio prostático (Vázquez-Carrillo y cols., 2011).

1.4 Ciclo biológico

El ser humano es el único hospedero natural de *T. vaginalis*, su reproducción es de tipo asexual y se lleva a cabo en la mucosa genitourinaria del hombre y la mujer mediante pleuromitosis (Latif y cols., 1987). Este tipo de fisión binaria longitudinal se caracteriza por el mantenimiento de la membrana nuclear durante la mitosis y la formación de un huso microtubular o *spindle* de localización externa al núcleo (Benchimol, 2004). La transmisión de *T. vaginalis* ocurre durante el contacto sexual sin protección con personas infectadas (Schwebke y cols., 2004) debido a que el transporte del parásito se lleva a cabo entre las mucosas de la zona genital femenina y masculina, como el flujo vaginal, el líquido preseminal y el semen (Santos-Diéguéz, 2014). La etapa de diagnóstico de la tricomoniasis es cuando el parásito se localiza en la vagina o en el orificio uretral, y la etapa infecciosa ocurre cuando la presencia del parásito se extiende a la orina y las secreciones prostáticas (Santos-Diéguéz, 2014).



Figura 2. Ciclo de vida de *Trichomonas vaginalis*. Tomado de Galería Cinvestav. <https://conexion.cinvestav.mx/multimedia/Galer%C3%ADa/emodule/395/gallery/1565>

1.5 Características génicas de *T. vaginalis*

El genoma de *T. vaginalis* tiene un tamaño de 160 Mb y está organizado en 6 cromosomas (Carlton y cols., 2007). Los datos de secuenciación del genoma de este parásito, muestran que existen ~ 60,000 genes codificadores de proteínas y ~39 Mb del genoma está compuesto por familias génicas repetidas como los transposones, retrotransposones, virus, y secuencias codificantes para proteínas homólogas presentes en bacterias (Carlton y cols., 2007), por lo que se cree que ocurrieron fenómenos de adquisición e incorporación de material genético mediante transferencia horizontal de genes o mediante fagocitosis seguido de una fisión binaria (Koning y cols., 2000).

Aproximadamente el 65% de los genes de *T. vaginalis* tienen intrones con un sitio de splicing conservado de 12 nucleótidos en la región 3' del RNAm. Alrededor de 30,000 genes codifican proteínas que se expresan bajo diferentes circunstancias (Huang y cols, 2000), concluyendo que este parásito puede expresar diferencialmente sus genes, dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentre (Huang y cols, 2000).

1.6 Metabolismo

T. vaginalis es un organismo que carece de citostoma, por lo que capta los nutrientes mediante pinocitosis y fagocitosis, formando vacuolas alimenticias. Su fuente esencial de energía es la glucosa que estimula fuertemente su crecimiento, aunque también puede utilizar la arginina como sustrato para sintetizar putrescina por la enzima ornitina descarboxilasa mediante la vía de arginina hidrolasa para la producción de energía (Alvarez-Sánchez y cols., 2008), mientras que la galactosa y la lactosa, no parecen ser utilizados por este parásito. La cavidad vaginal tiene altas concentraciones de glucógeno y glucosa, lo que favorece la multiplicación del parásito en esta región anatómica.

T. vaginalis es incapaz de sintetizar ácidos grasos saturados e insaturados, colesterol y poliaminas, por lo que su adquisición la lleva a cabo a través de su hospedero (Lee y cols., 2011). El colesterol y la hemoglobina la obtiene al lisar los eritrocitos cuando se adhiere a ellos mediante los carbohidratos D-lactosa y N-acetil-B-D-glucosamina presentes en su superficie celular (Cadena y cols., 2006). La obtención de poliaminas la realiza mediante un sistema antiporter putrescina/espermina, en donde se introduce una molécula de espermina por cada dos moléculas de putrescina que son secretadas (Alvarez-Sánchez y cols., 2008).

Una característica distintiva de *T. vaginalis*, es que es uno de los protozoarios que poseen hidrogenosomas, estructuras que son muy similares a las mitocondrias pero que no contienen DNA y tienen una función inusual:

- 1) En anaerobiosis producen hidrógeno molecular por oxidación del piruvato o malato, produciendo cantidades equimoleculares de CO₂, H₂ y acetato de piruvato por actividad de la enzima piruvato: ferredoxina oxidoreductasa (PFO) con formación de ATP (Lindmark y Müller, 1976; Müller 1993).
- 2) En aerobiosis no se forma H₂ y se consume oxígeno que es rápidamente inactivado, lo que indica su toxicidad para estos organelos (Lindmark y Müller, 1976).
- 3)

El papel de los hidrogenosomas *in vivo* es participar en el metabolismo general de la célula, y representaría una ventaja selectiva para vivir en nichos con poco oxígeno, por lo que *T. vaginalis* es caracterizado como un organismo microaerófilico (Lindmark y Müller, 1976).

1.7 Propiedades de virulencia

El nicho ecológico de *T. vaginalis* está sometido a intensas fluctuaciones ecológicas y fisiológicas, como son: cambios hormonales, alteración de pH, concentración de poliaminas, oxígeno, glucosa, hierro y otros metales que se encuentran en el tracto urogenital tanto masculino como femenino; así como el sistema inmune del

hospedero, la microbiota natural de la región genital que va a competir por el mismo nicho, la interacción con diferentes células del hospedero y otros factores desconocidos (Lee y cols., 2011). Por esta razón, este parásito ha desarrollado numerosos mecanismos que le han permitido sobrevivir y colonizar el tracto urogenital humano. Los mecanismos de patogenicidad de *T. vaginalis* se dividen en dos clases:

1.7.1 Mecanismos dependientes de contacto:

Citoadherencia: Este mecanismo se refiere a la unión entre el parásito y la célula epitelial. La adherencia del parásito a la célula está mediada por adhesinas presentes en la membrana plasmática de *T. vaginalis*, como son: AP120, AP65 (Lee y cols., 2011), AP51, AP33 y AP23 (Arroyo y cols., 2011), las cuales actúan de un modo específico en la unión receptor-ligando (Arroyo y cols., 1993).

Los genes que codifican a cuatro de las cinco adhesinas presentan homología de secuencia con enzimas metabólicas: la AP65 con la enzima málica, una enzima localizada en los hidrogenosomas (Alderete y cols., 1995); la AP33 y la AP51 con la enzima succinil-CoA-sintetasa subunidad alfa y beta respectivamente (Engbring y cols., 1998a; Arroyo cols., 1992; Alderete y cols., 1995); y la AP120 con la piruvato:ferrooxidin óxido-reductasa, responsable de la descarboxilación oxidativa del piruvato a acetil-CoA, localizada en la membrana de los hidrogenosomas y recientemente en la superficie del parásito (Moreno-Brito y cols., 2005; Meza-Cervantes y cols., 2011).

La superficie de *T. vaginalis* también presenta lipofosfoglucono (LPG) y cisteína-proteinasas (CP), que le permiten adoptar una forma ameboide tras la adherencia a laminina y fibronectina de la matriz extracelular (Silva-Filho y cols., 2002) con la finalidad de aumentar su superficie de contacto con la célula. Hasta el momento, se conocen 11 CP que intervienen en el proceso, de las cuales, una de ellas también se encuentra involucrada en la apoptosis de la célula epitelial (Arroyo y cols., 2011).

Hemólisis:

La actividad hemolítica de *T. vaginalis* es un mecanismo sumamente importante para la nutrición del parásito y muestra cierta correlación con la virulencia (Krieger y cols., 1983), lo que explicaría en parte el por qué durante la menstruación las manifestaciones clínicas de la infección se ven aumentadas. Debido a que la mucosa vaginal constituye un entorno nutricional pobre para el parásito, los lípidos y el hierro son nutrientes importantes para *T. vaginalis* y se pueden adquirir por la vía de lisis de los eritrocitos (Levi y cols., 1996).

La hemólisis se lleva a cabo en al menos cuatro pasos: adhesión del parásito a los eritrocitos, liberación de proteínas formadoras de poros (posiblemente CP), separación del parásito y finalmente, la lisis del eritrocito (Petrin y cols., 1998).

Las CP además de participar como factor lítico en la hemólisis de eritrocitos, también están involucradas en la degradación de inmunoglobulinas G, M y A (IgG, IgM e IgA) presentes en la vagina; así como en la adhesión del parásito a células epiteliales (Provenzano y Alderete, 1995; Yadav y cols, 2007). Recientemente, se ha sugerido que la proteinasa de 62 kDa es un factor de virulencia importante, ya que se ha encontrado una mayor cantidad de estas enzimas en el grupo de pacientes sintomáticas en comparación con las asintomáticas (Hernández-Gutierrez y cols. 2004).

1.7.2 Mecanismos independientes de contacto:**Factor de desprendimiento celular:**

El factor de desprendimiento celular (CDF, por sus siglas en inglés) es una sustancia soluble que al ponerse en contacto con monocapas de células en cultivo “in vitro” provoca el desprendimiento de estas células (Garber y Lemchuk-Favel, 1990). Esta sustancia podría ser responsable de la producción del eritema visto en la mucosa vaginal durante la infección aguda, por lo que se considera que puede ser un importante marcador de virulencia de esta parasitosis (Garber y Lemchuk-Favel, 1990).

Citotoxicidad:

Las CP de *T. vaginalis* no sólo están involucradas en la adherencia del parásito a la célula hospedera, sino que también se encuentran en los lisosomas y membrana plasmática, además de que pueden ser secretadas a través de exosomas y mediar la citotoxicidad. En las secreciones vaginales de pacientes con tricomoniasis aguda, se han encontrado CP que tienen carácter inmunogénico, como la CP65 que lleva a cabo la degradación de colágena IV y fibronectina; sin embargo, está reportado que las concentraciones de hierro disminuyen su concentración y su actividad proteolítica, afectando negativamente la citotoxicidad de *T. vaginalis* (Alvarez-Sánchez y cols., 2007).

Una de las CPs reguladas por hierro que que participan en el mecanismo de citotoxicidad es la CP39, capaz de degradar colágena I, III, IV y V, fibronectina humana e inmunoglobulinas A y G. (Hernández-Gutierrez y cols., 2004).

Hasta el momento, se han descrito cinco CP implicadas en la interacción entre parásitos y células prostáticas DU-145: CP70, CP65, CP39, CP25 y CP20 (Hernández-Gutierrez y cols., 2004), además de la MP50, una molécula que pertenece a la subfamilia A de metaloproteínas de tipo aminopeptidasa, y se ha demostrado que interviene en el mecanismo de citotoxicidad con actividad proteolítica y que es capaz de causar daño a las células del hospedero (Villalpando y cols., 2017).

MP50 es regulada por la acción del factor de transcripción MTF-1, por lo que su expresión responde a la presencia de iones metálicos en el medio, principalmente Zn^{2+} (Villalpando y cols., 2017).

Evasión de la respuesta inmune:

La principal vía de evasión de la respuesta inmune de *T. vaginalis* es la degradación de la porción C3 del complemento por acción de algunas CP. Este mecanismo es dependiente de concentraciones elevadas de hierro (Alderete y cols., 1995). Este parásito también puede llevar a cabo una variación fenotípica como mecanismo de evasión inmunológica.

En la superficie del parásito, se han encontrado dos clases de marcadores que se expresan de forma alternativa: la proteína altamente inmunogénica P270; y las adhesinas AP23, AP33, AP65 y AP51 (Alderete y cols., 1992).

P270 es una glicoproteína que presenta el epítipo repetido DREGRD, importante para la unión de la IgG vaginal a los parásitos vivos (Dailey y cols., 1990), mientras que las adhesinas parecen poder imitar la estructura de la enzima málica de las células vaginales, lo que parece ser la causa de su baja inmunogenicidad (Alderete y cols., 1995). Esta imitación molecular es otro ejemplo de cómo *T. vaginalis* puede escapar al sistema inmune del hospedero (Engbring y cols., 1998b).

Otro inmunógeno que está presente en la superficie del parásito es P230, proteína que sufre cambios conformacionales que le permiten evadir el anticuerpo vaginal (Alderete y Garza, 1988). La IgG vaginal que reconoce la proteína P230 de *T. vaginalis*, no produce ningún efecto citolítico, aun cuando el complemento está presente (Alderete y cols., 1991). Además, la respuesta del anticuerpo está restringida a pocos epítopes de la proteína de 230 kDa, lo que permite al organismo evadir el proceso de opsonización (Alderete y cols., 1991).

T. vaginalis también tiene la capacidad de secretar CP que degradan IgG, IgM e IgA (Yadav y cols., 2007), así como de secretar grandes cantidades de antígenos solubles, altamente inmunogénicos. Una liberación continua de estos antígenos podría neutralizar linfocitos T citotóxicos o anticuerpos y de esta manera bloquear los mecanismos de defensa específicos del sistema inmune contra *T. vaginalis* (Alderete y Garza, 1984).

T. vaginalis secreta una proteína pro-inflamatoria (TvMIF) que es un 47% similar al factor inhibidor de la migración de macrófagos humanos (HuMIF). La proteína TvMIF es capaz de unirse con alta afinidad al receptor de HuMIF, ocasionando un aumento en el crecimiento y la invasión de células prostáticas, tanto benignas como cancerosas (Twu y cols., 2014).

Además, *T. vaginalis* puede inducir la apoptosis de macrófagos mediante la activación de la proteína kinasa P38 presente en estas células efectoras, lo que constituye un mecanismo de evasión del ataque de macrófagos (Chang y cols., 2006). Otro mecanismo de evasión del parásito consiste en cubrirse con proteínas del plasma del hospedero, lo que le impide al sistema inmune reconocerlo como extraño (Peterson y Alderete, 1982). Se ha postulado que los mecanismos, tanto dependientes como independientes de contacto que regulan la interacción parásito-hospedador, influyen decisivamente en las manifestaciones clínicas de la enfermedad (Hernández y cols. 2014).

1.8 Función biológica de los metales

Algunos metales juegan un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis en el ciclo celular actuando como cofactores enzimáticos, estabilizadores de estructuras y moléculas biológicas o reguladores de funciones vitales como la síntesis de ATP o de DNA. Estos iones metálicos son considerados como bioelementos y los más importantes para el metabolismo y crecimiento celular, aunque se requieran en concentraciones muy bajas son: Na^{2+} , K^+ , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} y Zn^{2+} .

En el ambiente celular también existen trazas de metales no esenciales, mejor conocidos como metales pesados (llamados así porque tienen una densidad mayor o igual a $5\text{g} / \text{cm}^3$), debido a que los iones metálicos que requiere el organismo para llevar a cabo sus funciones metabólicas se encuentran mezclados con otros metales como consecuencia de las actividades que realizan los humanos en la vida cotidiana.

Los iones de metales pesados que se encuentran en el ambiente celular son principalmente: Cr^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , y Cd^{2+} . Estos iones metálicos son muy tóxicos incluso a concentraciones muy bajas (Bertin y Averbeck, 2006). Una vez en el organismo, los metales pueden interactuar entre sí de forma aditiva, antagónica o sinérgica, dependiendo de los estados de valencia y su biodisponibilidad (Preston y cols., 2000).

1.8.1 El Zn²⁺ en la célula

El Zn²⁺ es uno de los metales esenciales más abundantes en los organismos vivos después del hierro, debido a que es necesario para más de 300 enzimas (Buracco y cols., 2018). Comprende el centro catalítico y estructural de una gran variedad de proteínas que intervienen en las principales funciones fisiológicas como son: síntesis de DNA y RNA, crecimiento celular, síntesis proteica, metabolismo energético, defensa antioxidante celular, desarrollo cerebral, formación ósea y el correcto funcionamiento del sistema inmune.

Además, el Zn²⁺ también es el componente estructural de diversos reguladores de la transcripción que se unen al DNA (Kumar y Arya, 2018) y está involucrado en la apoptosis de células cancerosas de mamíferos, sugiriendo que este metal juega un papel fundamental en el mantenimiento de los mecanismos celulares de sobrevivencia (Saini y cols., 2017).

1.9 Daño al DNA por metales en células de mamíferos

La presencia de metales en concentraciones excesivas en el ambiente extracelular y celular puede dar lugar al daño de membrana, causando el desbalance de tráfico de iones y la generación de radicales libres, ocasionando estrés oxidativo, es decir, alterando el estado de equilibrio entre agentes oxidantes y antioxidantes en las células induciendo genotoxicidad (Hirschi y cols., 2000, Puchta, 1999).

La principal causa del elevado nivel de toxicidad es que los metales pesados poseen una gran capacidad para unirse con moléculas orgánicas, debido a que tienen gran afinidad por grupos sulfhidrilo, radicales amino, fosfato, carboxilo e hidroxilo (Martínez y cols., 2006). El resultado de estas uniones ligando-metal puede ser muy perjudicial para la célula, ya que puede ocasionar la peroxidación lipídica inhibiendo su actividad o modificando su estructura, la disminución de defensas antioxidantes (por ejemplo: metalotioneinas, las enzimas superóxido dismutasa (SOD), glutatión-reductasa (GR),

glutación peroxidasa (GPX), catalasa (CAT) y peroxiredoxinas) y la catálisis de reacciones de generación de especies reactivas de oxígeno (EROS), como son: el ion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (OH) y lipoperóxidos; o radicales libres que provocan fenómenos de estrés oxidativo y, por tanto, ocasionan genotoxicidad (Martínez y cols., 2006).

El daño que se origina en el DNA por radiación ionizante, ultravioleta, rayos X, radicales libres y especies reactivas de oxígeno son los rompimientos de doble cadena (DSB) y pueden ser reparados por tres procesos independientes: la recombinación homóloga (HR, de las siglas en inglés “homology recombination”), la unión de extremos no homólogos (NHEJ, de las siglas en inglés “non homologous end joining”) y el alineamiento de cadenas simples (SSA, de las siglas en inglés “single strand annealing”), mecanismo que se lleva a cabo cuando ha ocurrido la delección de una gran sección de DNA (Ogra y Suzuki, 2000).

La HR es la vía de reparación de las DSB más frecuente en *eukariotas* inferiores como los protozoarios y es la forma más conservativa de reparación del DNA, mientras que la NHEJ se asocia con la pérdida o ganancia de nucleótidos y ocurre frecuentemente en *eukariotas* superiores (Katakai y cols., 2001).

1.10 Recombinación homóloga

La recombinación homóloga (HR) es un mecanismo de reparación de alta fidelidad de roturas de doble hebra de DNA (DSB), enlaces cruzados entre hebras y horquillas de replicación estancadas o colapsadas en células que se dividen mitóticamente (Seitz y cols., 2000), mientras que, en la meiosis, la RH está involucrada en la recombinación genética (Neale y Keeney, 2006). Este mecanismo se define por la búsqueda de homología seguido por el apareamiento, el intercambio y la regeneración entre cadenas homólogas de DNA. El intercambio está asociado con la variabilidad genética y la regeneración con la reparación de la doble cadena (Katakai y cols., 2001).

Se ha identificado toda una maquinaria molecular especializada en HR, que incluye: sensores de daño al DNA como el complejo MRN compuesto por MRE11/RAD50/NBS1 (NBS1/Nibrina/NBN en *Homo sapiens* y XRS2 en *S. cerevisiae*), proteínas accesorias por ejemplo el factor de replicación A (RPA) y recombinasas específicas que tienen actividad ATPasa dependiente de DNA y poseen la capacidad de promover reacciones de transferencia de cadenas y apareamiento de DNA homólogo, como las recombinasas RAD51 y DMC1 (Ariza y cols., 2005) de la familia RAD51 / DMC1 / RADA, B (CDD: cd01123).

Las recombinasas RAD51 son proteínas que catalizan una reacción de recombinación similar a la de RecA, usando actividad de unión de DNA dependiente de ATP y una ATPasa dependiente de DNA. Sin embargo, esta reacción es menos eficiente y requiere proteínas accesorias como RAD55 y RAD57. Se sabe que RecA y RAD51 se expresan durante todo el ciclo celular, mientras que la recombinasa DMC1, se expresa solo durante la meiosis (Bishop y cols., 1992).

RAD51 y DMC1 comparten aproximadamente el 45% de identidad de aminoácidos (Brown y Bishop, 2014; Lin y cols., 2006; Story y cols., 1993), se ensamblan en filamentos helicoidales estructuralmente similares en DNA monocatenario (ssDNA) (Sheridan y cols., 2008; Sehorn y cols., 2004), y tienen propiedades bioquímicas similares (Neale y Keeney, 2006; Brown y Bishop, 2014).

A pesar de estos muchos puntos en común, DMC1 es la recombinasa responsable de realizar la invasión de cadenas durante la meiosis (Cloud y cols., 2012), mientras que RAD51 asistida por una serie de proteínas accesorias, incluidos los parálogos de RAD51 (RAD51B, RAD51C, RAD51D y XRCC2) (Da Ines O y cols., 2013) desempeña el papel catalítico central en la recombinación mitótica (Cloud y cols., 2012). Sin embargo, también se ha demostrado que RAD51 se convierte en una proteína accesoria que regula la actividad catalítica de DMC1 en las células meióticas (Brown y Bishop, 2014), ya que promueve la formación de focos de DMC1 (Cloud y cols., 2012; Bishop. 1994).

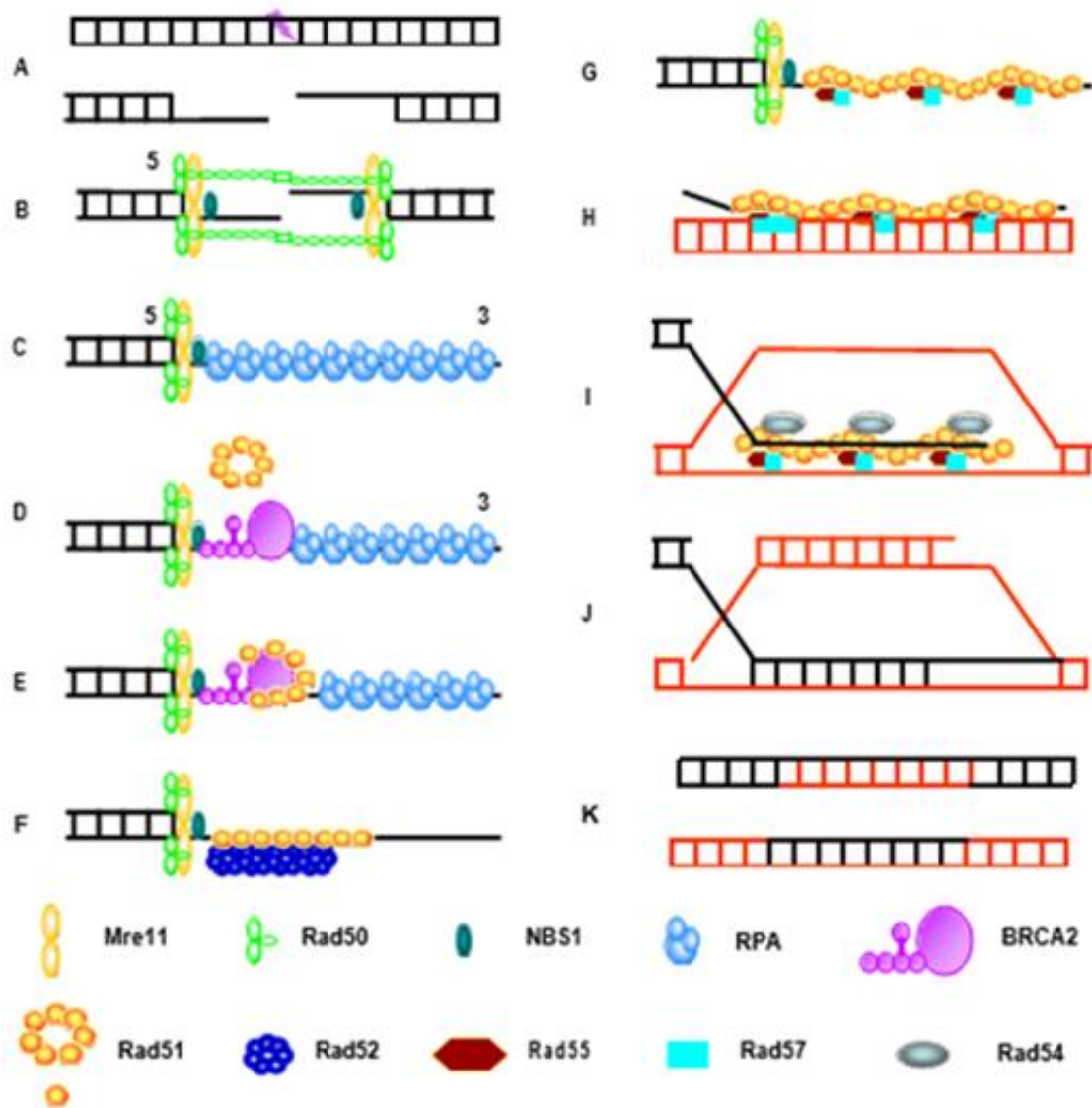


Figura 3. Mecanismo de recombinación homóloga en eucariontes (tomado de Rivera-Martínez, 2007). (A) El DSB en el DNA, (B) es detectado por MRE11 y RAD50, generando colas de DNA de cadena sencilla, (C) la proteína RPA se une al extremo 3' de la hebra sencilla de DNA, (D) BRCA2 se une a RPA y (E) recluta a RAD51. (F) RAD52 estimula la formación del filamento de RAD51 y este reemplaza al filamento de RPA. (G-H) Una vez formado el nucleofilamento las proteínas accesorias RAD55 y RAD57 favorecen la búsqueda de homología y (I) se forma un D-loop. (J) Por último, se inicia la síntesis de la nueva cadena de DNA. De esta manera la HR repara el DNA con fidelidad usando la cromátida hermana como un templado para la síntesis de una nueva cadena de DNA intacta.

2. ANTECEDENTES PARTICULARES

2.1 Regulación génica en *T. vaginalis*

Durante la infección, *T. vaginalis* necesita adaptarse rápidamente a los cambios ambientales, regulando su expresión génica a nivel transcripcional, postranscripcional, traduccional y postraduccional, a través de la dinámica y la estabilidad de la formación altamente regulada de complejos de DNA o RNA que determinarán qué genes deben ser expresados o silenciados.

T. vaginalis ha generado casi 100,000 marcadores de secuencia expresada (EST) a nivel transcripcional a partir de parásitos cultivados en siete condiciones definidas relacionadas con ciclo celular, crecimiento, inanición y patogénesis. Análisis de estos datos sugiere que la expresión génica de este parásito está altamente regulada mediante estrictos controles de tasa de transcripción diferencial, incluso para genes de mantenimiento (Figuroa-Angulo y cols, 2012).

En cuanto a los mecanismos postranscripcionales, la síntesis proteica generalmente está mediada por interacciones específicas entre proteínas reguladoras y RNA (sistema IRE/IRP) (Solano y cols., 2006).

En la regulación traduccional, se sabe que el genoma de *T. vaginalis* codifica al menos dos proteínas Argonauta que contienen dominios específicos de Argonauta Piwi (Carlton y cols., 2007), y que la expresión del gen *Tv-AGO1* es significativamente mayor que la expresión del gen *Tv-AGO2*, lo que sugiere la existencia de una maquinaria funcional de miRNA en *T. vaginalis* (Wei-Chen y cols., 2009).

En *T. vaginalis*, se han identificado nueve candidatos de miRNA que pueden desempeñar un papel importante en la regulación de genes que codifican para las Cisteín proteinasas y las proteínas de superficie similares a BspA, caracterizadas por presentar una repetición rica en leucina (Figuroa, 2012).

El mecanismo de regulación postraducciona está mediado por Cistatinas: inhibidores endógenos de cisteína proteinasas que pueden ayudar a controlar la actividad proteolítica de este parásito (Figuroa, 2012).

T. vaginalis presenta una gran plasticidad genética que le permite responder a cambios ambientales drásticos en los que se ve involucrada la temperatura, la microbiota y el pH del tracto urogenital, concentraciones de hierro, poliaminas y zinc, así como a las respuestas inmunes del hospedero, los cuales modulan la expresión de múltiples genes, incluidos aquellos que codifican factores de virulencia y que son necesarios para mantener una infección crónica (Lehker y Alderete, 1999; Alvarez-Sánchez y cols., 2007)

En *T. vaginalis*, se ha estudiado el papel que juegan las poliaminas como reguladores de determinados factores de virulencia asociados al parásito. Se sabe que el metabolismo de estas moléculas, concretamente el de la putrescina, está implicado en procesos de citoadherencia y citotoxicidad.

Se ha observado que la inhibición de la síntesis de putrescina en *T. vaginalis*, ocasiona un aumento en la capacidad de adhesión a células del epitelio vaginal, pero se inhibe la citotoxicidad mediada por contacto (García y cols., 2005).

También se sabe que la inhibición de la putrescina provoca la disminución de la expresión de CP65 y, por ende, de la cantidad de proteína sintetizada implicada en la acción citotóxica del parásito (Álvarez-Sánchez y cols., 2008). Por otra parte, (Figuroa-Angulo y cols., 2012) también han confirmado el papel regulatorio de las poliaminas en la expresión a nivel post-transcripcional de CP39, implicada en la citotoxicidad.

T. vaginalis presenta una proteína de dedo de zinc (TvZNF1) que es regulada positivamente por la presencia de Zn^{2+} . Esta proteína tiene 8 motivos clásicos de dedo de zinc (C_2H_2 (C_2H_2 -ZNFm)), con residuos que pueden estar implicados en la estabilidad estructural de los motivos de unión al DNA.

Además, se ha demostrado *in vitro* que la proteína TvZNF1 recombinante se une a la firma MRE, lo que sugiere que *T. vaginalis* presenta un mecanismo conservado de regulación génica mediado por ZNF (Villalpando y cols., 2017).

En genes sensibles al Zn^{2+} de *T. vaginalis*, se han encontrado seis motivos de secuencia de respuesta a metales, sobrerrepresentados altamente conservados (TvMREs), que comparten similitud con otros MREs *eukaryotas*. Algunos de estos TvMREs se ensamblan como complejos divalentes, ya sea como dos TvMRE estrechamente espaciados o como dos TvMRE superpuestos que forman una secuencia de tipo palindrómico: TGCC (N3) GGCA. Estos resultados apoyan un mecanismo novedoso utilizado por *T. vaginalis* para la regulación transcripcional de genes que responden al zinc a través de un sistema similar a MTF1 / MRE (Torres-Romero y cols., 2020).

2.2 Iones metálicos en el tracto urogenital masculino

Diversos estudios han demostrado la presencia de metales tanto esenciales como no esenciales en el tracto urogenital masculino, y se sabe que, principalmente los metales no esenciales tienen efecto en la salud reproductiva alterando directamente el proceso de espermatogénesis (Mendiola y cols., 2011).

	Ion metálico	Concentración	
Metales esenciales	Magnesio	12.62 mg/dL	Metales NO esenciales
	Zinc	154.6 mg/L	
	Cobre	173.29 µg/mL	
	Manganeso	0.7 µg/L	
	Hierro	28.7 p.p.m	
Plomo	29 µg/L		
Mercurio	11.5 µg/L		
Cadmio	0.8 µg/L		

Tabla 1: Concentraciones de iones metálicos en el plasma seminal de hombres sanos (Mendiola y cols., 2011; Abdul-Rasheed, 2010).

2.2.1 Presencia de Zn²⁺ en el fluido prostático

El Zn²⁺ está presente en el fluido prostático del hombre a una concentración que oscila entre 4.5 y 7 mM, y tienen un efecto tricomonocida que ayuda a limitar o resolver la infección (Willmott y cols., 1983). Sin embargo, en los pacientes diagnosticados con prostatitis crónica por tricomoniasis, la concentración de Zn²⁺ es menor a 1.6 mM, lo que indica que el catión no tiene efecto tricomonocida (Krieger y Rein, 1982), permitiendo su asentamiento.

El efecto tricomonocida del Zn²⁺ en el tracto urogenital masculino podría ser la razón por la cual esta infección cursa de forma asintomática en la mayoría de los varones (Krieger y Rein, 1982).

2.2.2 Presencia de Cd²⁺ en el fluido prostático

El Cd²⁺ es un metal pesado que se acumula en el ambiente como resultado de las actividades industriales, ocasionando contaminación de los ríos y de las tierras de cultivos debido a que es capaz de combinarse con otros elementos y formar compuestos tales como cloruros, óxidos, sulfuros y de esta manera unirse fuertemente a las partículas del suelo (Farkas y cols., 2007; Pan y cols., 2010).

El Cd²⁺ se encuentra en los fluidos prostáticos a una concentración aproximada de 0.8 µg/L debido a su ingesta en la dieta, ya que se presenta generalmente como impureza en los minerales de Zn²⁺ o por contaminación del ambiente (humo de tabaco, contaminación aérea y agua) (Waalkes y cols., 1992).

2.3 Factores de virulencia de *T. vaginalis* regulados por Zn²⁺

Se sabe que el Zn²⁺ modula la expresión de múltiples genes en *T. vaginalis*, incluidos aquellos que codifican factores de virulencia como la citotoxicidad y capacidad de adhesión (Lehker y Alderete, 1999; Alvarez-Sánchez y cols., 2007), por lo que la expresión diferencial del proteoma de *T. vaginalis* en presencia de este catión puede jugar un papel clave en su supervivencia en el entorno adverso del tracto urogenital masculino (Quintas-Granados y cols., 2013), lo que podría explicar el curso de la infección de forma asintomática en el hombre.

Se ha estudiado el proteoma, la morfología, y citotoxicidad del aislado masculino HGMN01 de *T. vaginalis* en presencia de Zn²⁺, encontrándose diferencias de expresión en aproximadamente 37 proteínas, de las cuales, 6 están involucradas en la citotoxicidad de este parásito y se regulan negativamente en presencia de este catión (CP20, CP25, CP39, CP65 Y CP70), (Vázquez-Carrillo y cols., 2011). Por otra parte, se han identificado 4 proteínas que se regulan positivamente en presencia de Zn²⁺, como son: Fimbrina, Adenosil-homocisteinasa, Asparaginil-endopeptidasa y TvMP50.

TvMP50 es una metaloproteinasa aminopeptidasa P miembro de la familia M24, tiene un peso de 50 kDa y ocasiona citotoxicidad hacia las monocapas de células DU145 prostáticas (Vázquez-Carrillo y cols., 2011), por lo que fue identificada como un nuevo factor de virulencia del parásito mediado por Zn²⁺ que está presente durante la tricomoniasis masculina, posiblemente explicando la supervivencia de *T. vaginalis* en las condiciones adversas del microambiente urogenital masculino (Puente-Rivera y cols., 2017). Además, se ha visto que TvMP50 es secretada por el parásito en presencia de Zn²⁺ siendo activa proteolíticamente, provocando citotoxicidad a células DU145.

Cuando los niveles de MP50 aumentan excesivamente, es contenida en estructuras similares a vesículas o vacuolas, pero conserva su actividad proteolítica, al igual que cuando es secretada (Puente-Rivera y cols., 2017).

También se ha identificado una proteína de unión a DNA con 8 motivos de dedo de zinc (C_2H_2 -ZNF) en *T. vaginalis* (TvZNF1) que puede actuar como factor transcripcional y está implicada en la activación de respuesta al estímulo ambiental por biometales como el Zn^{2+} (Villalpando y cols., 2017).

Se ha demostrado que los C_2H_2 -ZNF interactúan con RNA/DNA y algunas proteínas de reparación de daño del DNA en parásitos (Gopalakrishnan y cols., 2017). Además, TvZNF1 reconoce al elemento de respuesta a metales tipo 2 (MRE2) y este a su vez, es reconocido por MTF1 (un factor de transcripción regulado por Zn^{2+}), lo que sugiere que su participación en la regulación de la expresión génica de *T. vaginalis* está mediada por Zn^{2+} (Villalpando y cols., 2017). Por otra parte, se han identificado 8 miembros de la familia de genes ZIP en *T. vaginalis*, que codifican transportadores de membrana (permeasas) que pueden ser responsables de la adquisición de Zn^{2+} y Fe^{2+} del ambiente extracelular (Fernández-Martín y cols., 2017).

2.4 Factores de virulencia de *T. vaginalis* regulados por Cd²⁺

Las metalotioneínas (MTs) son una familia de proteínas de bajo peso molecular (aproximadamente 7 kDa) que no presentan puentes disulfuro y aunque sus funciones no están totalmente esclarecidas, es bien sabida su participación en la detoxificación de metales pesados (Suzuki y cols., 1988).

Los genes que codifican las metalotioneínas se regulan positivamente a nivel transcripcional por la presencia de ciertos metales como son: Cu²⁺, Cd²⁺ y Zn²⁺ y en respuesta a estímulos como el estrés oxidativo y los glucocorticoides (Heuchel y cols., 1994; Radtke y cols., 1995).

El Cd²⁺ presenta competencia con el Zn²⁺ y el Cu²⁺, lo que produce afección de la homeostasis de estos metales en la sangre y tejidos, en donde se pueden ver afectados diversos sistemas enzimáticos, tales como el citocromo oxidasa, superóxido dismutasa, uricasa, entre otros (Thomas, 1999).

El genoma de *T. vaginalis* codifica al menos una metalotioneína (TvMT-1) regulada positivamente por Cd²⁺, la cual podría participar en las vías involucradas con la detoxificación de metales y de respuesta al estrés oxidativo presente en el tracto urogenital masculino. Por otro lado, se han encontrado otros tres genes homólogos de TvMT-1 cuya expresión podrían ser reguladas por Cd²⁺ (Netzahualcoyotzi, y cols., 2019).

2.5 Daño al DNA por Zn²⁺ y Cd²⁺

El Zn²⁺ y el Cd²⁺ en exceso pueden causar genotoxicidad directa al unirse a los grupos nucleofílicos de la desoxirribosa y de las bases nitrogenadas de la molécula de DNA produciendo una modificación química (Waalkes y cols., 1992) y como consecuencia, dañar la molécula (Achanzar y cols., 2001). Además, pueden dañar el material genético de manera indirecta al inducir la acumulación de EROS y radicales libres (Achanzar y cols., 2001). También se ha demostrado que el Cd²⁺ puede reemplazar al Zn²⁺ en p53, inhibiendo su actividad de unión al DNA y evitando la detención del ciclo celular después del daño del material genético (Méplan y cols., 1999).

Por otra parte, el Cd²⁺ es capaz de ocasionar la disminución en el contenido de GSH y de activar diferentes cascadas de señalización que son sensibles a la acumulación de EROS como: la fosfolipasa C (PLC), proteína cinasa C (PKC), las cinasas activadas por mitógenos (MAPK), cinasa serina/treonina mTOR, cinasa S6K1, cinasa II dependiente de calmodulina/calcio (CaMKII), cinasa dependiente de RNA ligada al RE (PERK), proteína reclutadora de inositol 1 (IRE1) y la cinasa trifosfato inositol/proteína cinasa B (PI3K/Akt) (Martínez y cols., 2006).

Cuando existe un daño en la mitocondria o estrés en el retículo endoplásmico, las cascadas de señalización favorecen la activación de diversos factores de transcripción como el factor de transcripción-1 que responde a metales (MTF-1), el factor de transcripción de choque térmico 1 (HSF-I), el transductor de señal y activador de la transcripción-3 (Stat-3), la proteína activadora-1 (AP-1), el factor nuclear-KB (NF-KB), el activador del factor de transcripción 6 (ATF-6), el factor de transcripción Chop (proteína homóloga a C/EBP), el factor de iniciación de la traducción eucariótica 2 α (eIF2 α), el factor inductor de apoptosis (AIF) y p53 que inducen la transcripción de genes blanco que participan en varios procesos celulares tales como sobrevivencia, protección, cáncer o muerte celular (Zhang y cols., 2010).

2.6 Recombinasas RAD51 y DMC1

Aunque *T. vaginalis* se ha clasificado como un organismo unicelular asexual, en su genoma se han identificado 27 de 29 principales genes meióticos conocidos hasta el momento (dentro de los que se encuentra el gen que codifica a la recombinasa específica de meiosis DMC1), por lo que se sugiere que la capacidad de realizar meiosis estaba presente en el último ancestro común de *T. vaginalis* y que la maquinaria molecular para la recombinación meiótica estaba bien establecida antes de que ocurriera la divergencia del último ancestro común de los *eukariotas* con meiosis (Malik y cols., 2007).

Estudios *in vitro*, han demostrado que los nucleofilamentos formados por la proteína DMC1 son menos estables que los nucleofilamentos formados por la proteína RAD51, debido a que su tasa de nucleación es más lenta a causa de su baja afinidad a DNA de cadena sencilla (ssDNA), la cual está dada por su conformación estructural (Wei-Hsuan y cols., 2020).

También se ha observado que DMC1 se localiza principalmente en la unión de ssDNA con DNA de doble cadena (dsDNA) en polaridad 5' -> 3', y su polimerización se estimula por la presencia de segmentos cortos de RAD51 (Wei-Hsuan y cols., 2020). Por otra parte, se ha demostrado *in vitro* que la nucleación de RAD51 depende de la longitud del ssDNA, mientras que la nucleación de DMC1 es independiente de la longitud de la lesión (Wei-Hsuan y cols., 2020).

Algunas observaciones *in vitro* sugieren que RAD51 y DMC1 pueden formar complejos de recombinación mixta por interacciones directas entre las dos proteínas (Malik y cols., 2007), sin embargo, diversos estudios han demostrado evidencias de que las proteínas RAD51 y DMC1 colocalizan en ambos extremos de los DSB meióticos, sugiriendo que las recombinasas forman filamentos separados en el mismo ssDNA (Brown y cols., 2015), pero aún se desconoce el mecanismo por el que este fenómeno se lleva a cabo.

Hasta hace algunos años, se sabía que las dos recombinasas tienen mediadores distintos, RAD52, que promueve el ensamblaje de filamentos RAD51 (Sung, 1997; New y cols., 1998), mientras que MEI5 / SAE3 promueven el ensamblaje de filamentos DMC1 (Ferrari y cols., 2009). Por esta razón, es probable que RAD52 y MEI5 / SAE3 dirijan el ensamblaje de filamentos RAD51 y DMC1 en ubicaciones específicas. Alternativamente, las recombinasas podrían formar filamentos separados sin necesidad de ayuda de cofactores reguladores adicionales.

Para probar estas hipótesis, se han realizado estudios en donde se encontró que RAD51 y DMC1 pueden auto-segregarse espontáneamente en filamentos homopoliméricos en ssDNA, produciendo una disposición de lado a lado que recuerda la organización de RAD51 y DMC1 observada *in vivo* (Neale y Keeney, 2006; Brown y Bishop, 2014). Este hallazgo sugiere que las dos recombinasas tienen una capacidad intrínseca para formar filamentos espacialmente distintos, lo que muestra la posibilidad de que no se requieran otros cofactores para dirigir la segregación de los filamentos, sino que, la información necesaria para crear filamentos de recombinasa auto-segregados está codificada dentro de las propias recombinasas, sin necesidad de la participación de otros factores accesorios. Esto argumenta en contra de la posibilidad de que proteínas mediadoras, como RAD52 y MEI5 / SAE3 (Sung, 1997; Ferrari y cols., 2009), sean responsables de dirigir el ensamblaje de filamentos RAD51 y DMC1 segregados que se observan *in vivo*.

La presencia de los mediadores puede mejorar la carga de proteínas recombinasas, ayudar a reforzar su segregación y / o regular la longitud de los nucleofilamentos resultantes (Crickard y cols., 2018).

También se han observado evidencias bioquímicas en la comunicación entre filamentos de recombinasa. Esta comunicación se ha identificado con una estabilización mejorada de RAD51 cuando se agota el ATP y DMC1 está presente; además de una mayor disociación de RAD51 en ausencia de DMC1 (Crickard y cols., 2018).

Se sabe que, durante la meiosis, se requiere la presencia de RAD51 para la formación eficiente de focos DMC1 (Bishop, 1994; Shinohara y cols., 1997), pero RAD51 no realiza la actividad de intercambio de hebras (Cloud y cols., 2012), sugiriendo que RAD51 funciona principalmente para estimular el ensamblaje de filamentos DMC1 (Brown y Bishop, 2014; Cloud y cols., 2012). Por lo tanto, las evidencias bioquímicas sugieren que este efecto estimulante también puede funcionar en la dirección inversa (Crickard y cols., 2018); es decir, DMC1 podría jugar un papel regulatorio en la formación y estabilización de los nucleofilamentos de RAD51 adyacentes para reparar las lesiones en el DNA mediante recombinación homóloga en células mitóticas.

2.7 Diferencias funcionales entre RAD51 y RECA

- RAD51 cataliza la hidrólisis de ATP con una velocidad de 35 a 40 veces más bajo que la de RECA (Detlef, 2000).
- RAD51 no requiere de hidrólisis de ATP durante el intercambio de cadenas de DNA, mientras que RECA sí. (Detlef, 2000).
- RECA polimeriza la cadena sencilla de DNA con una polaridad $5' \rightarrow 3'$. Esta dirección asegura que el extremo $3'$ de la cadena sencilla, sea cubierta por la proteína RECA y, por lo tanto, se active el apareamiento homólogo. Esta preferencia bioquímica por el extremo $3'$, es considerada como una desventaja, porque este extremo podría servir como cebador para iniciar la recombinación dependiente de la replicación y la reparación de la ruptura de la doble cadena de DNA (Mazin y cols., 2000).
- RAD51 muestra una preferencia por la polaridad $3' \rightarrow 5'$ para la extensión del heteroduplex. Aunque la formación del nucleofilamento protegen al extremo $5'$ de la cadena sencilla de DNA mejor que el $3'$ de la degradación de las exonucleasas, el intercambio con la doble cadena de DNA puede ser promovido por cualquiera de los extremos (Mazin y cols., 2000).

- La reacción de intercambio en levadura y humano es muy sensible a la concentración de la proteína RAD51, un exceso de proteína inhibe el intercambio (Mazin y cols., 2000).

2.8 RAD51 en parásitos

La recombinación homóloga además de resguardar la integridad del genoma, apoya la versatilidad y plasticidad genómica (Toshihiko y cols., 2005). En muchos organismos patogénicos, la recombinación puede ser una estrategia para sobrevivir al enfrentarse a la presión inmunológica del hospedero y adaptarse a los factores condicionados por el ambiente (Bhattacharyya y cols., 2004). Por lo que la caracterización tanto de los eventos de recombinación, así como de la expresión y participación de la proteína RAD51 en diferentes organismos parásitos ha sido objeto de muchos estudios, en particular en los parásitos protozoarios.

En *Leishmania major* se observó que LmRAD51 se une al DNA y tiene actividad de ATPasa dependiente de DNA, que son características de las recombinasas mencionadas anteriormente. Recientemente, se encontró la participación de LmRAD51 en los eventos de recombinación entre secuencias repetitivas que flanquean los genes MDR (por sus siglas en inglés “multi drug resistance”) que conllevan a la amplificación y sobreexpresión del transportador PGP, que confiere al parásito el fenotipo de resistencia a drogas (McKean y cols., 2001).

En el parásito *Trypanosoma brucei*, se demostró que la recombinación homóloga mediada por TbRAD51 produce la expresión alternativa de diferentes glucoproteínas de superficie o VSG (de sus siglas en inglés “variant surface glucoproteína”) (Conway y cols., 2002).

En *Plasmodium falciparum* también se ha identificado un homólogo de PfRAD51, lo que ayudó a demostrar que la variación antigénica en este parásito está asociada a la proteína RAD51 al participar en los rearrreglos de recombinación del DNA (Bhattacharyya y cols., 2004).

En el genoma de *E. histolytica*, se identificó un gen que codifica para una proteína homóloga a las proteínas de la familia RECA/RAD51: EhRAD51. Ensayos funcionales *in vitro* han demostrado que la expresión del gen *Ehrad51* aumenta durante la fase S del ciclo celular y en los trofozoítos irradiados con luz ultravioleta, lo que sugiere que la proteína podría participar en eventos relacionados con la reparación del DNA (López Casamichana y cols, 2008).

Además, la proteína rEhRAD51 es capaz de unirse tanto al DNA de cadena sencilla como al DNA de doble cadena y de promover el apareamiento entre cadenas homólogas de DNA, formando el D-loop. Por lo que se concluyó que esta proteína posee las características moleculares y funcionales de una recombinasa de la familia RECA/RAD51 (López Casamichana y cols, 2008).

3. JUSTIFICACIÓN

La disminución en las concentraciones de Zn^{2+} y Cd^{2+} en el fluido prostático favorecen la adhesión y colonización de *T. vaginalis* en el tracto urogenital masculino, aun cuando estos cationes pueden ocasionar daños al DNA del parásito; por lo que *T. vaginalis* podría contar con un mecanismo de reparación de daño del DNA mediante recombinación homóloga donde esté involucrada TvRAD51, permitiéndole adaptarse y sobrevivir en el microambiente del tracto urogenital masculino.

4. HIPÓTESIS

T. vaginalis expresa moléculas involucradas en un mecanismo de reparación de daño del DNA por recombinación homóloga, como RAD51 ante la presencia de Zn^{2+} y Cd^{2+} durante la tricomoniasis masculina.

5. OBJETIVOS

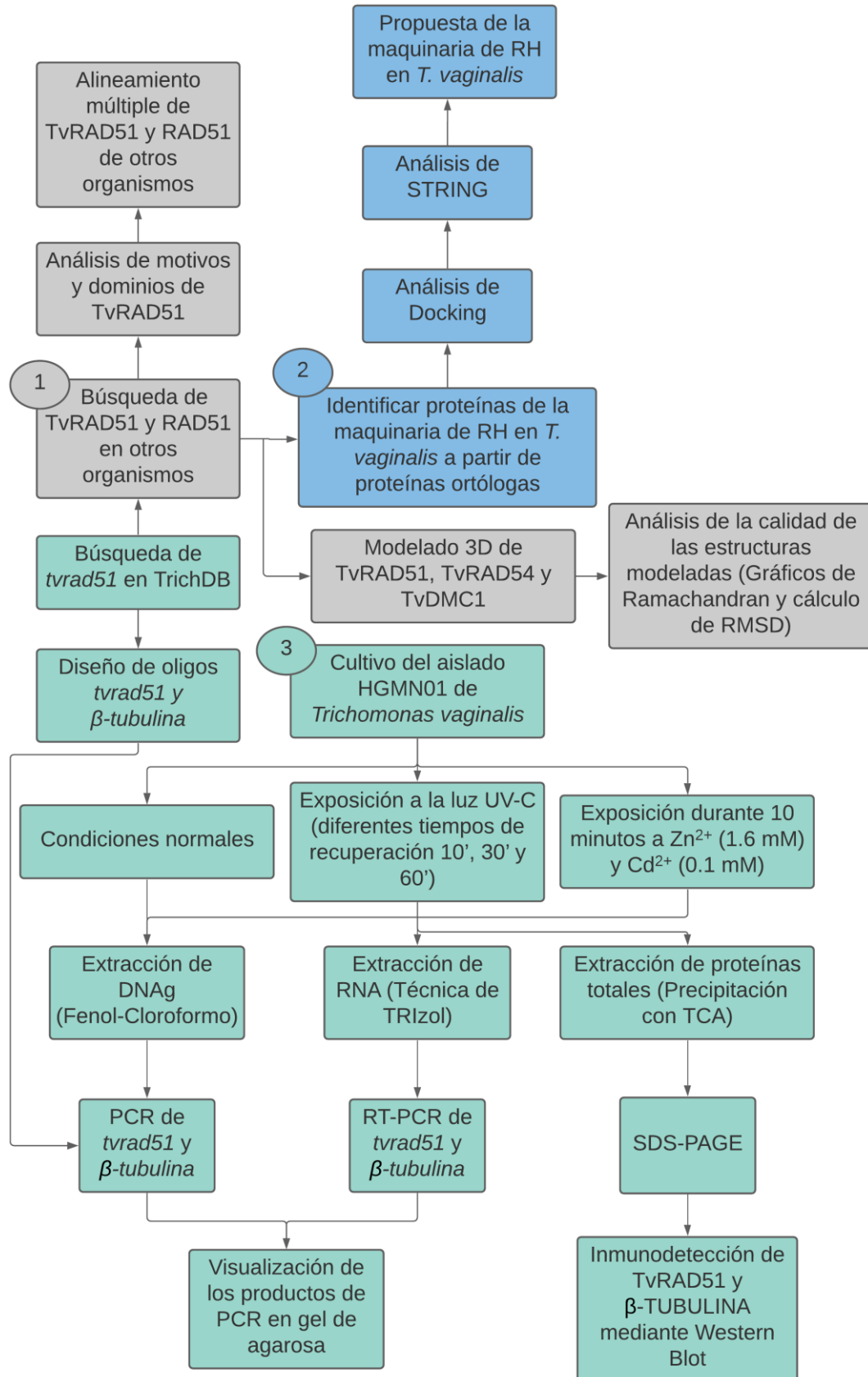
GENERAL:

- Estudiar la expresión del gen *tvrad51* y de la proteína TvRAD51 en *T. vaginalis* como respuesta a la reparación de daño del DNA por la presencia de cationes tales como Zn^{2+} y Cd^{2+} .

PARTICULARES:

- Análisis comparativo *in silico* de TvRAD51 de *Trichomonas vaginalis* con RAD51 de otros organismos.
- Determinar *in silico* las posibles proteínas que interaccionan con TvRAD51 en *Trichomonas vaginalis*.
- Determinar la expresión del gen *tvrad51* y de la proteína TvRAD51 en *Trichomonas vaginalis* bajo tratamiento con luz UV-C, presencia y ausencia de Zn^{2+} o Cd^{2+} .

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Análisis *in-silico*

7.1.1 Análisis de secuencias

Se realizó la búsqueda del gen *tvrad51* y la secuencia de aminoácidos de la proteína RAD51 de *Trichomonas vaginalis* (TvRAD51) (ID TrichDB: TVAG_204070) en la base de datos TrichDB (<https://trichdb.org/>) (Aurrecoechea y cols., 2009). Se obtuvo la secuencia de aminoácidos de la proteína RAD51 de *Saccharomyces cerevisiae* (ScRAD51) (ID GenBank: CAA45563.1) y *Homo sapiens* (HsRAD51) (ID GenBank: NP_002866.2). También se obtuvieron las secuencias de las proteínas RAD51 de *Acanthamoeba castellanii* (AcRAD51) (ID GenBank: ACA1_201650), *Entamoeba histolytica* (EhRAD51) (ID AmoebaDB: EHI5A_123500), *Giardia lamblia* (GiRAD51) (ID GiardiaDB: DHA2_13104), *Leishmania mexicana* (LmRAD51) (ID TriTrypDB: LmxM.28.0550), *Naegleria fowleri* (NfRAD51) (ID AmoebaDB: NF0007900), *Plasmodium falciparum* (PfRAD51) (ID PlasmoDB: PF3D7_1107400) y *Trypanosoma brucei* (TbRAD51) (ID TriTrypDB: Tb427_090054300) mediante una búsqueda de secuencias con el software BLAST (en las plataforma *on-line* del NIH-NCBI: National Institute of Health and National Center for Biotechnology Information y TrichDB: *Trichomonas* Database) con valor de expectativa 10 (predeterminado) utilizando la proteína HsRAD51 como Query. Posteriormente, se utilizó la plataforma InterPro-EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) (Blum y cols., 2021) para poder identificar los motivos y dominios presentes en estas proteínas y realizar las representaciones esquemáticas. También se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de las proteínas RAD51 de los 10 organismos mencionados y de las secuencias de nucleótidos del gen y el pseudogen *tvrad51* de *T. vaginalis* en el software Clustal O (1.2.4) de EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (Sievers y Higgins, 2014) utilizando los parámetros predeterminados. En el alineamiento múltiple de las secuencias proteicas de RAD51, se identificaron mutaciones puntuales que se han observado en ScRAD51 mediante estrategias mutagénicas de doble híbrido que afectan en la interacción de esta recombinasa con las demás proteínas del grupo epistático RAD52 (Krejci y cols., 2001; Rivera-Martínez,

2007), confiriendo un fenotipo de sensibilidad al agente alquilante metil metanosulfonato (MMS) (Rivera-Martínez y cols., 2007).

7.1.2 Construcción de modelos por homología de TvRAD51, TvDMC1 y TvRAD54

Se realizó el modelado por homología de las proteínas TvRAD51, TvDMC1 y TvRAD54, utilizando los softwares Phyre²: Protein Homology/analogY Recognition Engine V 2.0 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>) (Kelley y cols., 2015) y Swiss-Model (<http://www.expasy.ch/swissmod/>) (Schwede y cols., 2003). La fiabilidad de los modelos se evaluó mediante gráficos de Ramachandran utilizando el servidor PROCHECK (<https://saves.mbi.ucla.edu/>) (Laskowski y cols., 1996) y mediante valoración de divergencia estructural por sobreposición y valores de RMSD respecto al modelo templado utilizando el software Chimera 1.14 (Pettersen y cols., 2004). En este software también se realizó una sobreposición de las estructuras modeladas por homología de TvRAD51 y TvDMC1 en la estructura molecular del complejo RAD51 presináptico humano (**PDB: 5H1B**). Se modeló un filamento de tres monómeros de TvRAD51 utilizando el PDB 5H1B como referencia y colocando las coordenadas del archivo PDB del modelo de TvRAD51 obtenido en Swiss-Model con el software EditPad Lite 8 ([EditPad Lite - Free Text Editor for Windows](#)). Se realizó una sobreposición estructural con el filamento de tres monómeros de HsRAD51 en el software Chimera 1.14. Se modeló un filamento mixto de dos monómeros de TvRAD51 y un monómero de TvDMC1 utilizando el PDB 5H1B como referencia y colocando las coordenadas del archivo PDB del modelo de TvRAD51 y TvDMC1 obtenido en Swiss-Model con el software EditPad Lite 8 y se visualizó en software Chimera 1.14.

7.1.3 Análisis de acoplamiento molecular (docking)

Para evaluar los posibles sitios de enlace de DNA de TvRAD51 y de las regiones de reconocimiento entre esta y sus homologas TvDMC1 y TvRAD54, se realizaron los siguientes análisis de acoplamiento molecular, también conocido como docking molecular:

Acoplamiento molecular del modelo de TvRAD51 con las bases nitrogenadas adenina, timina, citosina y guanina, además de una prueba con un desoxi-nucleótido de citosina (desoxi-citidilato 5'monofosfato, dCMP). De los archivos de coordenadas descargados de la base de datos del PDB (ID: 2G1Z, 6YMJ y 1IT7) se extrajeron, mediante edición con el software EditPad Lite 8, las coordenadas de las moléculas correspondientes a: adenina, timina, citosina, guanina y desoxi-citidilato 5'monofosfato. Las coordenadas en formato .pdb fueron convertidas a formato .mol2 en el software OpenBabel Gui v2.3.1 ([The Open Babel GUI — Open Babel v2.3.1 documentation](#)). Posteriormente, se realizaron dockings moleculares de TvRAD51 (utilizando el archivo PDB del modelo obtenido en Swiss-Model) con cada una de moléculas generadas (utilizando los archivos .mol2) con el software *on-line* Swisdock (<http://www.swissdock.ch/>; Grosdidier y cols., 2011). Las 20 mejores predicciones de acuerdo a los valores de Fullfitness fueron visualizadas en el software Chimera 1.14 (Pettersen y cols., 2004). También se realizaron los acomplamientos moleculares o dockings a la proteína TvRAD51 con la proteína TvRAD54 (archivo pdb obtenido en Swiss-Model convertido a .mol2) y a la proteína TvRAD51 con TvDMC1 (archivo pdb obtenido en Swiss-Model convertido a .mol2) y se visualizaron en el software Chimera 1.14 (Pettersen y cols., 2004).

7.1.4 Análisis de interacción de redes de la proteína TvRAD51

Se llevó a cabo la búsqueda de los elementos que integran el grupo de epistasis RAD52 en *T. vaginalis* a partir de ortólogos utilizando la herramienta BLASTp (Altschul y cols., 1990) de la base de datos TrichDB utilizando el valor de expectativa 10 (predeterminado) y se analizaron las interacciones de redes de proteína-proteína mediante STRING (Protein-Protein Interaction Networks Functional Enrichment Analysis; <https://string-db.org/>) (Mering y cols., 2003).

7.2 Análisis de expresión del gen *tvrad51*

7.2.1 Cultivo de *T. vaginalis* en presencia de cationes metálicos

30x10⁶ parásitos del aislado HGMN01 de *T. vaginalis* se cultivaron a 37°C/10 min en medio triptona-extracto de levadura-maltosa (TYM) suplementado con 10% de suero

de caballo inactivado (SC) y Zn^{2+} a una concentración final de 1.6 mM o Cd^{2+} a una concentración final de 0.1 mM. Como control, se utilizó el cultivo del aislado HGMN01 de *T. vaginalis* en medio TYM en ausencia de cationes metálicos (CN: condiciones normales).

7.2.2 Extracción de DNA genómico

A partir de 20×10^6 parásitos de *T. vaginalis* HGMN01 crecidos en condiciones normales, se centrifugó a 1800 rpm/5 min/4 °C, se decantó el sobrenadante y se lavó 3 veces la pastilla con PBS 1x pH 7.0 frío. La pastilla se resuspendió con PBS 1x pH 7.0 frío, se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se centrifugó a 13000 rpm durante 1 minuto a 4°C. Posteriormente, a la pastilla se le agregaron 300 µl de buffer de lisis y 300 µl de fenol, se mezcló por inversión durante 30 segundos y se centrifugó a 13000 rpm/ 3 min/4°C. Se recuperó la fase acuosa y se colocó en un tubo Eppendorf nuevo de 1.5 ml, enseguida, se agregaron solventes orgánicos en relación 1:1:de fenol cloroformo, se agitó en vórtex durante 30 segundos y centrifugó a 13000 rpm/3 min/4°C. Se volvió a recuperar la fase acuosa, se colocó en tubo Eppendorf nuevo y se añadió 1 volumen de cloroformo, se agitó en vórtex durante 30 segundos y se centrifugó a 13000/3 minutos/4°C. Se recuperó la fase acuosa nuevamente y se pasó a un tubo Eppendorf nuevo, posteriormente se añadió 1ml de etanol al 100% + 50 µl de acetato de sodio 3M y se incubó a -70°C/1 h. Se dejó aclimatar la muestra a temperatura ambiente y se centrifugó a 13000 rpm/15 min/4°C. Se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla (sin resuspender) con 1ml de etanol al 70% frío. Se eliminó el etanol y se centrifugó solo la pastilla a 13000 rpm/5 min/4°C y se desechó el posible sobrenadante. La pastilla se dejó secar a temperatura ambiente durante 5 minutos y se añadieron 30 µl de agua libre de DNAsas para resuspender la pastilla suavemente. Se incubó con 2 µl de RNasa A (2mg/mL) a 37°C/1 h. El DNA genómico se cuantificó y se midió la pureza utilizando el equipo NanoDrop 2000, y se visualizó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñido con GelRed® (Biotium).

7.2.3 Exposición de parásitos a luz UV-C

Se verificó la viabilidad del cultivo del aislado HGMN01 de *T. vaginalis* en CN por observación microscópica. Se transfirieron aproximadamente 30×10^6 parásitos a 4

tubos cónicos y se agregaron 15 ml de medio preparado para tricomonas (TYM+SC). Se encendió el equipo UV-Stratalinker (UV Crosslinker) y se precalentó durante 2 minutos. Una vez finalizado el precalentamiento del equipo, se colocaron 3 de los tubos que contienen los parásitos dentro del equipo, se programó a 150 J/m² de energía y se inició la irradiación. Después del tratamiento, se agregó el medio faltante para llevar los tubos a 30 ml y se incubaron a 37°C a diferentes tiempos (Tubo CN y 1 tubo con tratamiento UV-C: 10 minutos; un segundo tubo con tratamiento UV-C: 30 minutos y finalmente un tercer tubo con tratamiento con luz UV-C: 60 minutos).

7.2.4 Extracción de RNA total de *T. vaginalis* en condiciones normales, bajo tratamiento con luz UV-C y presencia de cationes Zn²⁺ o Cd²⁺

Para cada tratamiento, se utilizaron 30x10⁶ parásitos crecidos en medio TYM. Se realizaron 3 lavados con PBS 1x pH 7.0 frío centrifugando a 1800 rpm/5 min/4°C. Las pastillas se resuspendieron con 1mL de TRIzol® (Ambion, Invitrogen) y se incubaron a -70°C/1h. Posteriormente, las muestras se descongelaron en hielo y se centrifugaron a 13000 rpm/20 min/4°C. Se lavó la pastilla con etanol al 75% en agua DEPC y se centrifugó nuevamente a 10000 rpm/5min/4°C. Se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente y se resuspendió en 60 µl de agua DEPC. Para eliminar el DNA contaminante, se agregó 1 µl de DNAsa I por cada 3 µg de RNA total, se incubó a 37°C/1 h y posteriormente se inactivó a 65°C/10min. El RNA total se cuantificó y se midió su pureza por espectrofotometría en el Nanodrop 2000. Se verificó su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñido con GelRed® (Biotium).

7.2.5 Síntesis de cDNA

Se tomó 1µg de RNA tratado con DNAsa y se colocó en un tubo Eppendorf® de 1.5 ml. Se adicionó 1µl de Oligo dT (1 µg / µl) y agua DEPC para obtener un volumen final de 12µl y se desnaturalizó a 70°C/15 min. Posteriormente, el tubo se incubó a 4°C/5 min y se le adicionó la siguiente mezcla: 4 µl de buffer "first-strand" 5X Thermo Fisher®: S4991, 2 µl de DTT 0.1M y 2µl de dNTPs 10 mM (dATP, dTTP, dGTP y dCTP). Se incubó a 42°C/2 min y se adicionó 1µl de RT (Retrotranscriptasa Reversa). Se incubó nuevamente a 42°C/ 50 min y se inactivó a 70°C/10 min. El producto obtenido se cuantificó en Nanodrop.

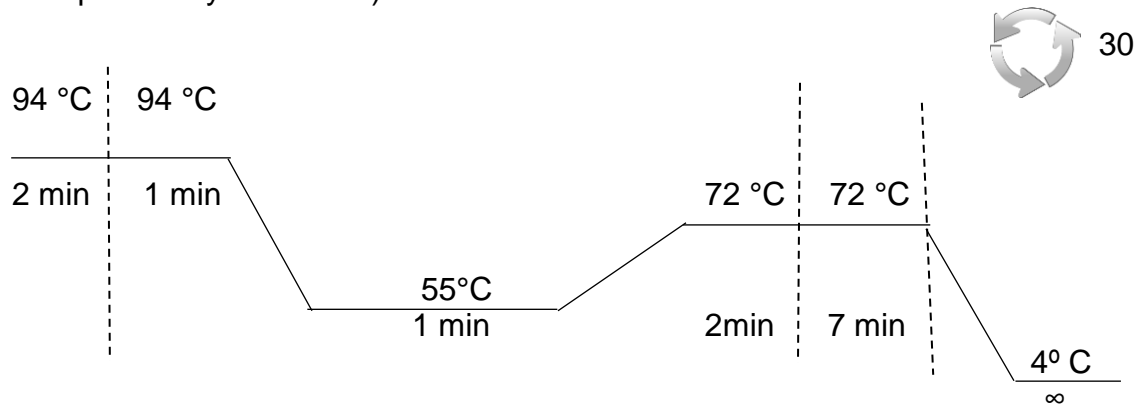
7.2.6 Amplificación por PCR semicuantitativa

Los oligonucleótidos se diseñaron específicos para la secuencia de *tvrads1*. A partir de DNAg se realizó una PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) para un volumen final de 25 μ l con las siguientes condiciones (12. 5 μ l de Máster Mix (Sigma aldrich: 11636103001), 10 pmol del oligonucleótido sentido, 10 pmol del oligonucleótido anti sentido, 100 ng de cDNA y 9.5 μ l de Agua).

Los iniciadores para el análisis del RNAm de *tvrads1* fueron los siguientes:

Sentido: 5'-CGGGATCCCGATGGATACTGAAGT-3' Long: 24 nt. TM: 55.7 °C
Antisentido: 5'-CCCAAGCTTGGGACTGATGCTGAATAA-3' Long: 27 nt TM: 60.8 °C
Amplicón: 990 pb

Se amplificó utilizando los siguientes parámetros para el termociclador (GeneAmp*PCR System 9700):

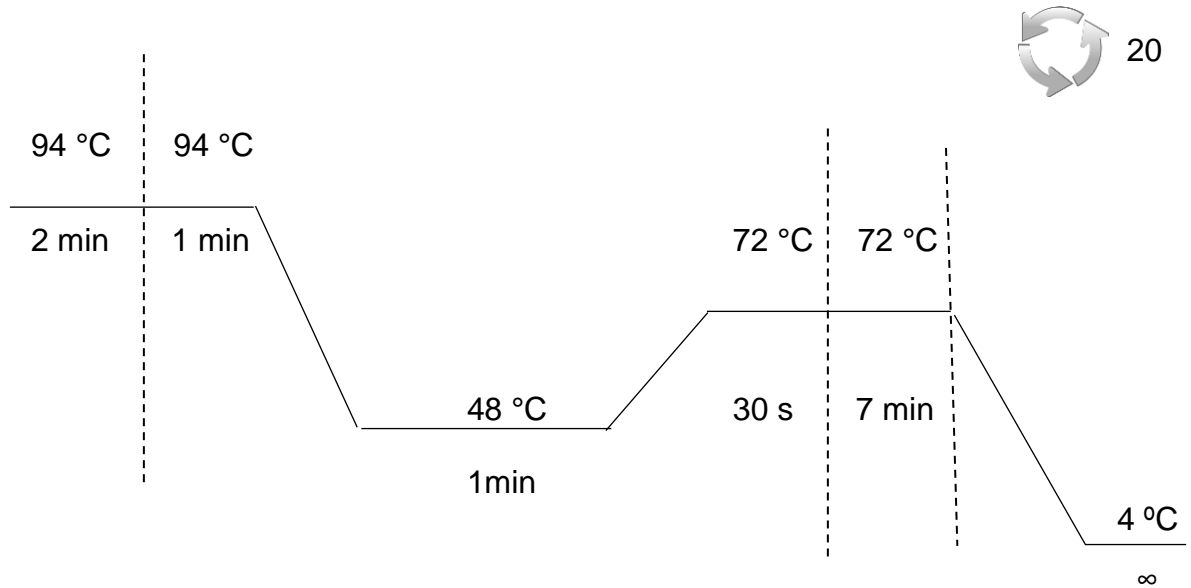


Como control de carga se utilizó la amplificación de la fracción de β -*tubulina*.

Iniciadores utilizados:

Sentido: TUB9 5' -CATTGATAACGAAGCTCCTTTACGAT- 3' Long: 26 nt. TM: 64.3 °C
Antisentido: TUB2 5' -GCATGTTGTGCCGGACATAACCAT- 3' Long: 24 nt.TM: 68.8 °C
Amplicón: 112 pb

Parámetros para la amplificación:



Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñido con GelRed® (Biotium). Para el análisis densitométrico se midió la intensidad de píxeles de cada una de las bandas obtenidas en cada condición utilizando el programa Image Lab de Bio-Rad v6.1(Bio-Rad Laboratories, Inc). La medición se efectuó considerando como valor de 1 la expresión del gen *tvrAD51* en la condición normal y los datos se normalizaron con respecto a la expresión del gen β -*tubulina*.

7.3 Identificación de TvRAD51 en *T. vaginalis*

7.3.1 Extracción de proteínas totales del aislado HGMN01 de *T. vaginalis* en condiciones normales, bajo tratamiento con luz UV-C y presencia de cationes Zn^{2+} o Cd^{2+} por precipitación con ácido tricloroacético (TCA al 10%).

A partir de 20×10^6 parásitos del aislado HGMN01 de *T. vaginalis*, que fueron crecidos en condiciones normales, y parásitos expuestos a los tratamientos, se centrifugaron a 1800rpm / 5min / 4°C y se lavaron tres veces con 1ml de PBS pH 7 frío. Se resuspendió la pastilla en 900 μ l de PBS pH7 frío y 100 μ l de TCA al 10%, se homogeneizó por inversión durante 10 segundos y se incubaron a 4°C/18h. Finalizado el tiempo de incubación, se centrifugó a 13 000 rpm / 5 min / 4°C y la pastilla se lavó 5 veces con PBS pH 7 frío. La pastilla se resuspendió en 400 μ l de Buffer de Muestra (BM) 1x con

5% de β -mercaptoetanol, se hirvió 3 min y se centrifugó a 13 000/5 min/4°C para eliminar el material no solubilizado. Posteriormente, se cargaron 15 μ l/carril de los extractos de proteínas totales obtenidos de cada condición en dos geles de poliacrilamida al 15%.

La electroforesis se realizó a 80 volts a temperatura ambiente, se transfirió uno de los geles a una membrana de nitrocelulosa de 0.22 μ m (Merck millipore) a 20 volts / 40 min. Se tiñó con Rojo de Ponceau para corroborar la eficiencia de la transferencia. Posteriormente se realizaron cinco lavados de 10 minutos cada uno con PBS-Tween 20 al 0.1% y se bloqueó la membrana con leche (Svelty) al 5% disuelta en PBS-Tween 20 al 0.1% en agitación constante a 4°C/ON.

Se realizaron 5 lavados con 10 ml de PBS-Tween 20 al 0.1 % cada 10 min, se incubó a 4°C/ON con el anticuerpo monoclonal α -RAD51 (3C10): sc-53428 (Santa Cruz Biotechnology) a una dilución 1:500 en un volumen final de 3 ml de PBS-Tween 20 al 1%.

Después de la incubación, se realizaron cinco lavados con PBS-Tween 20 al 0.1% cada 10 min seguido de la incubación a temperatura ambiente durante 2 horas con el anticuerpo secundario policlonal α -IgG de ratón (H+L) conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (115-035-062, Jackson Immuno Research Laboratories, INC.) a una dilución 1:3000 en leche Swelty al 2.5% en PBS-Tween 20 al 0.1% protegido de la luz. Posteriormente, se realizaron cinco lavados con 10 ml de PBS-Tween 20 al 0.1% cada 10 min y se reveló por quimioluminiscencia (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo SCIENTIFIC) utilizando el equipo ChemiDoc de Bio-Rad. Para el análisis densitométrico se midió la intensidad de pixeles de cada una de las bandas obtenidas en cada condición utilizando el programa Image Lab de Bio-Rad. La medición se efectuó considerando como valor de 1 la expresión de la proteína TvRAD51 en la condición normal y los datos se normalizaron con respecto a la expresión de la proteína β -tubulina.

8. RESULTADOS

8.1 Análisis *in-silico*

8.1.1 Análisis de secuencias (búsqueda de secuencias, alineamientos, motivos y dominios)

Al realizar la búsqueda del gen *rad51* de *T. vaginalis* (*tvrad51*) en la base de datos TrichDB, se obtuvieron dos entradas como resultado: TVAG_204070 y TVAG_021820. El ID TVAG_204070 corresponde a un gen localizado en el Contig DS114121 de la cadena de DNA que va en dirección 5'→3'.

El gen *tvrad51* tiene una longitud de 990 pb, su posición en el genoma va de 9677 a 10666 pb y está flanqueado por un gen parálogo de una transposasa tipo mariner y un gen que codifica una proteína hipotética conservada (**Figura 4A**). El ID TVAG_021820 corresponde a un pseudogen duplicado parcialmente de *tvrad51* (**Figura 5**) (*tvrad51-1*), el cual se encuentra en el Contig DS113200 de la cadena de DNA que va en dirección 3'→5'. *tvrad51-1* tiene una longitud de 348pb, su localización es de la posición 221473 a 221820 pb y está flanqueado por un gen parálogo de la recombinasa específica de meiosis DMC1 (*tvdmc1-p*) y una proteína hipotética conservada (**Figura 4B**). La proteína codificada por el *tvdmc1-p* tiene una longitud de 153 aa y un peso molecular de 17 kDa.

También se encontró el gen que codifica a la recombinasa DMC1 (*tvdmc1*) (**Figura 4C**), identificado con el ID TVAG_155030. Este gen se localiza en el Contig DS114127 de la cadena negativa, su longitud es de 1017 pb, su localización es de la posición 12574 a 13590 y está flanqueado por un gen que codifica una proteína hipotética conservada y un gen que codifica para una hipotética proteína homóloga a la maltasa glucoamilasa. *tvdmc1* codifica para la proteína TvDMC1 que consta de 338 aa y un peso molecular de 37 kDa.

Identificamos las proteínas ortólogas a HsRAD51 en *T. vaginalis*, *A. castellanii*, *E. histolytica*, *G. lamblia*, *L. mexicana*, *N. fowleri*, *P. falciparum* y *T. brucei* mediante BLAST. En todos los organismos, se obtuvo una cobertura con la secuencia Query (HsRAD51) mayor al 90% y las identidades están por encima del 50% (**Tabla 2**).

Al realizar la búsqueda de motivos y dominios presentes en la proteína RAD51 de *T. vaginalis* (TvRAD51) (**Figura 8A**) y compararla con los motivos y dominios de las proteínas RAD51 de otros organismos (**Figura 8B-J**), se observa que TvRAD51 comparte un dominio central altamente conservado desde bacterias hasta el humano que consta de aproximadamente 230 aa y recibe el nombre de dominio RECA / DMC1 / RAD51 (IPR033925) y se ha descrito como dominio ATPasa (Yu y cols., 2001). Este dominio está dividido en dos subdominios: RECA_2 (PS50162) y RECA_3 (PS50163). En el subdominio RECA_2, TvRAD51 contiene los motivos Walker A, Walker B y loop1, y en el RECA_3 el motivo loop2, también contiene en el extremo N-terminal el dominio HhH_5 que portan las RAD51.

Esta proteína también presenta una firma que caracteriza a muchos plegamientos de proteínas homologas de unión a nucleótidos denominado P-loop (bucle P) (IPR027417) que abarca la mayor parte de los subdominios RECA_2 y RECA_3, formando una superfamilia homóloga donde se incluye a las recombinasas DMC1 y RAD51 (IPR011941). Además, las RAD51 presentan un dominio en el extremo N-terminal poco caracterizado llamado DNA_repair_Rad51/TF_NusA_a-hlx (IPR010995) que aparece en otras proteínas en el extremo C-terminal, por lo que también se le conoce como subdominio C-terminal de exonucleasas 5' a 3' (5' to 3' exonuclease, C-terminal subdomain, HhH_5) constituido por hélices alfa con un motivo clásico HhH (helix-hairpin-helix) y un pseudo HhH (**Figura 8**).

Al realizar la representación esquemática de la proteína TvRAD51 codificada por el pseudogen *tvrad51-1*, observamos que tiene una longitud de 115 aminoácidos. En el N-terminal presenta el dominio HhH_5 y un fragmento del subdominio RECA_2 sin los motivos Walker A y Walker B, y no contiene el subdominio RECA_3 (**Figura 6**).

En el alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de RAD51 (**Figura 7**) de *S. cerevisiae*, *H. sapiens*, *T. vaginalis* y otros parásitos protozoarios, encontramos 86 residuos de aminoácidos conservados. Se identificaron, el dominio N-terminal HhH_5, el motivo β -zip, los subdominios RECA_2 (conteniendo los motivos Walker A, Walker B y loop1) y RECA_3 (conteniendo gran parte del motivo loop2) en todas las proteínas RAD51 incluidas en el alineamiento. Interesantemente, identificamos en TvRAD51, GIRAD51, NfRAD51 y TbRAD51 un cambio puntual de Serina por Prolina en la posición correspondiente al residuo de aminoácido 231 de ScRAD51. Este cambio se ha visto relacionado con la interrupción de la interacción de ScRAD51 con ScRAD54 in vitro (Rivera-Martínez, 2007).

8.1.2 Valoración de los modelos generados por homología

El modelo de TvRAD51 obtenido por homología en el software Phyre² se realizó de los residuos 80 a 329 de la secuencia de la proteína RAD51 de *T. vaginalis*. Tuvo un 72% de identidad y un valor de RMSD (por sus siglas en inglés *root mean square deviation*: raíz de la desviación cuadrática media de las posiciones atómicas) de 0.324 Å con el modelo templado (PDB: 5NWL: Estructura cristalina de un filamento de RAD51-ATP de *H. sapiens*) (**Figura 9A**). El modelo de TvRAD51 obtenido por homología en Swiss-Model se realizó de los residuos 11 a 329 de la secuencia de la proteína RAD51 de *T. vaginalis*. Este modelo tuvo un 71% de identidad y un valor de RMSD de 0.865 Å con el modelo templado (PDB: 5NWL) (**Figura 9B**). El modelo obtenido en Swiss-Model fue el que se utilizó en los análisis posteriores puesto que contempla una mayor cantidad de residuos y el valor de RMSD es mayor que el del modelo obtenido en Phyre².

La validación de los modelos por homología de las estructuras terciarias de las recombinasas TvRAD51, TvRAD54 y TvDMC1 mediante gráficos de Ramachandran, muestran más del 80% de los residuos de aminoácidos en las regiones más favorables, mientras que en las regiones permitidas adicionales se encontró entre el 9 y 14% de los residuos (**Figura 11**). Estos porcentajes fueron parecidos a los obtenidos en la validación de la estructura obtenida por difracción de rayos X de la recombinasa HsRAD51 (**DOI:** [10.2210/pdb5NWL/pdb](https://doi.org/10.2210/pdb5NWL/pdb)), que presentó el 81.8% de residuos en las

regiones más favorables y 14.3% en las regiones permitidas adicionales. Por otra parte, la validación de la estructura terciaria de ScRAD51 (**DOI: [10.2210/pdb3LDA/pdb](https://doi.org/10.2210/pdb3LDA/pdb)**), mostró un 91% de residuos en las regiones más favorables y 8.4% en las regiones permitidas adicionales (**Figura 11, tabla 3**).

Al comparar los modelos de las recombinasas ScRAD51 (**DOI: [10.2210/pdb3LDA/pdb](https://doi.org/10.2210/pdb3LDA/pdb)**) y HsRAD51 (**DOI: [10.2210/pdb5NWL/pdb](https://doi.org/10.2210/pdb5NWL/pdb)**), se observa que tienen un plegamiento muy similar, obteniendo un valor RMSD de 1.017 Å (**Figura 12**).

Al realizar la representación esquemática del modelo tridimensional de TvRAD51 obtenido en Swiss-Model, observamos que esta estructura conserva la arquitectura clásica de una proteína RAD51 de eucariontes: el extremo N-terminal tiene un dominio de unión a DNA compuesto de hélices- α , de la $\alpha 1$ a la $\alpha 2$ para la estructura modelada con Phyre² y de la $\alpha 1$ a la $\alpha 8$ en la estructura modelada en Swiss-Model. El motivo Walker A tiene una estructura conformada por la hebra- β 1 –loop– hélice- α 10 (**Figura 14**), el motivo Walker B se localiza en la hebra- β 3 y el motivo de polimerización β -zip se encuentra en el loop que une a la $\alpha 6$ con la $\alpha 7$ (**Figura 15**).

8.1.3 Análisis de la región de unión de TvRAD51 a DNA

De los dockings moleculares realizados de la proteína TvRAD51 con adenina, timina, citosina, guanina, y dCMP se obtuvieron 43, 42, 44, 45 y 36 predicciones, respectivamente. De cada docking, se utilizaron las 20 mejores predicciones de acuerdo a los valores de Fullfitness: la energía libre de Gibbs del 30% de los mejores sitios de unión ligando-proteína (**Tabla 4**).

Al visualizar los clústers de las mejores predicciones en el software Chimera 1.14, encontramos que la probable región de enlace a DNA de TvRAD51 incluye a los residuos de aminoácidos de las posiciones 12 a 39, que corresponden al dominio HhH_5 del N-terminal, los residuos 119 a 123, que se localizan en el motivo Walker A y los residuos 271 a 288 que forman parte del loop 2 (**Figura 16**). Por otra parte, al analizar la estructura del complejo HsRAD51 presináptico (PDB: 5H1B), se observa que la proteína HsRAD51 se une al DNA mediante el loop 1 y el loop 2 (**Figura 17**).

8.1.4 Análisis de interacción de redes de la proteína TvRAD51

Al realizar la búsqueda de las redes de interacción de las proteínas putativas involucradas en el mecanismo de RH en *T. vaginalis*, con excepción de TvRAD51 que comparte suficiente identidad con otras RAD51, se encontraron algunos genes que podrían codificar para las siguientes proteínas: RAD50, RAD54, MRE11, XRCC3, RPA, BRCA1, BRCA2, ATM o PIKK, XCRR2 y EXO1. Se obtuvo que TvRAD51 tiene una identidad del 71% con la recombinasa HsRAD51, mientras que la identidad con EhRAD51 es de 65%. Para TvDMC1 una identidad del 56 y 62% respectivamente con HsDMC1 y EhDMC1. Las restantes proteínas putativas en *T. vaginalis* identificadas tienen identidades bajas con sus homologas de *H. sapiens* y *E. histolytica* (26-42) sin embargo, las anotaciones de las bases de datos sugieren que estas son las proteínas ortólogas de *T. vaginalis* respecto a *H. sapiens* (**Tabla 5**).

Al analizar las redes de interacciones directas (físicas) e indirectas (funcionales) entre TvRAD51 y otras proteínas que podrían estar involucradas en el mecanismo de recombinación homóloga (**Figura 20**), encontramos que, hay evidencias experimentales de que proteínas homólogas a TvRAD51 interactúan con las proteínas RAD50, MRE11, RPA, PIKK, DMC1, BRCA2, XRCC3 y EXO1 (Jones y cols., 2014; Hinch y cols., 2020; Syed y Tainer, 2018). Además, también se identifica a TvRAD51, TvDMC1 y TvXRCC3 como proteínas homólogas que se co-expresan y se puede predecir su interacción por la co-ocurrencia de los genes que las codifican. Por otra parte, se observa que TvRAD54 y TvBRCA1 no interactúan con ninguna de las proteínas que podrían formar parte del mecanismo de RH en *T. vaginalis*. El resultado del *docking* molecular entre el modelo por homología de la proteína TvRAD51 y TvRAD54 (**Figura 21**) mostró que no hay interacción entre ellas.

Por otra parte, el *docking* molecular entre TvRAD51 y TvDMC1 (**Figura 22**), mostró una probable interacción física entre estas recombinasas, aunque también podría tratarse de la interacción de TvRAD51 con alguna proteína asistente de la familia RAD51/DMC1 como la proteína homóloga a DMC1/LIM15 (TVAG_155030) presente en *T. vaginalis*.

Al realizar la sobreposición estructural del filamento de TvRAD51 en la estructura del complejo pre-sináptico de HsRAD51 (DOI: [10.2210 / pdb5H1B / pdb](https://doi.org/10.2210/pdb5H1B/pdb)) (**Figura 19**), se observó que TvRAD51 puede unirse a ssDNA de manera similar a HsRAD51 (probablemente a través de los loop1). Es probable que TvDMC1 pueda interactuar con TvRAD51 durante la formación del complejo presináptico de RH en *T. vaginalis* (**Figura 29**) ayudando a la estabilización del filamento de TvRAD51 o formando filamentos mixtos TvRAD51/TvDMC1. De acuerdo con los resultados de BLASTp y STRING, se propone la maquinaria de reparación de daño al DNA por recombinación homóloga en *T. vaginalis* (**Figura 23**).

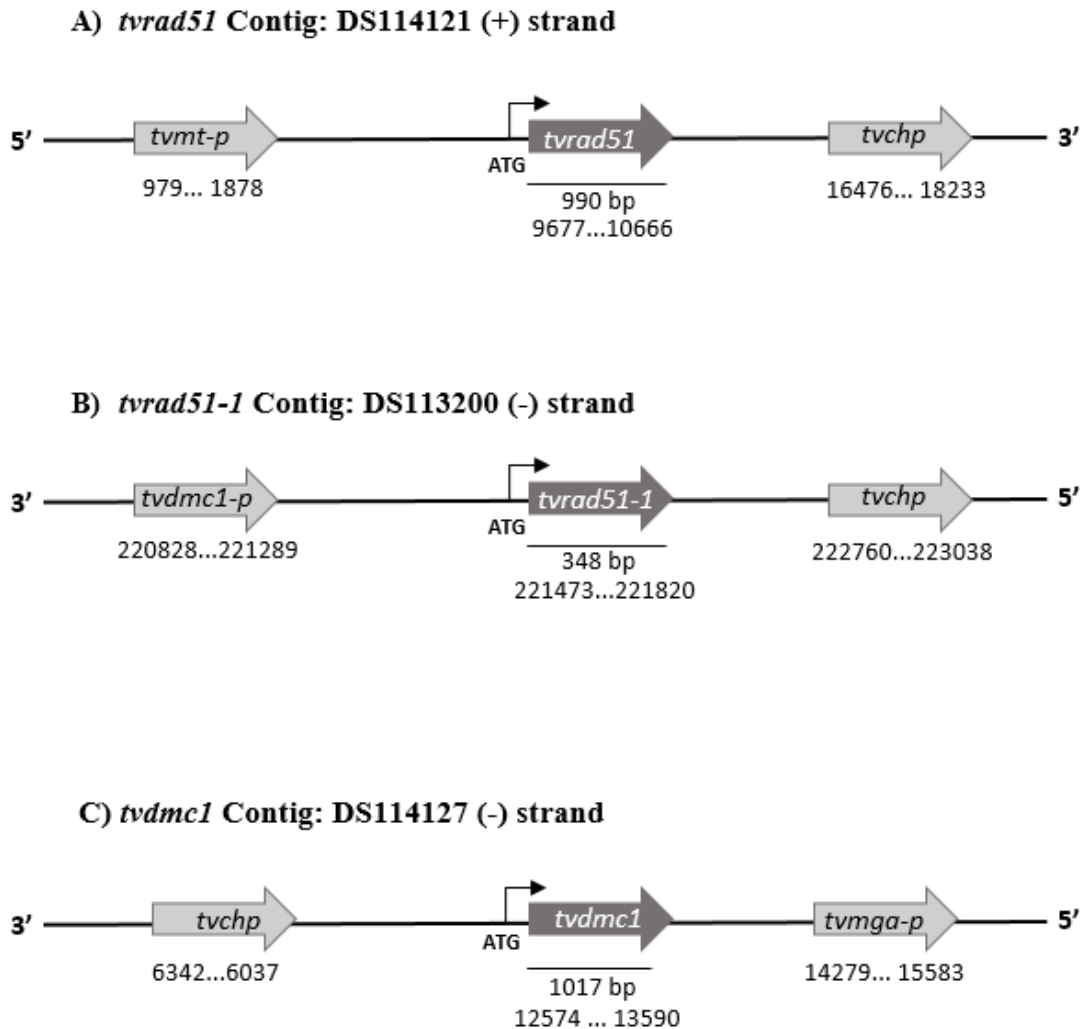


Figura 4. Localización genómica del gen *tvrad51*, el pseudogen *tvrad51-1* y el gen *tvdmc1*. **A. *tvrad51*:** Está presente en el Contig DS114121 de la cadena positiva, su longitud es de 990 pb, su localización es de la posición 9677 a 10666 y está flanqueado por un gen parálogo de una proteína transposasa tipo mariner (*tvmt-p*) y un gen que codifica una proteína hipotética conservada (*tvchp*). **B. *tvrad51-1*:** Está presente en el Contig DS113200 de la cadena negativa, su longitud es de 348 pb, su localización es de la posición 221473 a 221820 y está flanqueado por un gen parálogo de la recombinasa dmc1 (*tvdmc1-p*) y un gen que codifica una proteína hipotética conservada (*tvchp*). **C. *tvdmc1*:** Está presente en el Contig DS114127 de la cadena negativa, su longitud es de 1017 pb, su localización es de la posición 12574 a 13590 y está flanqueado por un gen que codifica una proteína hipotética conservada (*tvchp*) y un gen parálogo de una proteína maltasa glucoamilasa (*tvmga-p*)

CLUSTAL O (1.2.4) multiple sequence alignment

tvrad51-1 348pb
tvrad51 990pb

```

tvrad51      -----ATGGATACTGAAGTTGCTCAGGAAGGTGCAGCAGGACCACTTTGA 46
tvrad51-1    ATGGGAAGTCACAACCTCAGACACAGCAGACTCAG---AGTGGTCCAACCCTTCTTTCCG 57
              *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
              *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

tvrad51      TACAACACCTTAGCAAGGTATTGCTGAGATATCAAAAACTCCAAGAAGCTGGCTACAAT 106
tvrad51-1    CTGGAGCAGCAAGGTATTGCTGCGGAGATATCAAAAACTTCAAGAAGCGGATACAAT 117
              *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

tvrad51      ACCGTACAATCTGTTGCTTTCAAGAAG-----CAGCTTATTATCAAAGGTATCTCT 158
tvrad51-1    ACAGTTGAATCCATAGCTTTTACAACCAAAAACTACTAGTTGCAGTTAAAGGCATATCA 177
              ** *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

tvrad51      GAAGCCAAAGCAGATAAAATCATGGCCGCTGCTGCCAGCTTATGGGTTTT-----GC- 212
tvrad51-1    GAAGCTAAAGCAGATAAGATTATGGCAGCTGCAGCAGCACTTGTCCAATGGGATTTGCT 237
              *****  *****  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

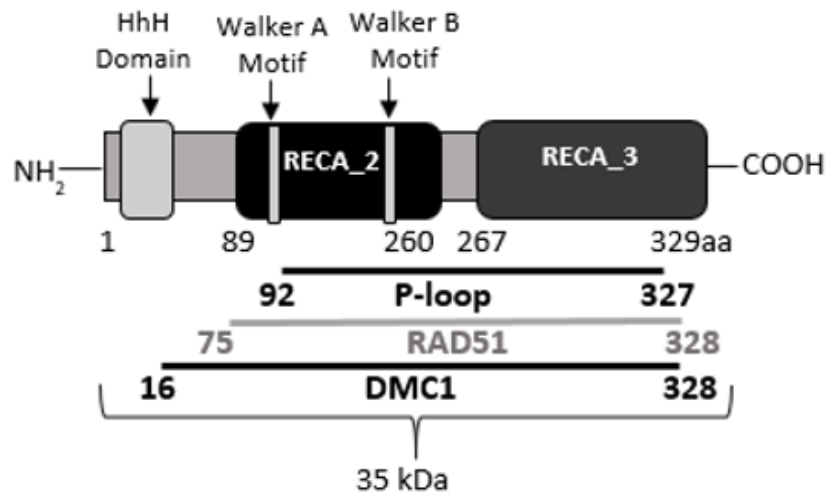
tvrad51      --TTCTTCGACTACAACCAAATTCGAAAGGAGATGGTATATCTTACAACAGGTCCACA 270
tvrad51-1    TCTGCCACAGATTATAATCAAATCAGAAAAGAAATGGTATATCTTCTACAGGATCCTCC 297
              *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

tvrad51      AACTCGGTA-----TCGAAACAGGCTCTGTTACAGAAATATTCGGT 311
tvrad51-1    GAATTAGATAAATTACTCGGAGGAGGTATCAAAACAGGCTCAGTTACATAA----- 348
              *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

```

Figura 5. Alineamiento de la secuencia del gen *tvrad51* y el pseudogen *tvrad51-1*. Cajas negras: nucleótidos conservados. Los números a la derecha son relativos a la posición inicial en cada secuencia.

A) TvRAD51



B) TvRAD51-1

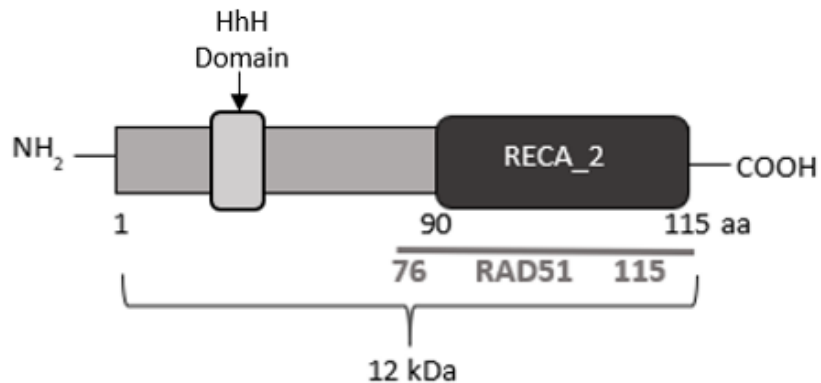


Figura 6. Representación esquemática de las proteínas TvRAD51 codificadas por el gen *tvrad51* y el pseudogen *tvrad51-1*. Los números debajo de cada representación esquemática indican el tamaño en aminoácidos (aa) de cada proteína. Entre corchetes se indica el peso molecular (kDa). **A)** representación esquemática de la proteína TvRAD51 codificada por el gen (número de acceso TrichDB: TVAG_204070). **B)** representación esquemática de la proteína TvRAD51 codificada por el pseudogen (número de acceso TrichDB: TVAG_021820).

Tabla 2. Proteínas ortólogas a HsRAD51 de *H. sapiens* en parásitos protozoarios.

Proteína	HSRAD51 ID GENBANK: NP_002866.2		
	Query Cover (%)	e-value	Identidad (%)
ScRAD51 ID GENBANK: CAA45563.1	98%	5e - 165	67%
TvRAD51 ID TRICHDB: TVAG_204070	96%	4e -176	71%
AcRAD51 ID GenBank: ACA1_201650	94%	0.0	83%
EhRAD51 ID AmoebaDB: EHI5A_123500	93%	3e -165	70%
GIRAD51 ID GiardiaDB: DHA2_13104	93%	3e - 117	55%
LmRAD51 ID TriTrypDB: LmxM.28.0550	95%	2e -159	72%
NfRAD51 ID AmoebaDB: NF0007900	95%	2e -138	61%
PfRAD51 ID PlasmoDB: PF3D7_1107400	95%	2e -149	65%
TbRAD51 ID TriTrypDB: Tb427_090054300	92%	2e -129	58%

Figura 7. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de RAD51 en parásitos protozoarios, *S. cerevisiae* y *H. Sapiens*

Los números a la derecha indican la posición. Los guiones indican gaps introducidos para maximizar la similitud. Con espirales y flechas se representa la estructura secundaria de ScRAD51 previamente identificada experimentalmente ([DOI: 10.2210/pdb3LDA/pdb](https://doi.org/10.2210/pdb3LDA/pdb)). Los espirales rojos representan los residuos de aminoácidos que se sabe que tienen conformación de α -hélice; en verde y con flecha, se representan las hebras B-plegadas y de negro se muestran los residuos que forman coils. En la caja verde se indica el subdominio RECA_2 y en la caja roja el subdominio RECA_3. Los residuos de aminoácidos en azul representan los motivos Walker A y Walker B. Los residuos que corresponden al dominio HhH se encuentran dentro del caja color negro, en rosa se señala el loop 1 y el loop2, la caja morada indica el dominio β -zip y los residuos sombreados en amarillo son los residuos catalíticos del dominio ATPasa. En cada motivo y dominio se identifican los residuos catalíticos. (*) secuencias idénticas, (.) mutaciones puntuales en donde se conservan las propiedades bioquímicas pero el residuo cambia. En amarillo se muestran los residuos hidrofóbicos críticos para la formación del nucleofilamento de RAD51. Con flechas de colores se muestran las mutaciones que afectan las interacciones proteína-proteína: las que interrumpen la interacción con RAD54 se muestran en azul; en rojo con RAD52; negro con RAD54 y RAD52 simultáneamente; en verde con RAD54 y RAD55 simultáneamente; las amarillas son mutaciones que incrementan significativamente la interacción con RAD51.

CLUSTAL O (1.2.4) multiple sequence alignment

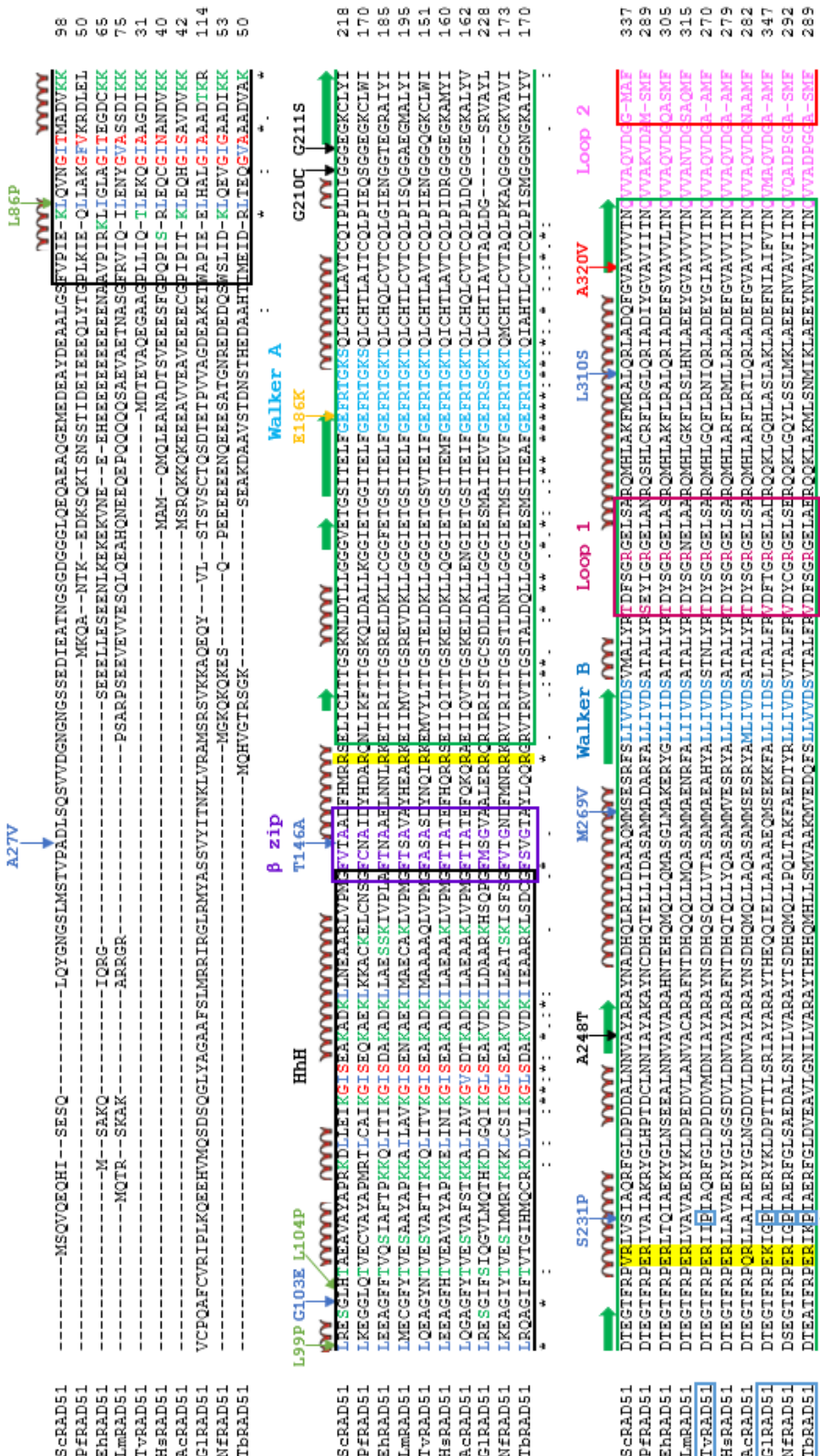
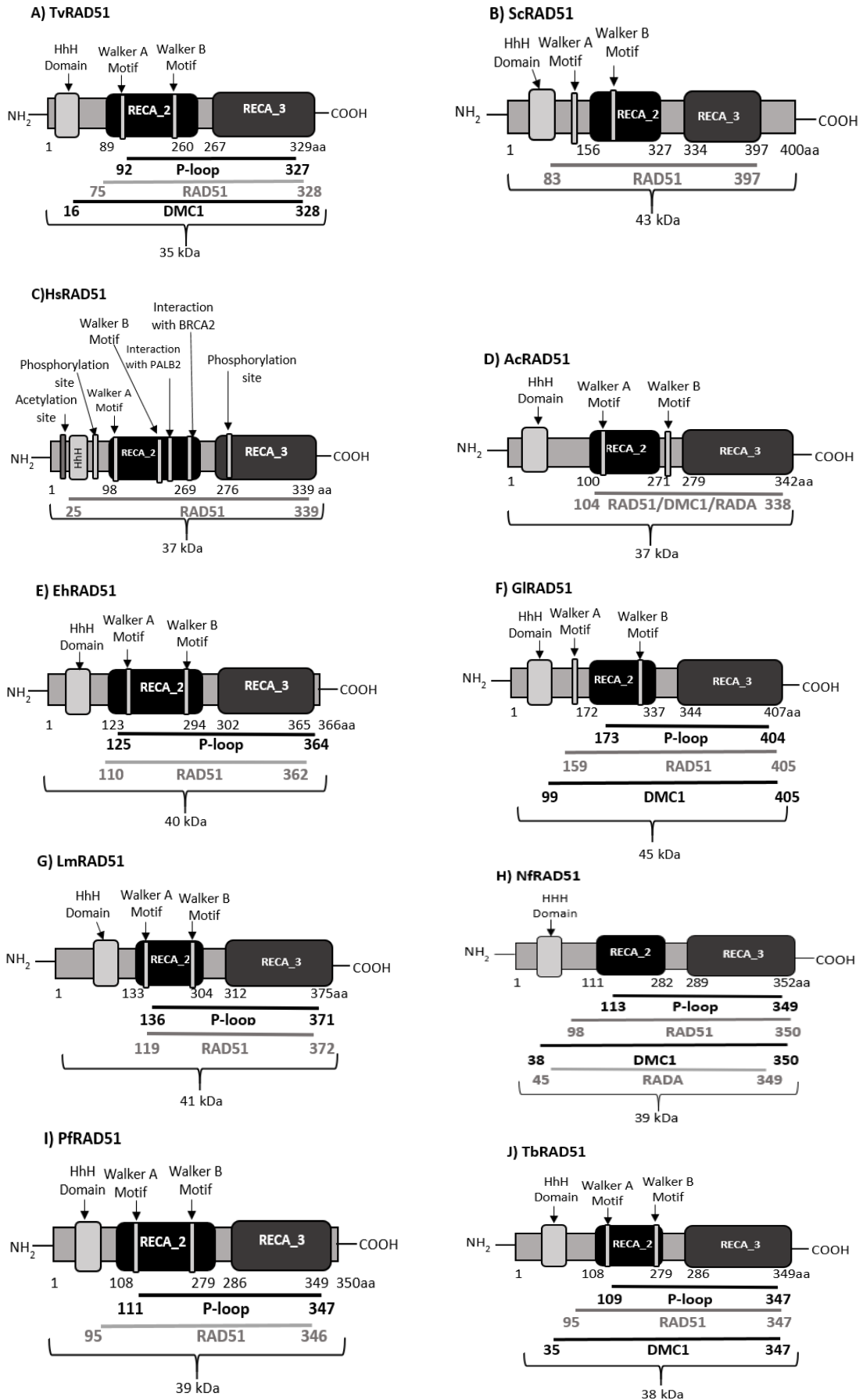


Figura 8. Representación esquemática de la proteína RAD51 de *T. vaginalis*, *H. sapiens*, *S. cerevisiae* y otros parásitos protozoarios. Los números debajo de cada representación esquemática indican el tamaño en aminoácidos (aa) de cada proteína. Entre corchetes se indica el peso molecular (kDa). A) TvRAD51 presenta los subdominios RECA_2 y RECA_3, así como la región denominada recombinasa RAD51, el dominio Helix-Loop-Helix (HhH) en el extremo N-terminal y los motivos Walker A y Walker B. Estos motivos y dominios los comparte con las demás proteínas RAD51 mostradas en esta imagen. B) ScRAD51 y D) AcRAD51 son la estructura RAD51 más simple. C) HsRAD51 tiene dos sitios de fosforilación (uno cerca de un sitio de acetilación en el extremo N-terminal, y otro dentro del dominio RECA_3), también tiene regiones de interacción con PALB2 y BRC2 ubicadas en el dominio RECA_2. A), E) EhRAD51, F) GIRAD51, G) LmRAD51, H) NfRAD51, I) PfRAD51 y J) TbRAD51 tienen un bucle P que contienen las nucleósido trifosfato hidrolasas. (A, F, H y J) tienen una región denominada recombinasa DMC1. H) es la única especie que contiene una región de recombinasa RADA.



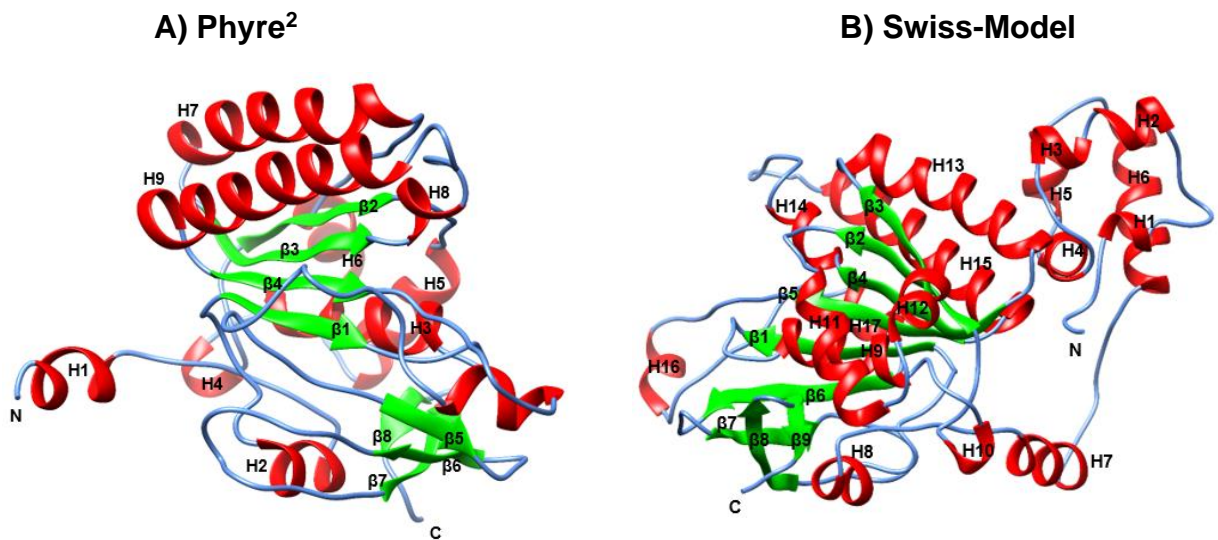
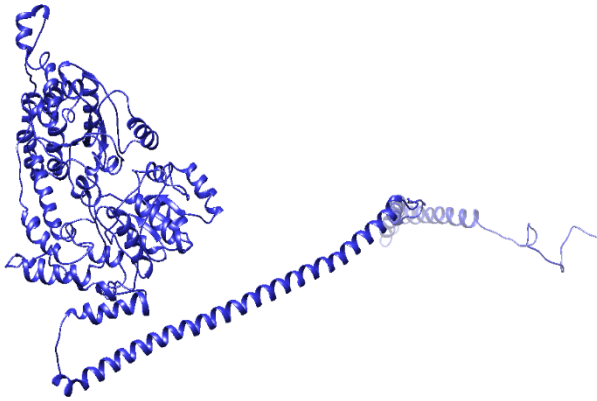


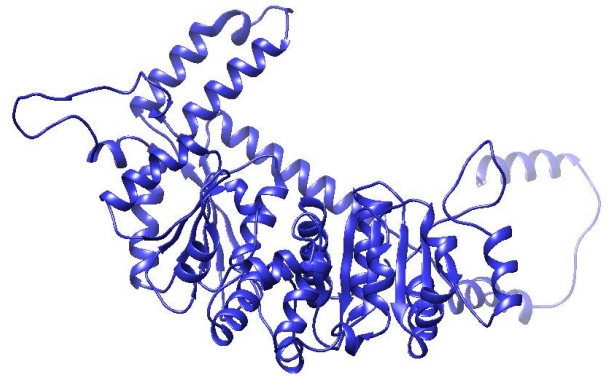
Figura 9. Modelado por homología de la estructura tridimensional de la proteína TvRAD51. Estructura modelada en A) Phyre² y B) Swiss Model. Ambos softwares utilizaron como molde a la proteína HsRAD51 (5NP7).

TvRAD54

A) Phyre²



B) Swiss-Model



TvDMC1

C) Phyre²



D) Swiss-Model



Figura 10. Modelado por homología de la estructura tridimensional de la proteína TvRAD54 y TvDMC1. Estructura de TvRAD54 modelada en A) Phyre² y B) Swiss Model (ambos modelos utilizaron como molde el archivo PDB 3MWY: Estructura cristalina de la porción cromodominio-ATPasa del remodelador de cromatina de levadura Chd1). Estructura de TvDMC1 modelada en C) Phyre² y D) Swiss Model (ambos modelos utilizaron como molde el archivo PDB 5NP7: Estructura CryoEM de Human RAD51 en DNA monocatenario).

Figura 11. Gráficos de Ramachandran. Se muestran los ángulos de torsión Phi y Psi para todos los residuos de cada una de los modelos obtenidos por homología. **A)** estructura tridimensional de TvRAD51 obtenida en Swiss-Model, **B)** estructura tridimensional de TvRAD51 obtenida en Phyre², **C)** estructura de ScRAD51 (**DOI: [10.2210/pdb3LDA/pdb](https://doi.org/10.2210/pdb3LDA/pdb)**), **D)** estructura de HsRAD51 (**DOI:10.2210/pdb5NWL/pdb**), **E)** estructura de TvRAD54 obtenida en Swiss-Model, **F)** estructura de TvRAD54 obtenida en Phyre², **G)** estructura de TvDMC1 obtenida en Swiss-Model, **H)** estructura de TvDMC1 obtenida en Phyre². Los residuos de glicina se identifican por separado mediante triángulos, ya que no están restringidos a las regiones de la gráfica apropiadas para los otros tipos de cadenas laterales. Las áreas de color rojo corresponden a las regiones “centrales” que representan las combinaciones más favorables de valores Phi-Psi, las áreas de color amarillo oscuro representan las áreas permitidas adicionales, las áreas amarillo claro son las regiones generosamente permitidas y las áreas blancas representan las combinaciones desfavorables de valores Phi-Psi.

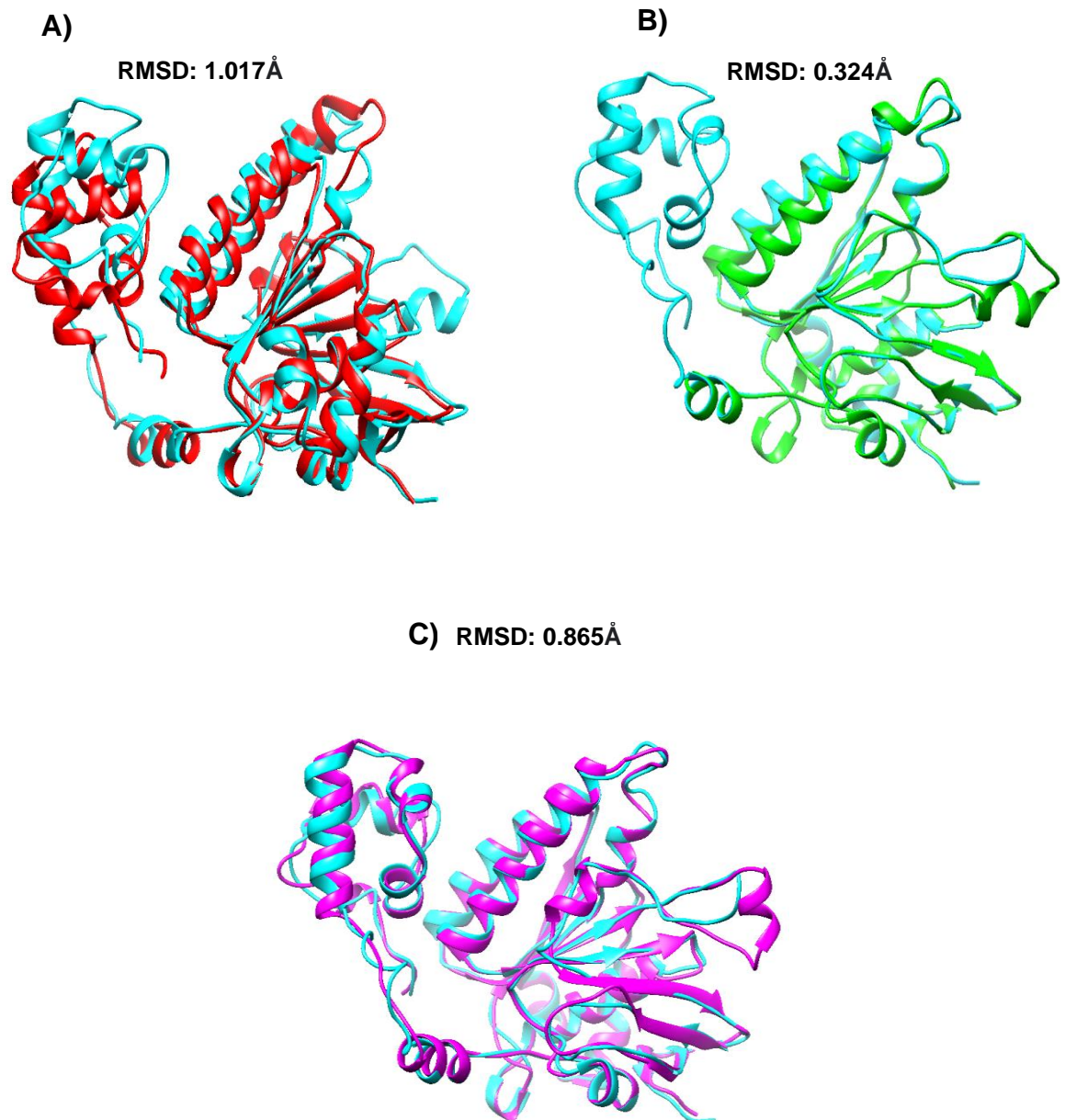
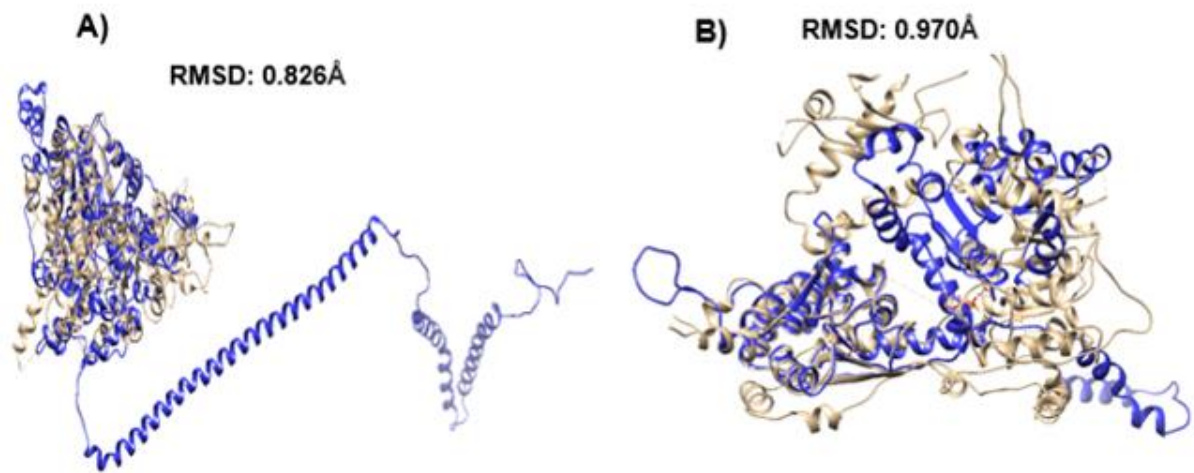


Figura 12. Comparación de la estructura tridimensional de las proteínas RAD51 de *H. sapiens*, *S. cerevisiae* y *T. vaginalis*. A) Se muestran la sobreposición estructural de HsRAD51 (DOI:10.2210/pdb5NWL/pdb) (cian) con ScRAD51 (DOI: [10.2210/pdb3LDA/pdb](https://doi.org/10.2210/pdb3LDA/pdb)) (rojo), **B)** HsRAD51 (cian) con TvRAD51 modelada en Phyre² (verde) y **C)** HsRAD51 (cian) con TvRAD51 modelada en Swiss-Model (magenta).

TvRAD54



TvDMC1

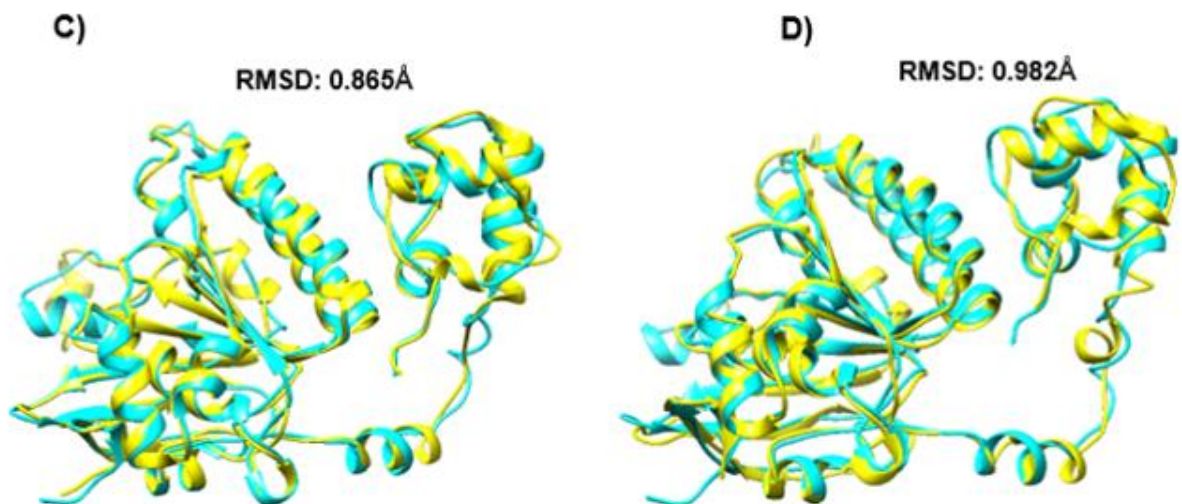


Figura 13. Evaluación de los modelos de TvRAD54 y TvDMC1 obtenidos por homología. Se muestra la sobreposición estructural del modelo templado ScCHD1 (PDB: 3mwy) (café) con el modelo de TvRAD54 obtenido por homología (azul) en **A)** Phyre² y **B)** Swiss-Model. Se muestra la sobreposición estructural del modelo templado HsRAD51 (PDB: 5np7) (cian) con el modelo de TvDMC1 obtenido por homología (amarillo) en **C)** Phyre² y **D)** Swiss-Model.

Tabla 3. Valoración de los modelos de TvRAD51, TvRAD54 y TvDMC1 obtenidos por homología.

Modelo	TvRAD51 (PDB)		TvRAD54 (PDB)		TvDMC1 (PDB)		ScRAD51 (PDB: 3LDA)	HsRAD51 (PDB:5NWL)
Software	Phyre ²	Swiss Model	Phyre ²	Swiss Model	Phyre ²	Swiss Model	-	-
Modelo templado	5NWL		3MWY		5NP7		-	-
RMSD	0.324Å	0.865Å	0.826Å	0.970Å	0.865Å	0.982Å	-	-
Residuos modelados	80 a 329	11 a 329	12 a 820	185 a 708	11 a 329	21 a 335	-	-
Cobertura (%)	94.0%	97.0%	58.0%	61.0%	92.0%	94.0%	0.0%	0.0%
Identidad (%)	72.0%	71.0%	32.0%	56.0%	56.0%	62.0%	0.0%	0.0%
% Más favorables (A, B, L)	89.5%	83.3%	87.3%	83.2%	90.0%	89.5%	91.2%	81.8%
% Permitidas Adicionales (a, b, l, p)	9.0%	13.5%	10.4%	15.6%	8.9%	9.9%	8.4%	14.3%
% Generosamente Permitidas (~a, ~b, ~l, ~p)	1.4%	2.3%	1.6%	0.8%	0.0%	1.4%	0.4%	2.5%
% No permitidas	0.0%	0.9%	0.6%	0.4%	1.1%	0.0%	0.0%	1.4%
Residuos No glicina y No prolina (100%)	277	215	490	430	280	280	261	280

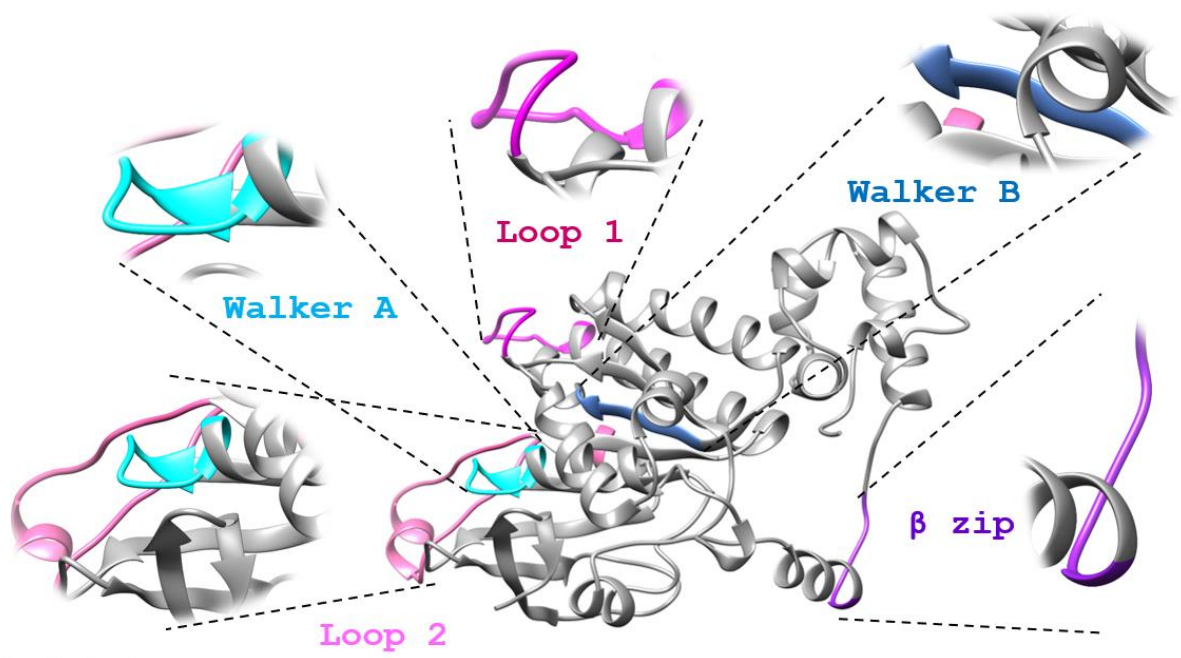
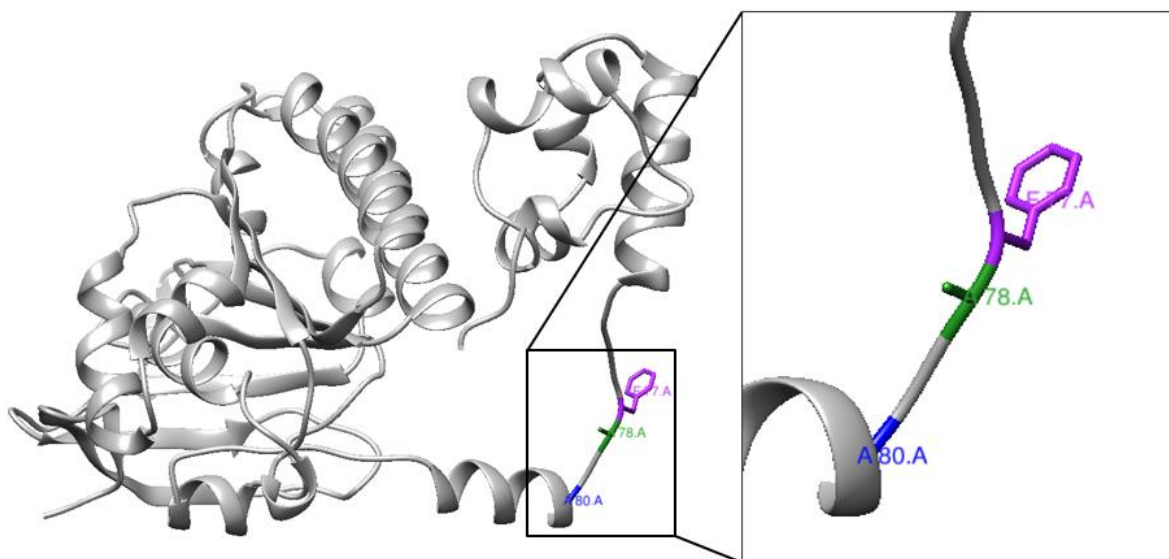


Figura 14. Motivos funcionales en la estructura de la proteína TvRAD51 modelada con Swiss-Model.

A) β -ZIP



B) LOOP 1

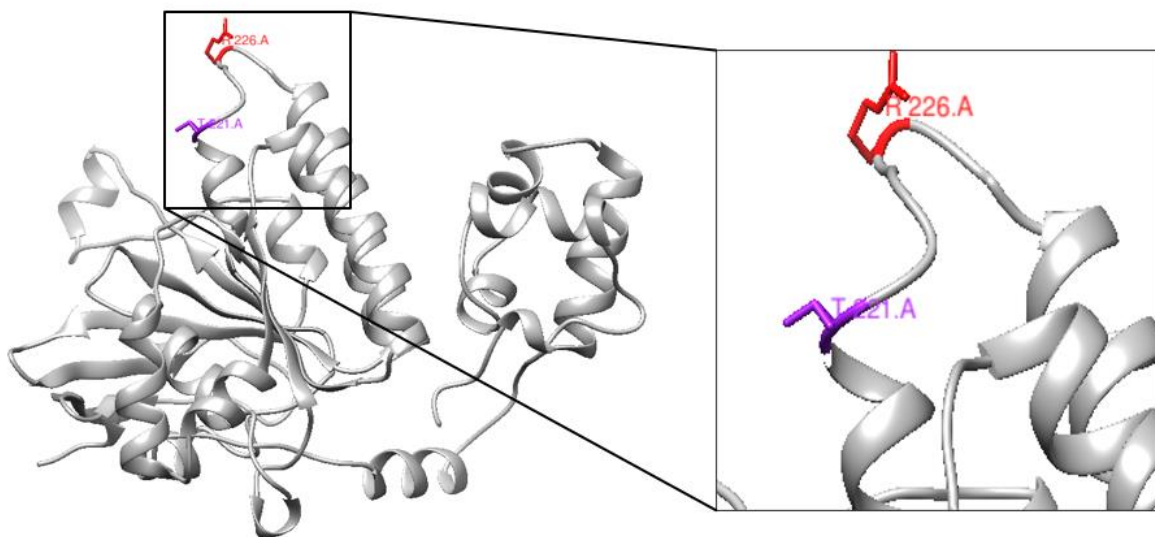


Figura 15. Motivos de polimerización en la estructura de la proteína TvRAD51 modelada con Swiss-Model. En zoom se muestran los residuos de aminoácidos catalíticos de A) β -zip (Phe77, Ala78 y Ala80) y B) Loop 1 (Thr221 y Arg226).

Tabla 4. Predicciones de Docking. Valores de Delta G (DG) y Fullfitness (FFN) de las 20 mejores predicciones

Proteína	Ligando	Numero de predicciones	Delta G (kcal/mol)	Fullfitness (kcal/mol)
TvRAD51	ADENINA	43	-7.80 a -8.18	-1,896.52 a -1,894.84
	TIMINA	42	-5.87 a -7.99	-1,899.72 a -1,888.48
	CITOSINA	44	-6.42 a -6.56	-1,922.92 a -1,921.67
	GUANINA	45	-8.04 a -8.65	-1,930.06 a -1,923.45
	desoxi-citidilato 5' monofosfato	36	-7.57 a -9.40	-2,035.83 a -2,032.76

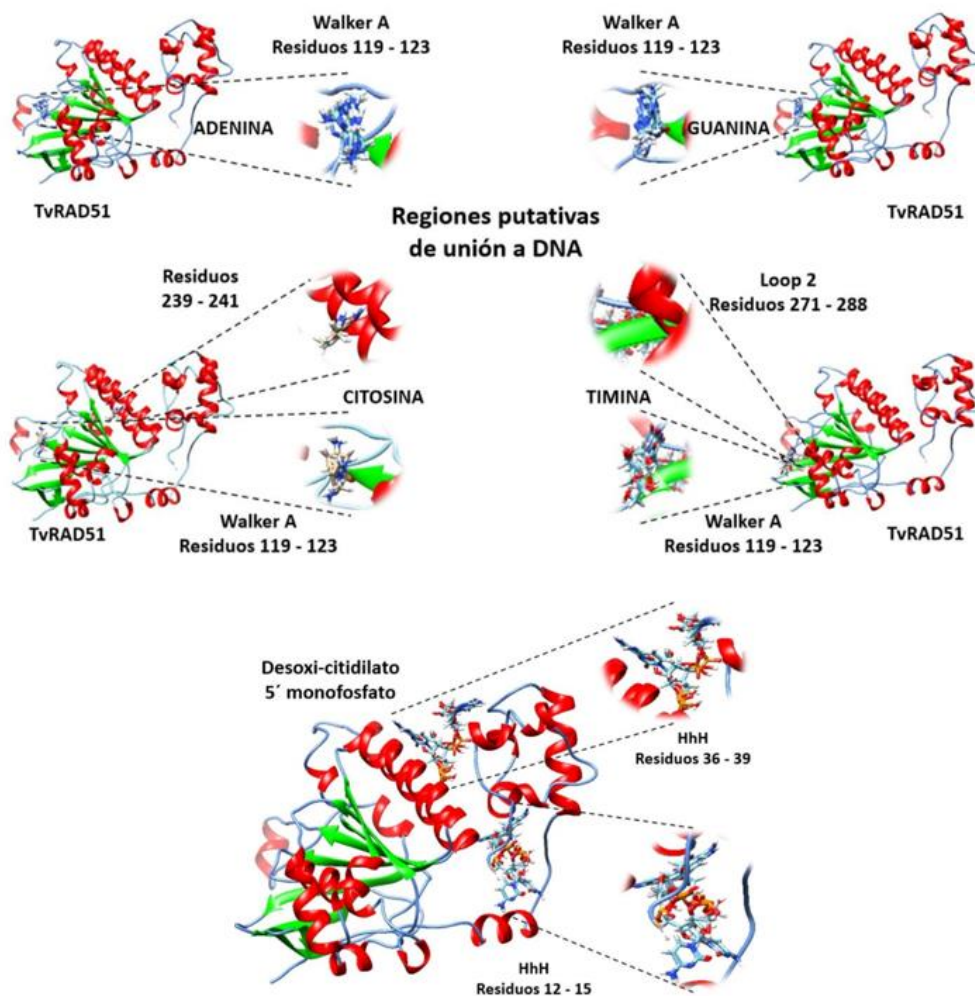


Figura 16. Sitio putativo de unión de TvRAD51 a DNA. Se muestran las 20 mejores predicciones de unión de las bases nitrogenadas y del desoxi-nucleótido de citosina en la estructura de la proteína TvRAD51 modelada en Swiss-Model. En zoom se observan los residuos de aminoácidos que incluye la región putativa de unión a DNA.

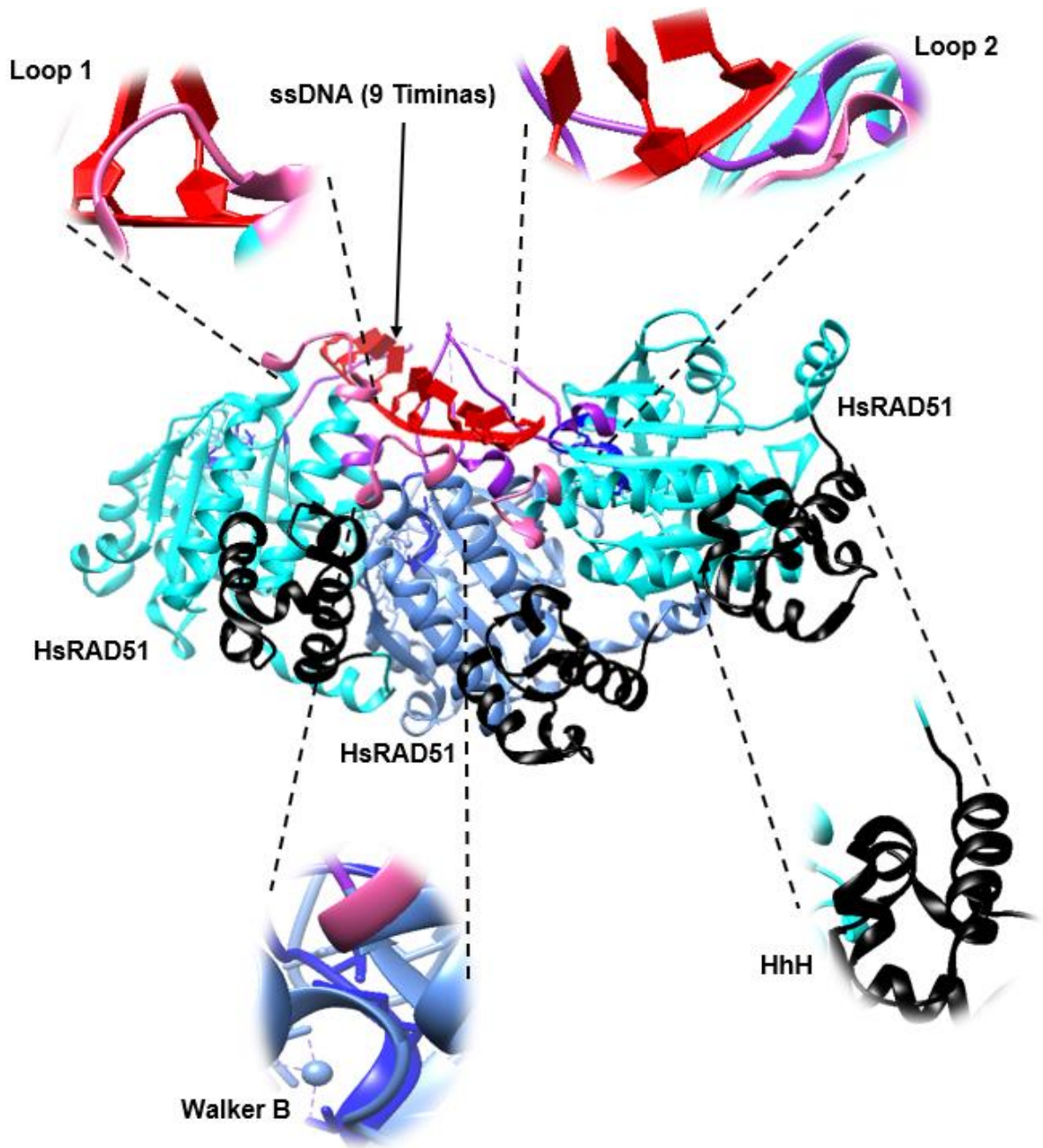


Figura 17. Estructura del complejo presináptico de recombinación homóloga en *H. sapiens*. En cian y azul se representan 3 monómeros de HsRAD51 formando un filamento sobre un fragmento de ssDNA compuesto por 9 timinas (rojo) (Estructura del complejo RAD51 presináptico humano, DOI: [10.2210/pdb5H1B/pdb](https://doi.org/10.2210/pdb5H1B/pdb)). En zoom se muestran los motivos y dominios que están clasificados como sitios de unión a DNA.

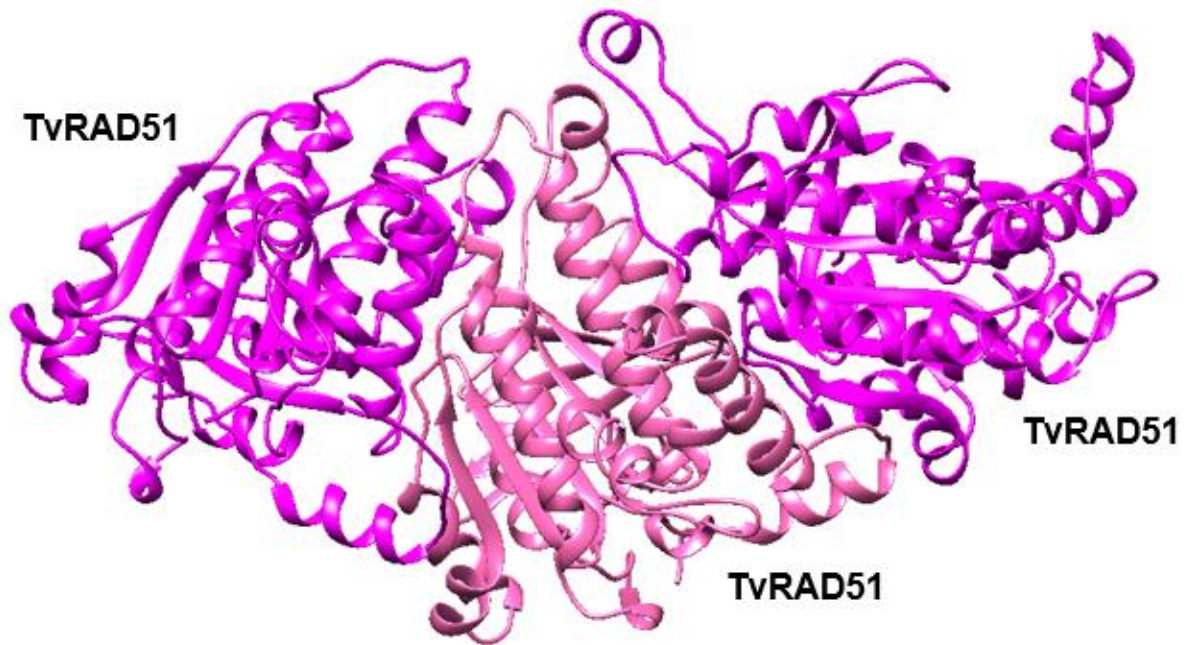


Figura 18. Filamento putativo de tres monómeros de TvRAD51. En rosa y magenta se representan 3 monómeros de TvRAD51 formando un filamento.

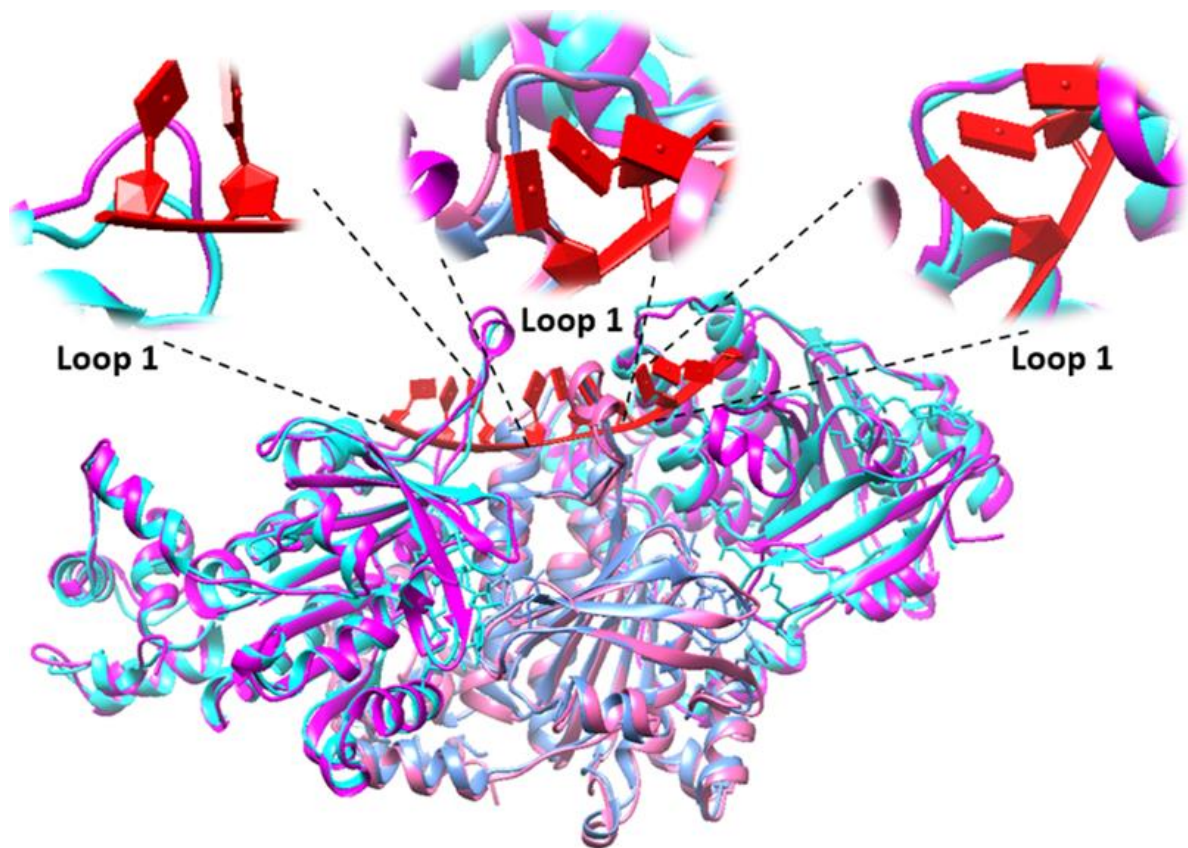


Figura 19. Sobreposición del filamento de tres monómeros de TvRAD51 en la estructura del complejo presináptico de recombinación homóloga en *H. sapiens*. En cian y azul se representan 3 monómeros de HsRAD51 formando un filamento sobre un fragmento de ssDNA compuesto por 9 timinas (rojo) (Estructura del complejo RAD51 presináptico humano, DOI: [10.2210/pdb5H1B/pdb](https://doi.org/10.2210/pdb5H1B/pdb)). En rosa y magenta se representan 3 monómeros de TvRAD51 formando un filamento. En zoom se muestran las regiones de interacción de HsRAD51 y los probables sitios de interacción de TvRAD51 con el DNA.

Tabla 5. Proteínas putativas involucradas en la maquinaria de recombinación homóloga de *Trichomonas vaginalis* identificadas a partir de ortólogos.

Proteína	<i>Trichomonas vaginalis</i>				<i>Homo sapiens</i>			<i>Entamoeba histolytica</i>		
	Tamaño (aa)	ID (TrichDB)	ID (Swiss-Prot/TrEMBL)	e-value	Identidad (%)	Similitud (%)	ID (AmoebaDB)	e-value	Identidad (%)	Similitud (%)
RAD52	-	-	NP_662296.2	-	-	-	EHI_188230	-	-	-
RAD51	329	TVAG_204070	NP_002866.2	4e-176	71	86	EHI5A_123500	1e-153	65	84
RAD50	1292	TVAG_332600	NP_005723.2	9e-46	28	46	EHI5A_032660	1e-36	37	58
RAD54	1107	TVAG_478690	CAA66379.1	1e-64	32	52	EHI5A_035590	8e-104	42	61
RAD55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RAD57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NBS1	-	-	BAA28616.1	-	-	-	-	-	-	-
MRE11	562	TVAG_098295	NP_005582.1	1e-46	28	50	EHI5A_094820	2e-39	27	52
XRCC3	328	TVAG_144570	NP_005423.1	3e-17	28	45	EHI5A_123500	4e-08	26	43
RPA	590	TVAG_294830	NP_002936.1	4e-63	27	50	EHI7A_115310	4e-09	22	43
BRCA1	202	TVAG_059670	NP_009225.1	5e-05	39	63	-	-	-	-
BRCA2	1664	TVAG_473090	AAB07223.1	2e-42	27	44	EHI5A_095310	7e-13	25	43
ATM/PIKK	2666	TVAG_139170	NP_000042.3	3e-85	27	29	EHI5A_131630	4e-65	26	47
DMC1	338	TVAG_155030	NP_008999.2	2e-134	56	65	EHI5A_057730	1e-143	62	78
EXO1	402	TVAG_212470	NP_003677.4	2e-55	33	48	-	-	-	-

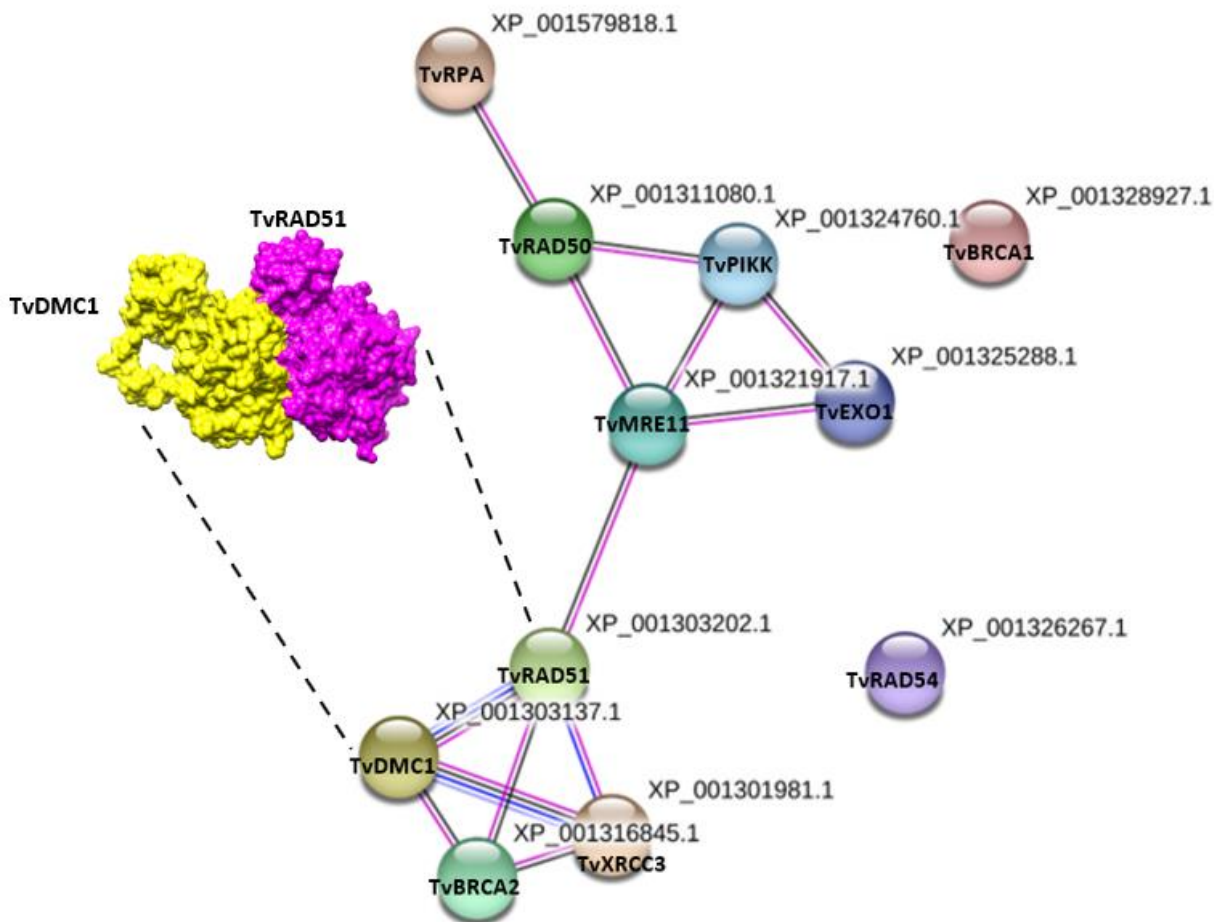


Figura 20. Red de interacción putativa del grupo epistático RAD52 en *T. vaginalis*. Las interacciones o conexiones físicas y funcionales se representan por líneas que unen los nodos. Las líneas de color lila representan la homología de proteínas, las azules corresponden a interacciones predichas por co-ocurrencia de genes, las líneas magenta muestran las interacciones identificadas experimentalmente en proteínas homólogas putativas, las negras hacen referencia a las proteínas coexpresadas. Los nodos aislados significan ausencia de interacción.

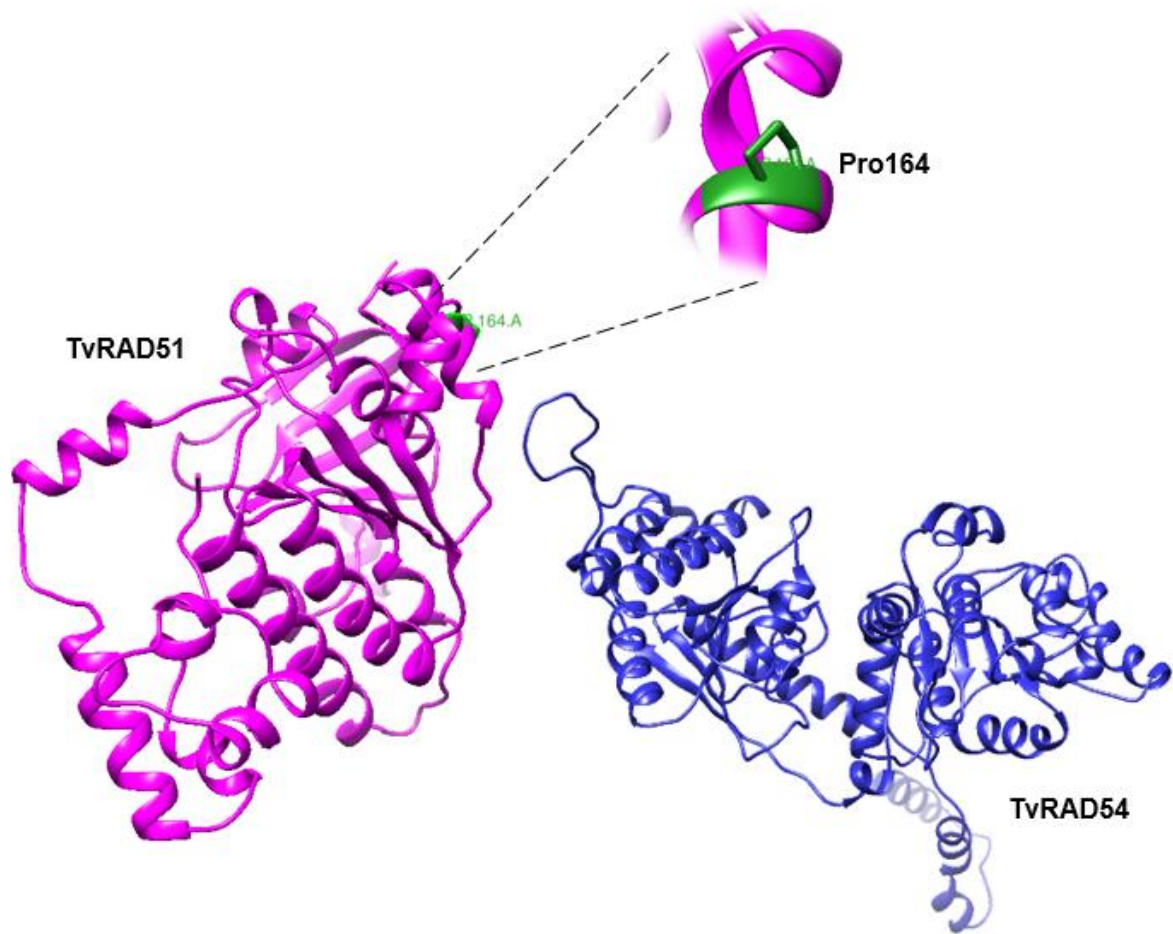


Figura 21. Docking molecular de TvRAD51 con TvRAD54. Se muestra la estructura de TvRAD51 (magenta) y TvRAD54 (azul) modeladas en Swiss-Model. En zoom se observa la mutación puntual de S164P presente en TvRAD51 que probablemente sea la responsable de la no interacción de estas proteínas.

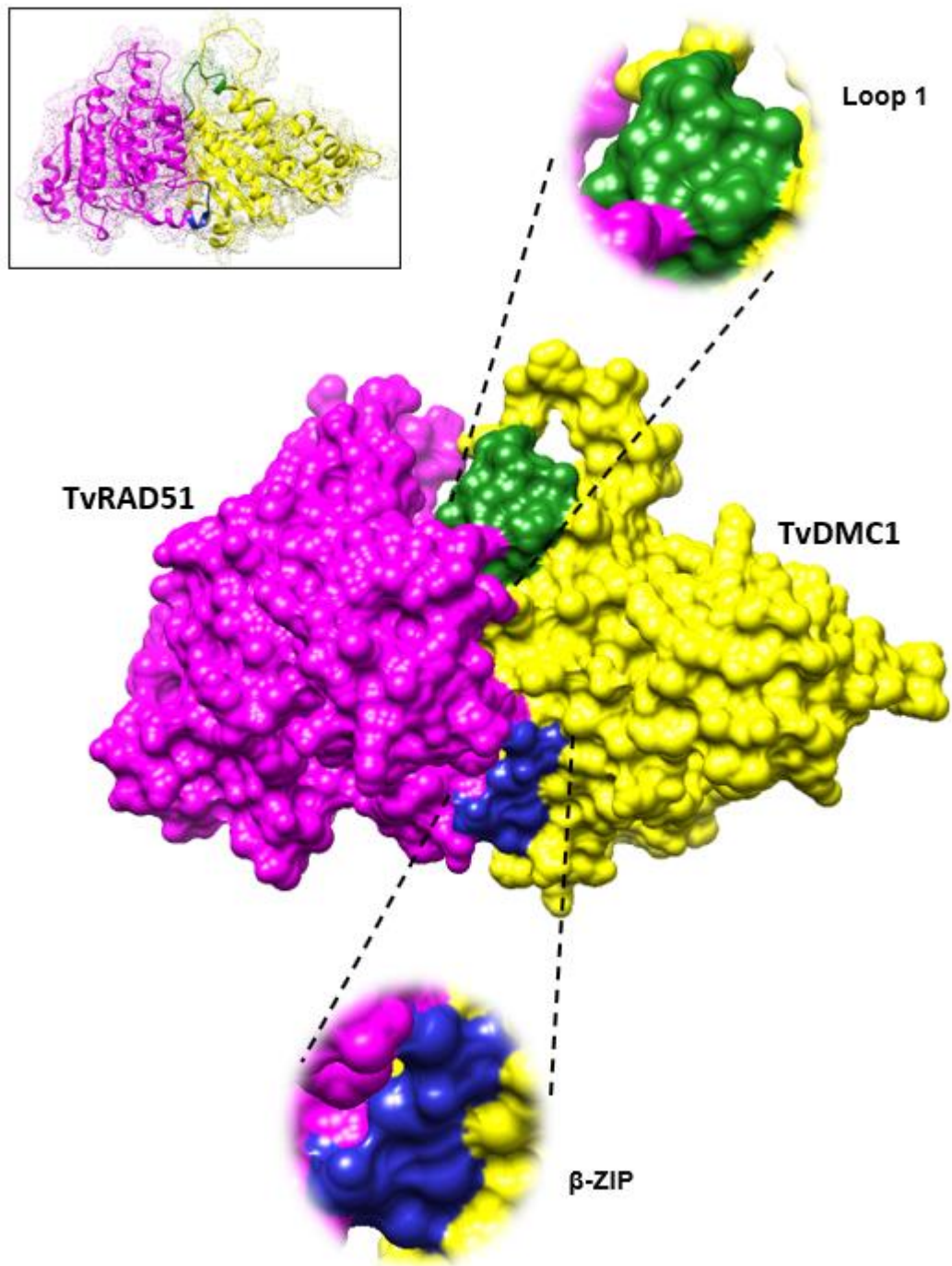


Figura 22. Docking molecular de TvRAD51 con TvDMC1. Se muestra la estructura tridimensional de TvRAD51 (magenta) y TvDMC1 (amarillo) modeladas por homología en Swiss-Model. En zoom se observan las regiones que podrían ser el sitio de interacción entre ambas recombinasas.

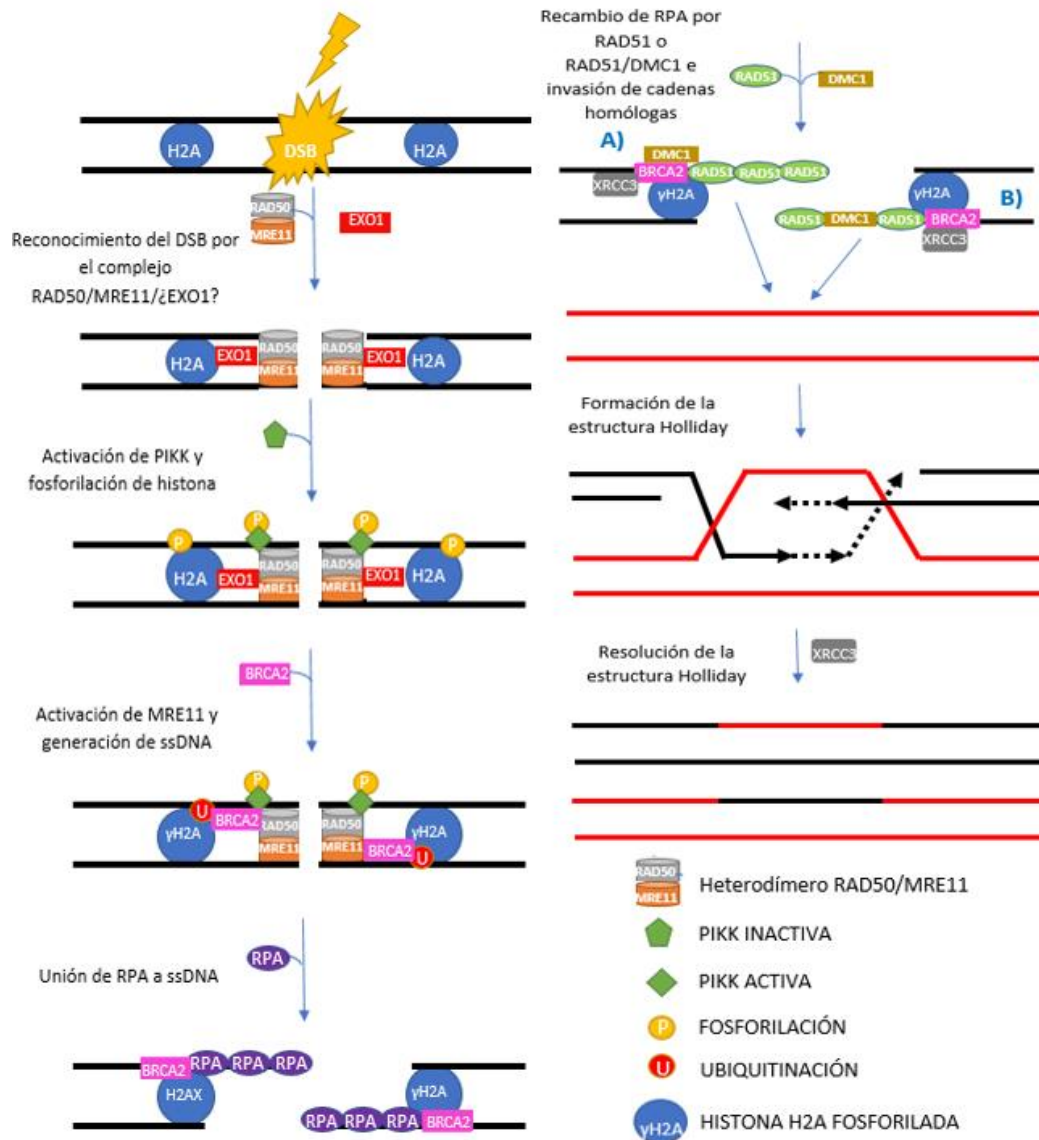


Figura 23. Propuesta de la maquinaria de reparación de DSB mediante recombinación homóloga en *T. vaginalis*. El heterodímero RAD50/MRE11 actúa como sensor del daño y estabiliza los dos extremos de DNA, se recluta PIKK y una vez en el sitio de daño se activa por autofosforilación. A continuación, PIKK fosforila a la histona H2A cercana al sitio de la lesión para activar a MRE11 y que realice su función de exonucleasa generando ssDNA, que será recubierto por RPA. Posteriormente, la histona H2A se ubiquitina para reclutar a BRCA2 y este a su vez a XRCC3. El siguiente paso es el reclutamiento de las recombinasas RAD51 y DMC1 para formar un nucleofilamento y realizar el recambio por RPA. Se invade la cadena homóloga formando una estructura de Holliday. Finalmente se resuelve la estructura y se repara el daño.

8.2 Análisis de expresión del gen *tvrads51* en el aislado HGMMN01 de *T. vaginalis*.

El DNA genómico extraído con la técnica de Fenol-Cloroformo, se utilizó como templado para el control positivo en la amplificación del gen *tvrads51* utilizando oligonucleótidos específicos para su secuencia. La integridad del DNA genómico se visualizó previamente mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (**Figura 24**). Se utilizó 1µg de RNA total (**Figura 25**) de las 3 condiciones analizadas (control, parásitos expuestos a luz UV-C y parásitos expuestos a Zn²⁺ 1.6 mM o Cd²⁺ 0.1 mM) obtenido mediante la técnica de TRIzol para la síntesis de cDNA y la posterior PCR de *tvrads51* utilizando 100 ng de cDNA como templado y obteniendo un amplicón de 990pb. Como control de carga, se utilizó un fragmento de 112pb del gen β -*tubulina* (**Figura 26**). Se realizó el análisis densitométrico midiendo la densidad de las bandas obtenidas en la electroforesis en gel de agarosa. La expresión de *tvrads51* a los 10 minutos posteriores a la irradiación con 150 J/m², es muy parecida a la expresión del gen en las condiciones de cultivo normales (condición control), mientras que, a los 30 y 60 minutos posteriores a la irradiación, la expresión aumentó 2.46 y 2.87 veces, respectivamente. En los parásitos expuestos durante 10 minutos a Zn²⁺ 1.6 mM Cd²⁺ 0.1 mM, la expresión de *tvrads51* aumentó 2.54 y 3.19 veces, respectivamente. La medición se realizó normalizando la expresión de *tvrads51* con la expresión de β -*tubulina* y considerando como 1 la expresión de *tvrads51* en condiciones normales (**Figura 27**).

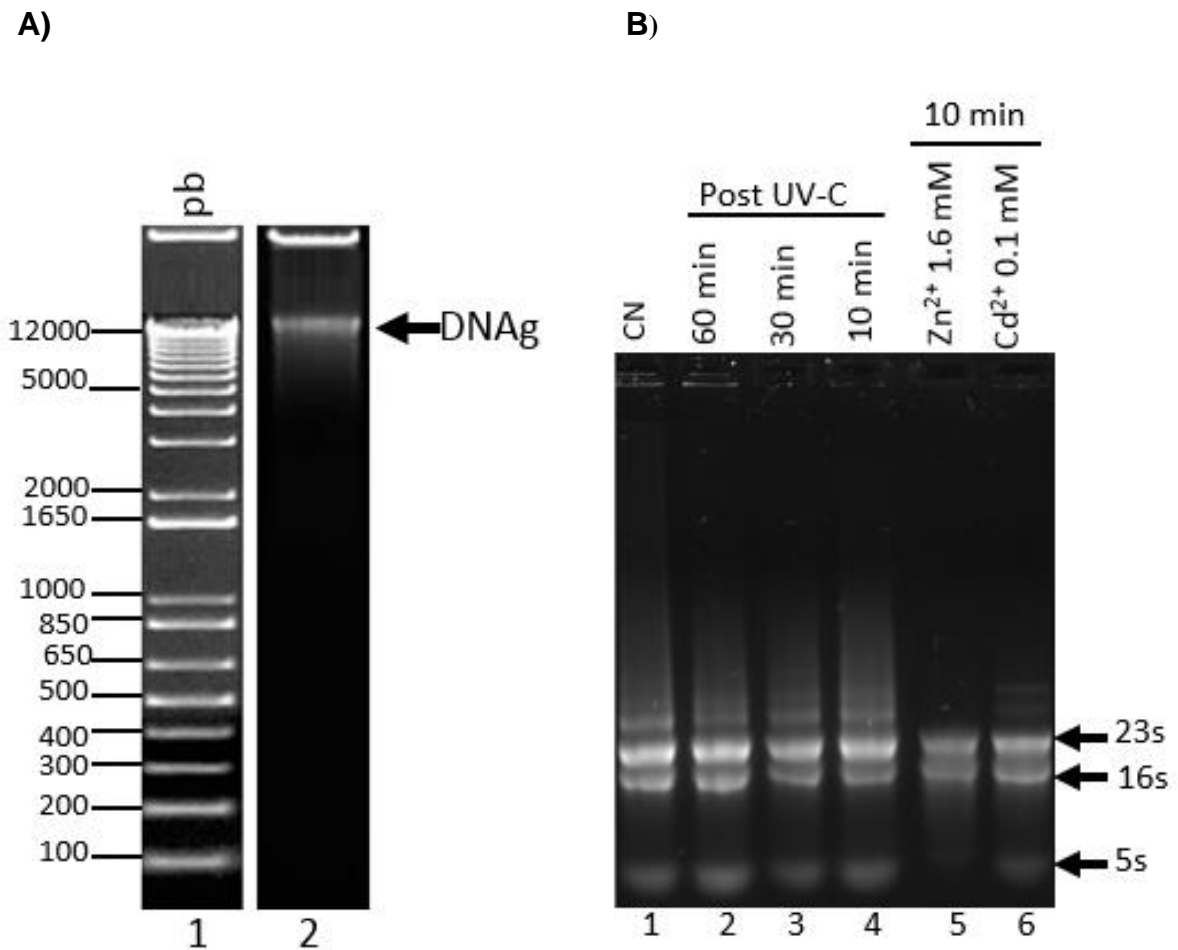


Figura 24. DNA genómico y RNA total del aislado HGMN01 de *T. vaginalis*. **A)** Se muestra la banda correspondiente al DNA genómico de *T. vaginalis*, obtenida mediante el revelado de la electroforesis de un gel de agarosa al 0.8% teñido con GelRed®. Carriles: 1) marcador de 1kb, 2) DNA genómico. **B)** Verificación de la integridad de RNA total de *T. vaginalis* en las 3 condiciones de estudio mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñido con GelRed®. Carriles: 1) RNA en condiciones normales, 2) RNA a los 60 minutos posteriores a la irradiación con luz UV-C, 3) RNA a los 30 minutos posteriores a la irradiación con luz UV-C, 4) RNA a los 10 minutos posteriores a la irradiación con luz UV-C, 5) RNA de parásitos expuestos durante 10 minutos a Zn²⁺ 1.6 mM, 6) RNA de parásitos expuestos durante 10 minutos a Cd²⁺ 0.1 mM.

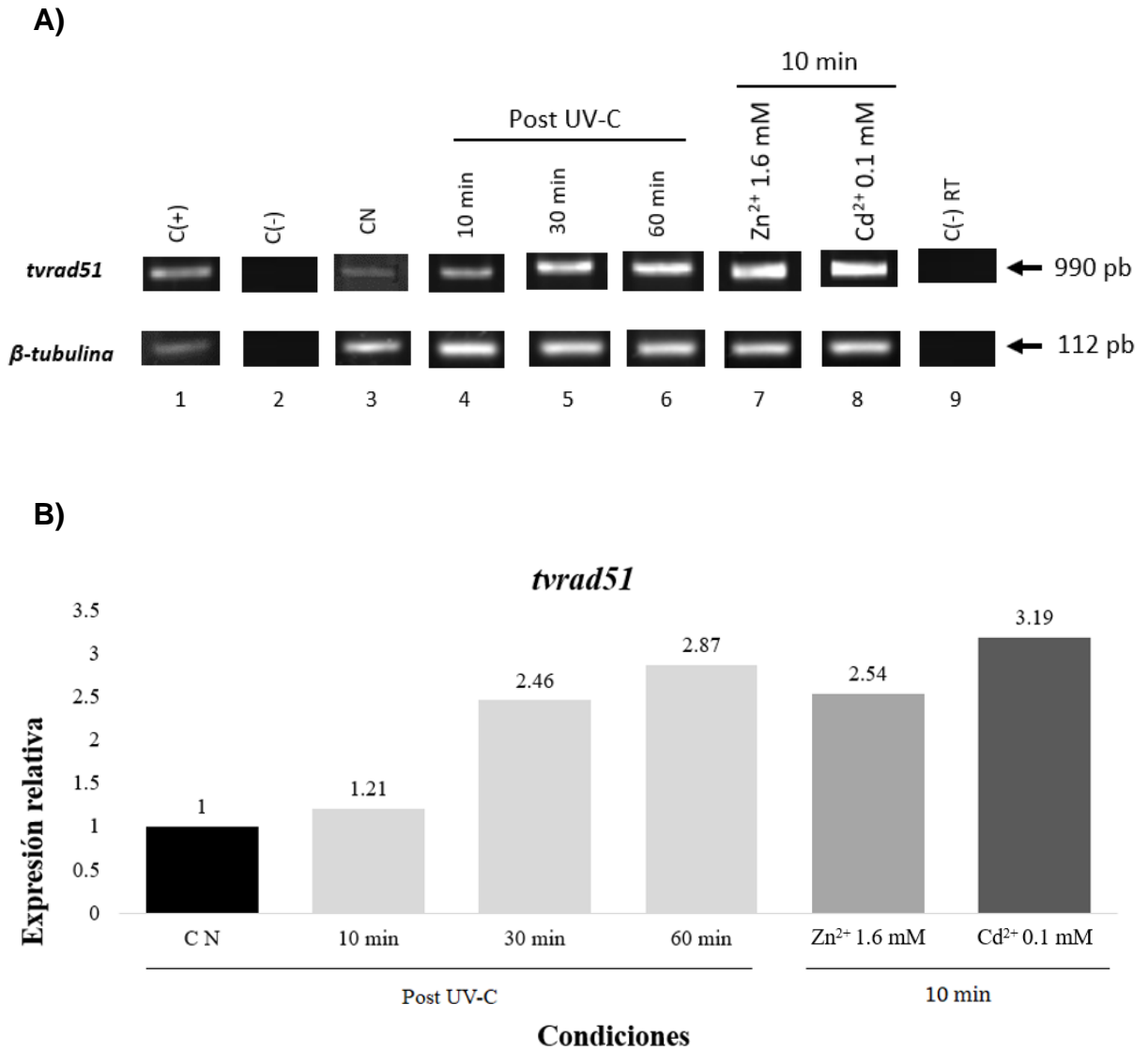


Figura 25. Expresión del gen *tvrad51* y β -*tubulina* del aislado HGMN01 de *T. vaginalis* en condiciones normales, bajo tratamiento con luz UV-C y presencia de cationes. A) Las bandas corresponden al amplicón de 990pb de *tvrad51* y 112pb de β -*tubulina* obtenido mediante RT-PCR. Carriles: 1) Control (+) con DNAg, 2) control (-), 3) cultivo en condiciones normales, 4) cultivo a los 10 min posteriores a irradiación UV-C, 5) cultivo a los 30 min posteriores a irradiación UV-C, 6) cultivo a los 60 min posteriores a irradiación UV-C, 7) cultivo expuesto 10 min a Zn²⁺ 1.6 mM, 8) cultivo expuesto 10 min a Cd²⁺ 0.1 mM, 9) control negativo de RT. **B)** Expresión relativa de *tvrad51* obtenida mediante densitometría del ensayo de PCR semicuantitativa. Se normalizó con los valores de expresión de β -*tubulina* considerando como 1 el valor obtenido en el cultivo en condiciones normales.

8.3 Inmunodetección de TvRAD51 en el aislado HGMN01 de *T. vaginalis*.

Se realizó la extracción de proteínas totales de *T. vaginalis* por precipitación con TCA. Se cargaron 10 µg de proteínas totales por carril. Se observó que el patrón de bandeo es similar en los parásitos expuestos a luz UV-C y a cationes (**Figura 28**). Se realizó un alineamiento de las secuencias TvRAD51 y HsRAD51 en el software Protein BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), obteniéndose un 71% de identidad entre ambas secuencias (**Figura 29**). Para el Western Blot (**Figura 30**) se utilizó anticuerpo comercial α-TvRAD51 de *Homo sapiens* (3C10): sc-53428 Santa Cruz Biotechnology, INC. a una dilución de 1:500. La abundancia de TvRAD51 se midió mediante densitometría. Se observó que TvRAD51 aumenta a mayor tiempo post exposición a luz UV-C y en presencia de Zn²⁺ y Cd²⁺, en comparación con los parásitos cultivados en condiciones normales (**Figura 31**). Además, en el western blot se detectó una segunda banda de aproximadamente 37 kDa (**Figura 30**). Para analizar si la segunda banda detectada pudiera ser TvDMC1, se realizó el alineamiento de estas secuencias en el software Protein BLAST, obteniendo un 62% de identidad (**Figura 32**) y una comparación estructural de los modelos obtenidos por homología de TvRAD51 con TvDMC1, observando que tienen un plegamiento similar (**Figura 33**).

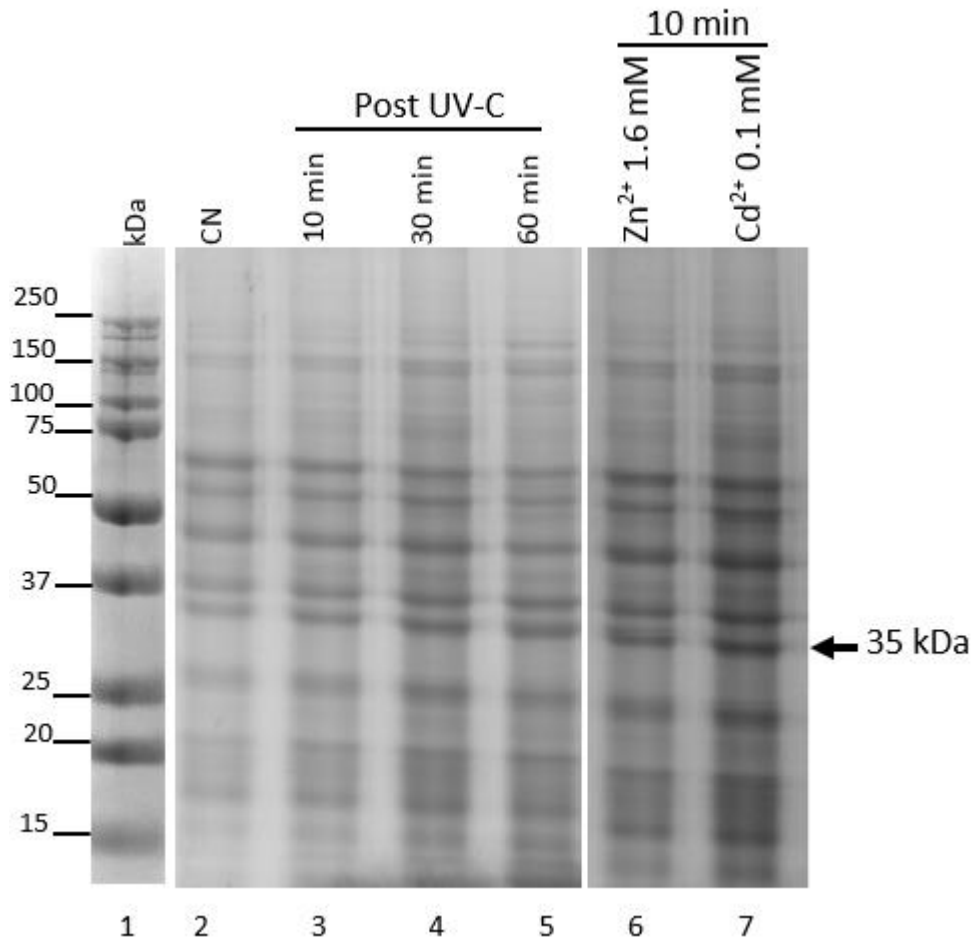
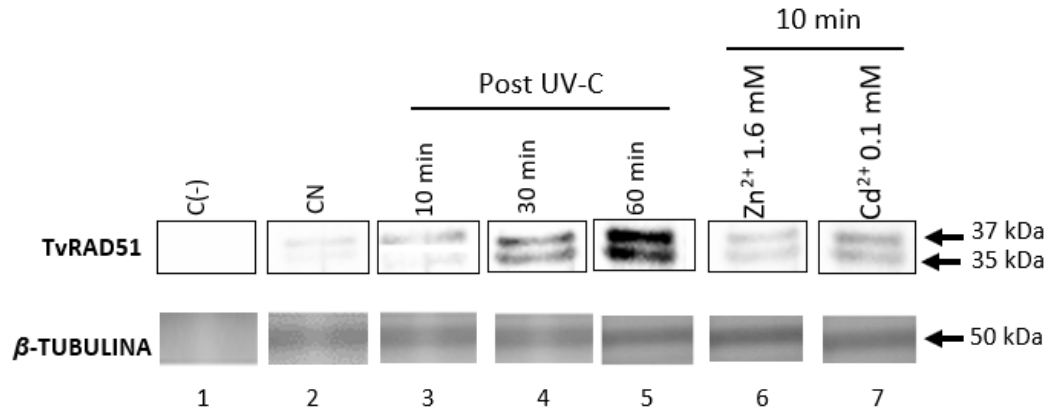


Figura 26. Extracto de proteínas totales del aislado HGMMN01 de *T. vaginalis*. Se muestra el patrón proteico de los extractos totales de proteínas de *T. vaginalis* en las diferentes condiciones de estudio. Gel de poliacrilamida al 12% teñido con azul de Coomassie. Carriles: 1) marcador de peso molecular, 2) cultivo en condiciones normales, 3) cultivo a los 10 minutos posteriores a irradiación UV-C, 4) cultivo a los 30 minutos posteriores a irradiación UV-C, 5) cultivo a los 60 minutos posteriores a irradiación UV-C, 6) cultivo expuesto durante 10 minutos a Zn²⁺ 1.6 mM, 7) cultivo expuesto durante 10 minutos a Cd²⁺ 0.1 mM.

A)



B)

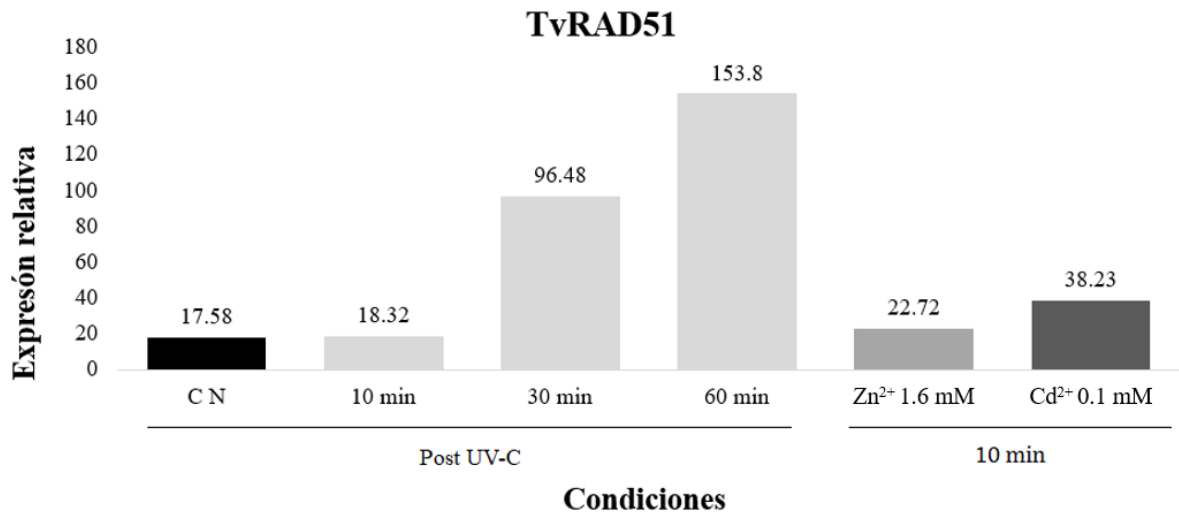


Figura 27. Expresión de TvRAD51. A) Inmunodetección de TvRAD51 mediante Western Blot con anticuerpos específicos. Carriles: 1) control (-), 2) cultivo en condiciones normales, 3) cultivo a los 10 min posteriores a irradiación UV-C, 4) cultivo a los 30 min posteriores a irradiación UV-C, 5) cultivo a los 60 min posteriores a irradiación UV-C, 6) cultivo expuesto 10 min a Zn^{2+} 1.6 mM, 7) cultivo expuesto 10 min a Cd^{2+} 0.1 mM. **B)** Expresión relativa de TvRAD51. La expresión de TvRAD51 es mayor a la expresión de β -TUBULINA aun en condiciones normales. A los 10 minutos posteriores a la irradiación con $150 J/m^2$, la expresión de TvRAD51 es muy parecida a la expresión de la proteína en la condición normal, mientras que, a los 30 y 60 minutos posteriores a la irradiación, la expresión aumentó 96.48 y 153.8 veces, respectivamente. En los parásitos expuestos durante 10 minutos a Zn^{2+} 1.6 mM Cd^{2+} 0.1 mM, la expresión de TvRAD51 aumentó 22.72 y 38.23 veces, respectivamente.

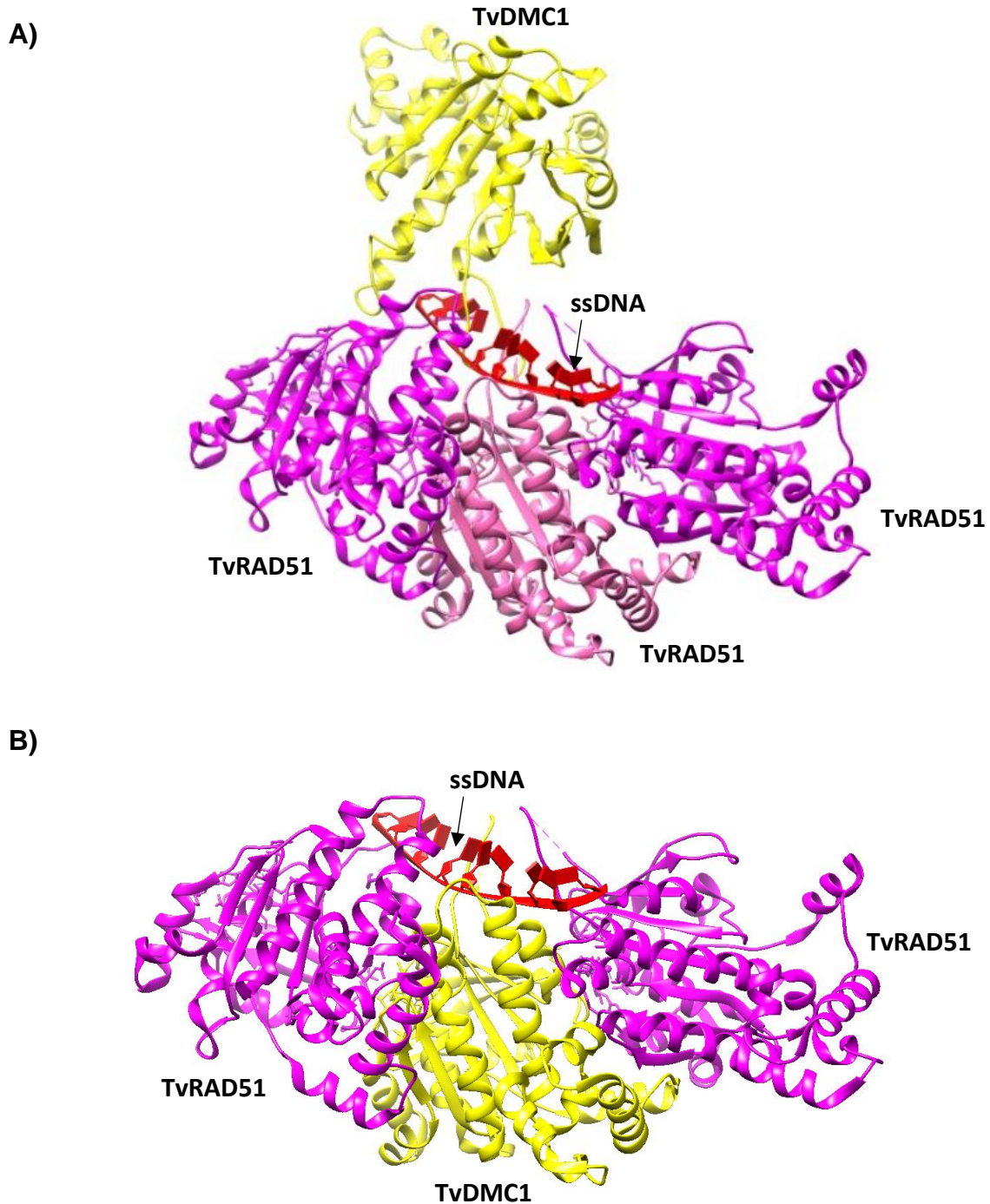


Figura 29. Complejos presinápticos putativos de recombinación homóloga en *T. vaginalis*. **A)** filamento de tres monómeros de TvRAD51 (rosa y magenta) y TvDMC1 (amarillo) modeladas en Swiss-Model, unidos a ssDNA (9 timinas). **B)** filamento mixto compuesto por dos monómeros de TvRAD51 y un monómero de TvDMC1 unidos a ssDNA.

9. DISCUSIÓN

T. vaginalis es un tricomonádido que está expuesto a las condiciones cambiantes del tracto genitourinario humano durante la infección. Se sabe que en el microambiente urogenital masculino existe la presencia de diferentes cationes metálicos, principalmente de Zn^{2+} y Cd^{2+} , los cuales podrían ocasionar daños directos e indirectos al DNA (principalmente DSB) del parásito dificultando su sobrevivencia, por lo que éste, debe desarrollar estrategias que le permitan adaptarse a las condiciones adversas de su nicho ecológico. Los DSB son reparados principalmente mediante RH, cuyo mecanismo se basa en la búsqueda de homología, seguido por el apareamiento, el intercambio y la regeneración entre cadenas homólogas de DNA (Katakai y cols., 2001). Las reacciones de invasión de hebras son catalizadas por las recombinasas de DNA de la familia RAD51/RECA (Kowalczykowski, 2015; Bianco y cols., 1998). Esta familia incluye a la proteína RECA bacteriana, la proteína arqueal RADA, y la proteína eucariota RAD51 (Bianco y cols., 1998; Lin y cols., 2006).

En *E. histolytica*, se ha reportado la maquinaria de reparación de daño del DNA mediante RH (López-Casamichana y cols., 2008). Sin embargo, en *T. vaginalis*, solo se sabe que existen genes que están involucrados en la reparación del DNA (Carlton y cols., 2007), pero no se ha realizado una búsqueda a profundidad de los genes que podrían estar participando en el mecanismo de RH. Por esta razón, realizamos la búsqueda de las proteínas putativas que podrían estar involucradas en la maquinaria de RH en *T. vaginalis*, además de estudiar la proteína principal de esta vía: la recombinasa RAD51.

La presencia del gen *tvrad51* (**Figura 4A**) es evidencia de que *T. vaginalis* puede contar con un mecanismo de RH, mientras que la presencia de *tvdmc1* (**Figura 4C**), sugiere que la capacidad de realizar meiosis estaba presente en el último ancestro común de este parásito (Malik y cols., 2007). Además, el pseudogen de *tvrad51* y el gen parálogo a *tvdmc1* (*tvdmc1-p*) (**Figura 4B**), indican que probablemente, *T. vaginalis* tenía más de un gen que codifica para ambas recombinasas, sin embargo, pudieron haberse perdido a lo largo de la evolución.

Las proteínas RAD51 de eucariotas tienen una organización molecular muy similar, conservada a través de la escala evolutiva (Ogura y cols., 2001). Poseen un dominio muy conservado formado por dos motivos del tipo hélice-horquilla-hélice (HhH) que tiene la función de unión ssDNA y dsDNA en el extremo N-terminal, sin embargo, en la proteína RecA de bacterias, este dominio HhH se localiza en extremo C-terminal (Yu y cols., 2001). Estas proteínas también poseen un dominio de ATPasa muy conservado. Este dominio contiene a los subdominios RECA_2 y RECA_3 y ha sido encontrado en la FoF1-ATP sintasa y en diversas helicasas, lo que sugiere que estas proteínas divergen de un ancestro común (Yu y cols., 2001). Además, dentro del dominio ATPasa, se encuentran varios motivos funcionales: el motivo Walker A, que se ha identificado como sitio de unión a ATP (Ogura y cols., 2001); las regiones que reciben el nombre de Loop 1 y Loop 2 localizadas en el extremo C-terminal, y el motivo Walker B que se han identificado como motivos de unión a DNA y el motivo β -Zip que junto con el motivo Loop 1 forman una región de polimerización (Shin y cols., 2003). Como se puede observar en el alineamiento múltiple (**Figura 7**), la proteína TvRAD51 conserva estos motivos funcionales en su secuencia de aminoácidos.

En la proteína TvRAD51, los motivos HhH se localizan en los residuos Gly23, Ile24, Ala25 y Gly56, Ile57, Ser58 con una secuencia GIA y GIS respectivamente, que coinciden con la secuencia consenso característica de este motivo: GXG/T/N/S donde X es un residuo hidrofóbico (Isoleucina, leucina o Valina) que es el encargado de la interacción con el DNA. La unión de la proteína al DNA a través del motivo HhH ocurre mediante la formación de puentes de hidrógeno entre los nitrógenos del esqueleto de la proteína y los grupos fosfatos del surco mayor del DNA (Shanahan y cols., 2004).

En *T. vaginalis*, el dominio ATPasa (RECA / RAD51) de TvRAD51 también contiene dos motivos altamente conservados: el motivo Walker A y el motivo Walker B, que están presentes en las ATPasas y confieren actividades de unión e hidrólisis de ATP y de unión a Mg^{2+} y DNA, respectivamente (Walker y cols., 1982) (**Figura 8**). Como se aprecia en el alineamiento (**Figura 7**) la secuencia consenso del motivo Walker B en las proteínas de la familia RECA/RAD51, consiste en una región altamente hidrofóbica con dos residuos polares conservados: Ácido aspártico (aminoácido cargado

negativamente) y Serina (aminoácido sin carga). Se ha sugerido que la función de este motivo en proteínas homólogas como en la proteína RADA de *Pyrococcus furiosus* (PfRADA) es aumentar la superficie de contacto cuando esta proteína se une al DNA (Shin y cols., 2003) debido a la interacción de estos residuos con el grupo fosfato del DNA mediante la formación de puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals (Doherty y cols., 1996), que representan el 65% del total de las interacciones proteína-DNA y ocurren principalmente con la desoxirribosa y los grupos fosfatos. En la proteína TvRAD51 esta interacción podría ser con los residuos Leu210, Ile211, Val212 y Asp213, que junto con Ser214 podrían formar puentes salinos y de hidrógeno respectivamente con los grupos fosfatos (Doherty y cols., 1996; Luscombe y cols., 2001).

El motivo Loop1 (**Figura 14**), es un motivo de unión a DNA, ya que tiene los residuos consenso: Gly/Arg/Gly, donde Arg es un residuo muy conservado en proteínas homólogas de otros organismos, y que participa en el contacto primario con el DNA, pues la interacción DNA-RAD51 mutante disminuye considerablemente (Shin y cols., 2003). En HsRAD51 se han reportado hallazgos similares al eliminar la Tyr136. (Matsuo y cols., 2006). En la proteína TvRAD51, tanto la Tyr223 como la Arg226, se encuentran conservados. El residuo Arg226 podría interactuar con el DNA al formar puentes salinos y de hidrógeno con los grupos fosfatos, la desoxirribosa y la guanina, mientras que el residuo Tyr223 podría interactuar a través de fuerzas de Van der Waals o mediante fuerzas hidrofóbicas (Luscombe y cols., 2001).

Además de ser un sitio de unión a DNA, loop1 es un motivo de polimerización. Se ha observado que, cuando RAD51 se encuentra formando anillos, el sitio de unión de ATP queda oculto de tal modo que al interactuar el Loop 1 con el DNA, permite que exista un cambio conformacional al moverse ligeramente Phe140 del P-loop de PfRADA (en *T. vaginalis* este residuo corresponde a Phe120) de modo que el sitio de unión a ATP se exponga y se active (Shin y cols., 2003). En TvRAD51, el motivo loop2 en conjunto con el motivo Walker B, podría aumentar la superficie de contacto con el DNA, mientras que el motivo de unión a ATP, Walker A, tiene la secuencia consenso:

[A/G]xxxGL[S/T]. En el alineamiento múltiple se observa que este motivo está altamente conservado en las proteínas de la familia RECA/RAD51.

En TvRAD51, los residuos que podrían desempeñar esta función son: Lys124 e His285. Estudios de microscopía electrónica de la proteína RADA de *P. furiosus* (Komori y cols., 2000), confirman la presencia de anillos heptámicos, en donde el dominio ATPasa está colocado como si fuera un prisma y el Loop 1 queda al interior del anillo (Shin y cols., 2003). El motivo de polimerización β -zip es el encargado de la formación de anillos en la proteína de *P. furiosus*. En la proteína TvRAD51, el posible dominio β -zip corresponde a los residuos 76-82 con la secuencia GFASASD.

Además, al realizar las representaciones esquemáticas de las proteínas RAD51, de manera interesante observamos que la proteína RAD51 que está compuesta por un mayor número de elementos es la de *H. sapiens*, conteniendo sitios de interacción con otras proteínas involucradas en el mecanismo de recombinación homóloga como BRCA2 y PALB2 (**Figura 8**), así como sitios de acetilación y fosforilación, los cuales le permiten una mayor regulación durante los mecanismos de replicación y reparación de daño del DNA, debido a que se ha observado que las proteínas de los vertebrados suelen tener mayor complejidad en sus regiones de regulación que en los protozoarios. La gran similitud entre las secuencias de TvRAD51 y de la proteína RAD51 de otros parásitos, con la secuencia de ScRAD51, sugiere que la estructura secundaria y terciaria de la recombinasa RAD51 de *T. vaginalis* y de los demás parásitos analizados en este trabajo, es muy parecida o similar y compartiendo el mismo tipo plegamiento.

Para valorar de forma inicial la calidad de las estructuras obtenidas mediante modelado por homología, se tomó en cuenta la raíz de la RMSD que se calcula al sobreponer la estructura modelada con la estructura del templado, este debe estar dentro de un intervalo de 1 a 1.5 Å (Baker y Sali 2001; Vitkup y cols., 2001; Cothia y Lesk 1986).

El modelo de TvRAD51 obtenido en Phyre², muestra un 72 % de identidad con el modelo templado y el valor de RMSD es de 0.324 Å, mientras que el modelo de TvRAD51 obtenido en Swiss-Model, tiene 71 % de identidad con el modelo templado

y un valor de RMSD de 0.865 Å. Los valores de RMSD indican es que estas estructuras son muy parecidas a sus modelos origen, ya que entre estructuras homologas lo valores de RMSD son, por lo general entre, 1 y 1.5 Å. Por lo tanto, esto sugiere que el modelo de Swiss-Model parece estar mejor elaborado que el de Phyre² al tener un RMSD mayor de separación con el modelo origen, por lo que este fue el que se utilizó en los análisis posteriores.

Aunque ambos modelos son muy similares, existen diferencias que se pueden apreciar en la sobreposición de estructuras, principalmente la ausencia de gran parte del extremo amino terminal en el modelo realizado en el software Phyre². El modelo de Phyre² no modela todas las hélices alfa correspondientes al dominio N-terminal, solo de $\alpha 1$ a la $\alpha 2$, mientras que el modelo de Swissmodel modela las hélices $\alpha 1$ a la $\alpha 8$.

El modelo de TvRAD51 construido con el programa Swissmodel es el mejor elaborado, ya que contempla no solo una mayor proporción de la estructura, sino que es el mejor trabajado desde el punto de vista del método de modelado. Al realizar la representación esquemática del modelo tridimensional de TvRAD51 obtenido en Swiss-Model, observamos que esta estructura conserva la arquitectura clásica de una proteína RAD51 de eucariontes. En el modelo también se observa que el dominio ATPasa está constituido por una hoja- β plegada, formada por hebras- β (de la $\beta 1$ a la $\beta 9$) en su mayoría paralelas rodeadas por hélices- α y conectadas por loops.

El motivo Walker A tiene una estructura conformada por una hebra- β -loop- hélice- α (**Figura 14**), el motivo Walker B es una hebra- β y el motivo de polimerización β -zip se encuentra en el loop que une a la $\alpha 6$ con la $\alpha 7$ (**Figura 15**).

También valoramos la calidad de las estructuras tridimensionales de TvRAD51 obtenidas por modelado por homología mediante gráficos de Ramachandran. En este análisis se evalúan los ángulos dihedros psi (ψ) respecto a phi (ϕ) de cada una de los residuos de aminoácidos, indicando si la combinación de estos ángulos es estéricamente favorable para los diferentes aminoácidos y elementos de la estructura secundaria, lo que permite saber si se encuentran espacialmente localizados de forma

correcta en los modelos (con el mejor empacamiento explorado) y que esa disposición es posible en la estructura real de la proteína. El enlace peptídico que es considerado un enlace doble parcial de geometría trigonal plana (ángulo Ω , [OC-NH]-C α -[OC-NH]) y de libertad restringida, sus átomos enlazan a ambos lados de los carbonos alfa por medio de enlaces simples sigma, los cuales tienen libertad de giro de 180 grados, a los ángulos de giro se les denomina ϕ (C α -N) y ψ (C α -C). Así observamos dos unidades rígidas en torno a los C α donde sus enlaces son los que aportan la capacidad de giro.

Teóricamente ϕ y ψ puede tener cualquier valor entre +180° y -180°, lo que significa que cada uno tiene 360° de rotación. Sin embargo, en la realidad, no todas las combinaciones son posibles debido a la interferencia estérica de los átomos de la cadena lateral.

La mayoría de las áreas del gráfico de Ramachandran, es decir, la mayoría de las combinaciones de ϕ y ψ) representan conformaciones no posibles de una cadena de polipéptidos debido a colisiones estéricas entre cadenas laterales y cadenas principales (Morris y cols., 1992). Las áreas no permitidas son aquellas en donde cualquier distancia interatómica es menor que sus correspondientes radios Van der Waals. Estas regiones son estéricamente no permitidas para todos los aminoácidos excepto para la glicina, ya que su cadena lateral corresponde a un hidrógeno del C α .

Las regiones permitidas corresponden a conformaciones donde no hay interferencias estéricas. La mayoría de los valores ϕ y ψ de una cadena de polipéptidos se encuentran dentro de estas regiones permitidas del gráfico de Ramachandran, pero hay algunas excepciones: la glicina, el aminoácido con una cadena lateral más pequeña, está mucho menos restringido que otros residuos de aminoácidos, por lo tanto, su rango permitido de ϕ y ψ cubre un área más grande del gráfico. En los residuos de glicina, las cadenas de polipéptidos frecuentemente asumen conformaciones que no se permiten estéricamente a otros residuos.

La cadena lateral cíclica de la prolina limita su rango de valores de ángulos ϕ en alrededor de los 60° y -60°, por lo que es el residuo de aminoácido más restringido en

conformación estructural. Las regiones permitidas adicionales, corresponden a la conformación que tiene límite externo entre las distancias de Van der Waals, es decir, los átomos pueden acercarse un poco más sin impedimento estérico (Kumar y Arya, 2018).

El modelo de TvRAD51 generado con el software Swiss-Model, tiene un mayor porcentaje de residuos en las áreas más favorables y menos en áreas no permitidas, en comparación al modelo obtenido en Phyre² (**Tabla 3**), lo que indica que la predicción del plegamiento realizada en Swiss-Model es más confiable y que el modelo está mejor empacado. Además, los gráficos de Ramachandran también permiten predecir la estructura secundaria de una proteína, puesto que, el cuadrante superior izquierdo representa las hojas β , el cuadrante superior derecho e inferior izquierdo se localizan las hélices- α que giran a la izquierda y derecha respectivamente (Wetzer y cols., 2012).

Los resultados de los acoplamientos moleculares mostraron que los sitios putativos de unión de TvRAD51 al DNA se encuentran en el dominio HhH localizado en el extremo N-terminal, en el motivo Walker A y en el loop2 (**Figura 16**).

Como sabemos, para llevar a cabo su función, además de unirse al DNA, RAD51 debe interactuar con proteínas que pertenecen al grupo epistático RAD52; principalmente RAD52, RAD54 y RAD55. En *T. vaginalis*, se identificaron 11 proteínas putativas que podrían estar participando en el mecanismo de RH en *T. vaginalis*: RAD50, RAD51, RAD54, MRE11, XRCC3, RPA, BRCA1, BRCA2, ATM/PIKK, DMC1 y EXO1 (**Tabla 5**).

RAD50: proteína que forma parte del complejo MRN (MRE11-RAD50-NBN/NBS1), que junto con RAD52 y MRE11, localizan el sitio de la lesión en el DNA, además regula la actividad nucleasa de MRE11 (Syed y Tainer, 2018).

RAD51: Proteína que tiene acción recombinasa dependiente de ATP y que lleva a cabo la invasión de cadenas de DNA homólogas (González-Prieto y cols., 2013).

RAD54: una proteína multifuncional que cataliza la migración de ramas (BM) de las uniones de Holliday (HJ), además de que puede interactuar físicamente con RAD51 (Bouazoune y cols., 2002), estabilizar y estimular su actividad de intercambio de cadenas de DNA (Zegerman y cols., 2002).

MRE11: proteína de unión a DNA que contiene motivos Nucleasa-MRE11-Metalofosfatasa-N-terminal, que coordinan dos iones Mn^{2+} , responsables de la actividad nucleasa del complejo MRN (MRE11/RAD50/NBS1) (Syed y Tainer, 2018). MRE11 también tiene actividad endonucleasa de cadena sencilla, y exonucleasa 3' -> 5' de doble cadena, además de una débil actividad de desenrollamiento del DNA (Assenmacher y Hopfner, 2004). La actividad nucleasa de MRE11 es dependiente de Mn^{2+} (Syed y Tainer, 2018).

XRCC3: Es una de las 5 proteínas parálogas de RAD51 en vertebrados (Tebbs y cols., 1995 ; Liu y cols., 1998). Actúa en el rompimiento del DNA de doble cadena e interactúa y estabiliza a RAD51. Además, XRCC3 se une a la intersección de los cuatro brazos dúplex de la unión de Holliday (HJ) y a los cruces de horquillas de replicación (Girard, y cols., 2013), terminando el proceso de RH.

RPA: Es una proteína que se une al DNAss, formando un complejo de nucleoproteína que impide que el DNA sea degradado por exonucleasas (Liu y cols., 2006). El complejo RPA protege el DNA monocatenario de las nucleasas, previene la formación de estructuras secundarias que interferirían con la reparación y coordina el reclutamiento y la partida de diferentes factores de mantenimiento del genoma (Shi y cols., 2010).

BRCA1: una proteína que tiene actividad ubiquitina ligasa que media específicamente la formación de cadenas de poliubiquitina unidas a Lys6 y juega un papel central en la reparación del ADN al facilitar las respuestas celulares al daño del DNA (Yarden y cols., 2002).

BRCA2: Es una proteína que activa a la nucleasa MRE11 e interactúa con RAD52. En ratones y humanos se ha visto que está involucrada en la regulación de la localización intracelular de la recombinasa RAD51 y su capacidad de unión al DNA (Gorodetska y cols., 2019).

ATM/PIKK: actúa como regulador de vías de respuesta al daño de DNA (Shimobayashi y Hall, 2014).

DMC1: Es una proteína recombinasa específica de meiosis. Su función es ensamblarse en los sitios de DSB y llevar a cabo la búsqueda de secuencias de DNA alélicas ubicadas en cromátidas homólogas (Shinohara y cols., 1997).

EXO1: Al inicio del mecanismo de RH, EXO1 actúa como nucleasa de dsDNA en dirección 5'→ 3' para llevar a cabo la resección de los extremos del DSB y más adelante en el proceso de recombinación, EXO1 facilita la resolución de las HJ (Lee y cols., 1999).

En *T. vaginalis* no se encontró a las proteínas RAD52, NBS1 y RAD55 y RAD57 (**Tabla 5**).

RAD52: Proteína que se une a los extremos de DNA monocatenario y media la interacción DNA-DNA necesaria para la resección de cadenas de DNA complementarias, además interactúa con la recombinasa RAD51 estimulando su nucleación, sugiriendo su participación en la reparación del DNA mediante recombinación homóloga (Li y cols., 2002).

NBS1: Proteína que forma parte del complejo MRN en *eukariotas*. NBS1 activa la nucleasa MRE11-RAD50 a través de interacciones físicas directas con MRE11. En ausencia de NBS1, el complejo MRE11-RAD50 exhibe una actividad nucleasa más débil (Anand y cols., 2019).

RAD55 y RAD57: proteínas parálogas de RAD51 que forman un heterodímero que al interactuar con RAD51, estimulan su ensamblaje y la estabilidad del filamento (Godin y cols., 2013).

En *T. vaginalis*, se identificó una mutación (S164P) que interrumpe la interacción entre TvRAD51 y TvRAD54 (**Figura 7**). Este resultado concuerda con la ausencia de interacción entre TvRAD51 y TvRAD54 observada en el docking molecular (**Figura 21**). La ausencia de interacción entre estas proteínas podría deberse a una probable modificación estructural en TvRAD51 debido al cambio de serina por prolina en la posición 164, ya que la prolina tiene un carbono alifático como grupo lateral, pero a diferencia de todos los demás aminoácidos, su grupo amino es secundario y también es parte de un anillo de pirrolidina. La rigidez de este anillo disminuye los grados de libertad conformacional y hace que el enlace amida que se forma cuando está en una cadena polipeptídica no tenga libertad de rotación (Herrera y Sferco, 2004)

In vitro, RAD54 aumenta significativamente el intercambio de cadenas mediado por RAD51 (Petukhova y cols., 1998) y estabiliza la unión del filamento de nucleoproteína al ssDNA (Cloud y cols., 2012). La evidencia de que TvRAD51 presente una mutación que impide la interacción con TvRAD54, podría sugerir la participación de TvRAD54 en el mecanismo RH de *T. vaginalis* no es esencial o quizá, durante la evolución, otra proteína asumió el rol de TvRAD54 y realiza su función.

La proteína XRCC3 podría actuar en lugar de RAD52, interactuando directamente con la recombinasa RAD51 y ayudando a su estabilización, puesto que, se ha observado que los parálogos de RAD51 pueden haber asumido roles importantes de RAD52 en la RH durante la evolución (Fujimori y cols., 2001). También se sabe que, en células de vertebrados, XRCC3 sustituye casi por completo la falta de RAD52, mientras que RAD52 solo puede sustituir parcialmente la falta de XRCC3 (Fujimori y cols., 2001). Por otra parte, se ha observado que la proteína BRCA2 sustituye a RAD52 en ratones y humanos, mediando la regulación de la localización intracelular de la recombinasa RAD51 y su capacidad de unión al DNA (Gorodetska y cols., 2019). *T. vaginalis*

codifica para la proteína XRCC3 y BRCA2, por lo que estas podrían sustituir a RAD52 y hacer su función.

Para compensar la ausencia de TvRAD55 y TvRAD57, así como la no interacción de TvRAD51 con TvRAD54 en *T. vaginalis*, TvDMC1 podría regular la estabilización del nucleofilamento de la recombinasa TvRAD51, debido a que se sabe que se requiere RAD51 para estimular el ensamblaje de filamentos DMC1 durante la recombinación meiótica (Brown y Bishop, 2014; Cloud y cols., 2012). Además, hay evidencias bioquímicas que sugieren que este efecto estimulante también puede funcionar en la dirección inversa (Crickard y cols., 2018); es decir, DMC1 podría jugar un papel regulatorio en la formación y estabilización de los nucleofilamentos de RAD51 para reparar las lesiones en el DNA mediante RH en células mitóticas, por lo que esto podría estar ocurriendo en el mecanismo de RH en *T. vaginalis*, ya que es muy probable que estas recombinasas interaccionen entre sí (**Figura 22**) permitiéndole llevar a cabo la invasión de cadenas y completar el mecanismo de RH.

De acuerdo con los resultados obtenidos en los análisis *in silico*, la cascada de activación de la maquinaria de reparación de daño al DNA mediante RH que se propone en *T. vaginalis* es la siguiente: Como primer paso, el heterodímero MRE11/RAD50 actúa como sensor del DSB, como el complejo ortólogo bacteriano SbcC-SbcD que tiene una actividad de endonucleasa monocatenaria y exonucleasa 3'→5' bicatenaria. Además, este complejo sensor de daño podría incluir a la nucleasa EXO1, puesto que, se ha demostrado que en *E. coli*, las nucleasas SbcC-SbcD y EXO1 procesan intermedios de DNA en sitios donde convergen las bifurcaciones de replicación y son necesarias para que la replicación cromosómica se complete normalmente (Wendel y cols., 2018). Estos hallazgos sugieren que EXO1 podría estar realizando la función de NBS1, ya que, en ausencia de esta proteína, el complejo MRE11-RAD50 exhibe una actividad nucleasa más débil (Anand y cols., 2019).

El complejo MRE11/RAD50/EXO1 se localiza en los extremos 5' de la región dañada, se recluta a PIKK (proteína quinasa de la familia PIKK) en el sitio de la lesión y se activa catalíticamente mediante una serie de autofosforilaciones, pasando de un

estado dimérico a uno monomérico, lo que expone su dominio quinasa (Crickard y cols., 2018; Brown y Bishop, 2014). PIKK fosforila a la histona H2A cercana al sitio de la lesión, dando lugar a γ H2A (H2A fosforilada en serina 139). Debido a la modificación de la histona, la condensación del DNA disminuye, aumentando su accesibilidad para las proteínas involucradas en la reparación de los DSB, por lo que γ H2A actúa como sitio de anclaje de las proteínas que participan en la reparación por recombinación homóloga.

El siguiente paso es la ubiquitinación de γ H2A para reclutar a BRCA2 (Breast Cancer Type 2 susceptibility *protein*), la cual activa la nucleasa MRE11 y procesa los extremos del DSB dando lugar a la formación de extremos 3' de cadena sencilla, los cuales serán recubiertos inmediatamente por RPA (Replication *Protein A*) para evitar la formación de estructuras secundarias. Posteriormente, se recluta a la recombinasa RAD51 para realizar la sustitución de RPA. La estabilidad de RAD51 en el ssDNA se ve favorecida por BRCA2, XRCC3 y DMC1. El nucleofilamento de RAD51 (también se podrían estar formando filamentos mixtos de RAD51/DMC1), inicia la invasión a las cadenas homólogas, dando lugar a la formación de la estructura de Holliday. Una vez iniciada la recombinación, se degradan las moléculas de RAD51 y se recluta XRCC3, proteína paróloga de RAD51 que resuelve la estructura de Holliday, trabajando en conjunto con helicasas y con DNA polimerasas para sintetizar las nuevas hebras de DNA. Finalmente, proteínas ligasas unen los extremos y completan la reparación del material genético.

En los ensayos de PCR se observó una mayor expresión del RNAm de *t_{vr}ad51* en los parásitos cultivados en presencia de Cd²⁺, seguida de los parásitos cultivados en presencia de Zn²⁺ (**Figura 25**). Esto podría deberse a que el Zn²⁺ y el Cd²⁺ en exceso pueden dañar el material genético de manera indirecta, provocando un descenso intracelular del contenido de glutatión y reduciendo la actividad de los enzimas antioxidantes, SOD, peroxidasa y catalasa permitiendo la acumulación de ROS y radicales libres (Achanzar y cols., 2001), lo que da lugar a DSB y la activación de la reparación de daño mediante RH en donde participa la recombinasa RAD51.

Estos resultados coinciden con el aumento en los niveles de expresión de TvRAD51 a nivel de proteína en los cultivos expuestos a Zn^{2+} y Cd^{2+} (**Figura 26**). Sin embargo, la expresión de la proteína es menor a la expresión del RNAm. La razón por la que esto ocurra, podría ser que la presencia de los cationes metálicos en el ambiente celular, esté activando algunas metaloproteasas, ya que se sabe que para que estas proteínas funcionen, necesitan de ciertos metales como el Zn^{2+} y Ca^{2+} (Sternlicht y Werb, 2001). Se sabe que el Cd^{2+} compite con los metales esenciales como el Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} y Fe^{2+} , por lo que también podría estar activando a las metaloproteasas (Fotakis y Timbrell, 2006) y estas estén ocasionando la proteólisis de TvRAD51.

En peso molecular de la segunda banda identificada en el Western Blot (37 kDa) (**Figura 27**) coincide con el peso molecular de la proteína TvDMC1. Se realizó un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de TvRAD51 y TvDMC1 en el software Protein BLAST, obteniendo un 62% de identidad (**Figura 28**), por lo que la segunda banda detectada pudiera ser TvDMC1, sugiriendo que esta recombinasa actúe quizá como un factor de estimulación y estabilización para el nucleofilamento de TvRAD51, supliendo la función de TvRAD52 y TvRAD54 o incluso, se podrían estar formando filamentos mixtos de RAD51/DMC1 para la invasión de la cadena de DNA homóloga.

10. CONCLUSIONES

- La proteína TvRAD51 de *T. vaginalis* conserva motivos y dominios funcionales de la familia RECA/RAD51.
- La proteína TvRAD51 de *T. vaginalis* es muy similar a las proteínas RAD51 de otros parásitos protozoarios, *S. cerevisiae* y *H. Sapiens*, sugiriendo propiedades y funciones bioquímicas similares.
- La proteína TvXRCC3 podría sustituir a TvRAD52 en el mecanismo de RH en *T. vaginalis*.
- La recombinasa TvDMC1 podría participar en el mecanismo de RH de *T. vaginalis* interaccionando directamente con la recombinasa TvRAD51.
- *T. vaginalis* podría contar con un mecanismo de RH híbrido (bacteriano y *eukariota*), sugiriendo un sistema intermedio antes de la aparición de NBS1.
- La presencia de cationes metálicos, como Zn^{2+} y Cd^{2+} , induce la sobreexpresión de TvRAD51 de *T. vaginalis* a nivel de RNAm y de proteína.

11. PERSPECTIVAS

- Identificar *in vitro* las proteínas involucradas en la maquinaria de RH de *T. vaginalis*.
- Verificar *in vitro* la sustitución de RAD52 por XRCC3.
- Verificar *in vitro* la formación del complejo MRE11/RAD50/EXO1 y analizar sus propiedades bioquímicas funcionales.
- Determinar la existencia de rupturas de doble cadena en el DNA de *T. vaginalis* por la presencia de cationes tales como Zn^{2+} y Cd^{2+} mediante ensayos de TUNEL.
- Obtener las proteínas recombinantes rTvRAD51 y rTvDMC1.
- Obtener anticuerpos α -TvRAD51 y α -TvDMC1.
- Colocalizar a TvRAD51 y TvDMC1 en *T. vaginalis* bajo tratamiento con luz UV-C, presencia y ausencia de Zn^{2+} y Cd^{2+} mediante microscopía confocal.

12. REFERENCIAS

1. Abdul-Rasheed, O.F. (2010). Association between seminal plasma copper and magnesium levels with oxidative stress in Iraqui Infertile men. *Oman medical journal*. 25(3):168–172.
2. Achanzar, W.E., y cols. (2001). Cadmium-induced malignant transformation of human prostate epithelial cells. *Cancer Res*. 61:455-458.
3. Alderete, J.F., y Garza, G.E. (1984). Soluble *Trichomonas vaginalis* antigens in cell-free culture supernatants. *Mol Biochem Parasitol*. 13:147-58.
4. Alderete, J.F., y Garza, G.E. (1988). Identification and properties of *Trichomonas vaginalis* proteins involved in cytoadherence. *Infection and immunity*. 56(1):28-33.
5. Alderete, J.F., y cols. (1991). Vaginal antibody of patients with trichomoniasis is to a prominent surface immunogen of *Trichomonas vaginalis*. *Genitourin*. 67:220-5.
6. Alderete, J.F., y cols. (1992). Molecular analysis of *Trichomonas vaginalis* surface protein repertoires. *Mol Cell Biol*. 1:173-202.
7. Alderete, J.F., y cols. (1995). Iron mediates *Trichomonas vaginalis* resistance to complement lysis. *Microbial Pathogenesis*. 19(2):93-103.
8. Alderete, J.F., y cols. (2001). Enzymes on microbial pathogens and *Trichomonas vaginalis*: molecular mimicry and functional diversity. *Cell Microbiol* 3. 359-370.
9. Altschul, S.F., y cols. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 215(3):403-10.
10. Alvarez-Sánchez, M.E., y cols. (2007). Negative iron regulation of the CP65 cysteine proteinase cytotoxicity in *Trichomonas vaginalis*. *Microbes Infect*. 9(14-15):1597-605.
11. Alvarez-Sánchez, M.E., y cols. (2008). Polyamine depletion down-regulates expression of the *Trichomonas vaginalis* cytotoxic CP65, a 65-kDa cysteine proteinase involved in cellular damage. *Int. J. Biochem. Cell. Biol*. 40(11):2442.
12. Anand R, Jasrotia A, Bundschuh D, Howard SM, Ranjha L, Stucki M, Cejka P. (2019). NBS1 promotes the endonuclease activity of the MRE11-RAD50 complex by sensing CtIP phosphorylation.

13. Ariza, A., y cols. (2005). Conformational flexibility revealed by the crystal structure of a crenarchaeal RadA. *Nucleic Acids Research*. 33(5):1465-73.
14. Arroyo, R., y cols. (1992). Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*. *Molecular Microbiology*. 6(7):853-852.
15. Arroyo, R., y cols. (1993). Signalling of *Trichomonas vaginalis* for amoeboid transformation and adhesin synthesis follows cytoadherence. *Molecular Microbiology*. 7(2):299-309.
16. Arroyo, R., y cols. (2011). Tricomoniasis: de la biología a la patogenia molecular. *Av. y Perspect*; 3(2).
17. Assenmacher, N., y Hopfner, K.P. (2004). MRE11/RAD50/NBS1: complex activities. *Chromosoma*. 113(4):157–66.
18. Aurrecochea, C., y cols. (2009). GiardiaDB and TrichDB: integrated genomic resources for the eukaryotic protist pathogens *Giardia lamblia* and *Trichomonas vaginalis*. *Nucleic Acids Res*. D526-30.
19. Bachmann, L.H., y cols. (2011). *Trichomonas vaginalis* genital infections: progress and challenges. *Clin Infect Dis*. 53 Suppl 3(Suppl 3):S160-72.
20. Baker, D., y Sali, A. (2001). Protein structure prediction and structural genomics. *Science*. 294(5540):93.
21. Barbier, M. (1979). Biologie de *Trichomonas vaginalis*. *La Revue de Médecine*. 12:35-38.
22. Benchimol, M. (2004). Trichomonads under Microscopy. *Microscopy and Microanalysis*. 10:528-550.
23. Bertin, G., y Averbeck, D. (2006). Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie*. 88(11):1549-59.
24. Bhattacharyya, M.K., y cols. (2004). Molecular players of homologous recombination in protozoan parasites: implications for generating antigenic variation. *Infect Genet Evol*. 4(2):91-8.
25. Bianco, P.R., y cols. (1998). DNA strand exchange proteins: a biochemical and physical comparison. *Front Biosci*. 17;3: D570-603.

26. Bishop, D.K., y cols. (1992). DMC1: a meiosis-specific yeast homolog of *E. coli* recA required for recombination, synaptonemal complex formation, and cell cycle progression. *Cell*. 69(3):439-56.
27. Bishop, D.K. (1994). RecA homologs Dmc1 and Rad51 interact to form multiple nuclear complexes prior to meiotic chromosome synapsis. *Cell*. 79(6):1081–1092.
28. Blum, M., y cols. (2021). The InterPro protein families and domains database: 20 years on. *Nucleic Acids Res*. 49(D1): D344-D354.
29. Botero, D., y Restrepo, M. (1992). Tricomoniasis genito-urinaria. En: Botero D, Restrepo M. *Parasitosis Humanas*. 2da ed. Medellín CIE, pp. 261-265.
30. Bouazoune, K., y cols. (2002). The dMi-2 chromodomains are DNA binding modules important for ATP-dependent nucleosome mobilization. *The EMBO journal*. 21(10):2430–2440.
31. Brown, M.S., y Bishop, D.K. (2014). Brown, M. S., & Bishop, D. K. (2014). DNA strand exchange and RecA homologs in meiosis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(1), a016659.
32. Brown, M.S., y cols. (2015). Small Rad51 and Dmc1 complexes often co-occupy both ends of a meiotic DNA double strand break. *PLoS Genet*. 11(12):e1005653.
33. Buracco, S., y cols. (2018). Differential Effects of Iron, Zinc, and Copper on *Dictyostelium discoideum* Cell Growth and Resistance to *Legionella pneumophila*. *Front Cell Infect Microbiol*. 7:536.
34. Cadena, V.D., y cols. (2006). Tricomoniasis urogenital. *Rev Paceaña Med Fam*. 3(4):84–9.
35. Campbell, W.C. (2001). A historic photomicrograph of a parasite (*Trichomonas vaginalis*). *Trends Parasitol*. 17:499-500.
36. Carlton, J.M., y cols. (2007). Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science*, 315(5809):207-12.
37. Cloud, V., y cols. 2012). Rad51 is an accessory factor for Dmc1-mediated joint molecule formation during meiosis. *Science*. 337(6099):1222-5.
38. Chang, J.H., y cols. (2006). Apoptosis of macrophages induced by *Trichomonas vaginalis* through the phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase

- that locates at downstream of mitochondria-dependent caspase activation. *Int J Biochem Cell Biol.* 38:638-47.
39. Conway, C., y cols. (2002). Two pathways of homologous recombination in *Trypanosoma brucei*. *Molecular Microbiology.* 45(6):1687-1700.
 40. Costamagna, S.R., y Prado-Figueroa, M. (2001). On the ultra-structure of *Trichomonas vaginalis*: cytoskeleton, endocytosis and hydrogenosomes. *Parasitol.* 25(3-4):100–108.
 41. Cothia, C., y Lesk, A. (1986). The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO J.* 5:823-826.
 42. Crickard, J.B., y cols. (2018). Regulation of Hed1 and Rad54 binding during maturation of the meiosis-specific presynaptic complex. *EMBO J.*
 43. Dailey, D.C., y cols. (1990). Characterization of *Trichomonas vaginalis* haemolysis. *Parasitology.* 101 Pt 2:171-5.
 44. Dao, L. (1963). Urogenital Trichomoniasis in male. *Rev Venez Urol.* 15:127-31.
 45. Detlef, D.L. (2000). The Bacterial Replicative Helicase DnaB Evolved from a RecA Duplication. *Genome Research,* 10:5-16.
 46. Doherty, A., y cols. (1996). The helix–hairpin–helix DNA-binding motif: a structural basis for non-sequence-specific recognition of DNA. *Nucleic Acids Research,* 24(13):2488–249.
 47. Engbring, J.A., y Alderete, J.F. (1998a). Three genes encode distinct AP33 proteins involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Molecular Microbiology.* 28(2);305-313.
 48. Engbring, J.A., y Alderete, J.F. (1998b). Characterization of *Trichomonas vaginalis* AP33 adhesin and cell surface interactive domains. *Microbiology.* 144:3011-3018.
 49. Farkas, A., y cols. (2007). Assessment of the environmental significance of heavy metal pollution in surficial sediments of the River Po. *Chemosphere.* 68(4):761-768.
 50. Fernández-Martín, K.G., y cols. (2017). Genome-wide identification, in silico characterization and expression analysis of ZIP-like genes from *Trichomonas vaginalis* in response to Zinc and Iron. *Biometals.* 30(5):663-675.

51. Ferrari, S.R., y cols. (2009). The Mei5-Sae3 protein complex mediates Dmc1 activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 284:11766–11770.
52. Figueroa-Angulo, E.E., y cols. (2012). The effects of environmental factors on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. *Microbes and Infection.* 14(15):1411-1427.
53. Fotakis, G., y Timbrell, J.A. (2006). Role of trace elements in cadmium chloride uptake in hepatoma cell lines. *Toxicology Letters.* 164(2):97-103.
54. Fujimori, A., y cols., (2001). Rad52 partially substitutes for the Rad51 paralog XRCC3 in maintaining chromosomal integrity in vertebrate cells. *The EMBO journal*, 20(19), 5513–5520.
55. Garber, G.E., y Lemchuk-Favel, L. (1990). Association of Production of Cell Detaching Factor with the Clinical Presentation of *Trichomonas vaginalis*. *J Clin Microbiol*, 28:2415-7.
56. Garcia AF, y cols., (2005). *Trichomonas vaginalis* polyamine metabolism is linked to host cell adherence and cytotoxicity. *Infect Immun* 73: 2602-10.
57. Gilbert, R., y cols. (2000). Cytopathogenic effect of *Trichomonas vaginalis* on human vaginal epithelial cells cultured in vitro. *Infect. Immunol.* 68:4200- 6.
58. Girard, P.M., y cols. (2013). Oxidative stress in mammalian cells impinges on the cysteines redox state of human XRCC3 protein and on its cellular localization. *PloS one.* 8(10):e75751.
59. Godin, S., y cols. (2013). The Shu complex interacts with Rad51 through the Rad51 paralogues Rad55-Rad57 to mediate error-free recombination. *Nucleic acids research.* 41(8):4525–4534.
60. González-Prieto, R., y cols. (2013). Rad51 replication fork recruitment is required for DNA damage tolerance. *EMBO J.* 32(9):1307–21.
61. González-Robles, A., y cols. (1995). *Trichomonas vaginalis*: ultrastructural bases of the cytopathic effect. *J Eukaryot Microbiol.* 42(5):641-51.
62. Gopalakrishnan, A.M., y cols. (2017). Multifunctional Involvement of a C2H2 Zinc Finger Protein (PbZfp) in Malaria Transmission, Histone Modification, and Susceptibility to DNA Damage Response. *mBio.* (4):e01298-17.
63. Gorodetska, I., y cols. (2019). BRCA Genes: The Role in Genome Stability, Cancer Stemness and Therapy Resistance. *Journal of Cancer.* 10(9):2109–2127.

64. Grosdidier, A., y cols. (2011). SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. *Nucleic Acids Res.* W270-7.
65. Harp, D.F., y Chowdhury, I. (2011). Trichomoniasis: evaluation to execution. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 157:3-9.
66. Hernández, H.M., y cols. (2014). Biological roles of cysteine proteinases in the pathogenesis of *Trichomonas vaginalis*. *Parasite.* 21:54.
67. Hernández-Gutierrez, R., y cols. (2004). *Trichomonas vaginalis*: characterization of a 39-kDa cysteine proteinase found in patient vaginal secretions. *Experimental parasitology.* 107(3-4):125-135.
68. Herrera, F.E., y Sferco, S.J. (2004). Conformational structure of small peptides containing proline using quantum and molecular dynamics calculations. *Argentine Physical Association. Annals AFA.* 16(1):236-241.
69. Heuchel, R., y cols. (1994). The transcription factor MTF-1 is essential for basal and heavy metal-induced metallothionein gene expression. *EMBO J.* 13(12):2870-5.
70. Hinch, A.G., y cols. (2020). The Configuration of RPA, RAD51, and DMC1 Binding in Meiosis Reveals the Nature of Critical Recombination Intermediates. *Molecular cell.* 79(4):689–701.
71. Hirschi, K.D., y cols. (2000). Expression of Arabidopsis CAX2 in tobacco: altered metal accumulation and increased manganese tolerance. *Plant Physiol.* 124:125–133.
72. Honigberg, B.M., y Brugerolle, G. (1990). *Trichomonads parasitic in humans.* (Springer, Berlin Heidelberg New York).
73. Huang, W.P., y cols. (2000). The itinerary of a vesicle component Aut7p/Cvt5p, terminates in the yeast vacuole via the autophagy/cvt pathways. *The Journal of Biological Chemistry.* 275(8):5845-5851.
74. Johnston, V.J., y Mabley, D.C. (2008). Global epidemiology and control of *Trichomonas vaginalis*. *Curr Opin Infect Dis.* 21:56-64.
75. Jones, R.M., y cols. (2014). BRCA2 and RAD51 promote double-strand break formation and cell death in response to gemcitabine. *Molecular cancer therapeutics.* 13(10):2412–2421.

76. Katakai, K., y cols. (2001). Nitric oxide induces metallothionein (MT) gene expression apparently by displacing zinc bound to MT. *Toxicol Lett.* 119: 103-108.
77. Kelley, L.A., y cols. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc.* 10(6):845-58.
78. Koning, A.P., y cols. (2000). Lateral gene transfer and metabolic adaptation in the human parasite *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biol Evol.* 17:1769-73.
79. Kowalczykowski, S.C. (2015). An overview of the molecular mechanisms of recombinational DNA repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7:a016410.
80. Krejci, L., y cols. (2001). Molecular dissection of interactions between Rad51 and members of the recombination-repair group. *Mol Cell Biol.* 21(3):966–76.
81. Krieger, J.N., y Rein, M.F. (1982). Zinc sensitivity of *Trichomonas vaginalis*: in vitro studies and clinical implications, *J Infect Dis.*, 146(3):341-5.
82. Krieger, J.N., y cols. (1983). Beta-hemolytic activity of *Trichomonas vaginalis* correlates with virulence. *Infect Immun.* 41:1291-5.
83. Kumar, P., y Arya, A. (2018). Ramachandran Plot. *JOUR.*
84. Laskowski, R.A., y cols. (1996). AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J Biomol NMR.* 8(4):477-86.
85. Latif, A.S., y cols. (1987). Urethral trichomoniasis in men. *Sex Transm Dis.* 14(1):9-11.
86. Lee, B.I., y Wilson, D.M. (1999). The RAD2 domain of human exonuclease 1 exhibits 5' to 3' exonuclease and flap structure-specific endonuclease activities. *J. Biol. Chem.* 274:37763–37769.
87. Lee, J.J., y cols. (2011). PCR for diagnosis of male *Trichomonas vaginalis* infection with chronic prostatitis and urethritis. *Korean journal of parasitology;* 50, 157-159.
88. Lehker, M.W., y Alderete, J.F. (1999). Resolution of six chromosomes of *Trichomonas vaginalis* and conservation of size and number among isolates. *J Parasitol.* 85(5):976-9.
89. Levi, M.H., y cols. (1996). Comparison of the InPouch System IP to Diamonds modified medium DMM for the isolation of *Trichomonas vaginalis* Tv. In

- Abstracts of the 96 th General Meeting of the American Society for Microbiology. C-110, pp.20.
90. Li, J., y cols. (2002). Structural and functional versatility of the FHA domain in DNA-damage signaling by the tumor suppressor kinase Chk2. *Mol. Cell* 9. 1045-54.
 91. Lin, Z., y cols. (2006). Origins and evolution of the recA/RAD51 gene family: evidence for ancient gene duplication and endosymbiotic gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103(27):10328-10333.
 92. Wei-Chen Lin y cols., (2009). Identification of microRNA in the protist *Trichomonas vaginalis*. *Genomics*, Volume 93, Issue 5, 87-493.
 93. Lindmark, D.G., y Muller, M. (1976). Antitrichomonad action, mutagenicity, and reduction of metronidazole and other nitroimidazoles. *Antimicrob Agents Chemother*. 10:476-482.
 94. Liu N., y cols., (1998)., XRCC2 and XRCC3, new human Rad51-family members, promote chromosome stability and protect against DNA cross-links and other damages. *Mol Cell*. 1(6):783-93.
 95. Liu, J.S., y cols. (2006). Phosphorylation of replication protein A by S-phase checkpoint kinases. *DNA Repair (Amst)*. 5(3):369-380.
 96. López-Casamichana, M., y cols. (2008). Transcriptional profile of the homologous recombination machinery and characterization of EhRAD51 recombinase in response to DNA damage in *Entamoeba histolytica*. *BMC biología molecular*. 9:35.
 97. Luscombe, N., y cols. (2001). Amino acid-base interactions: a threedimensional analysis of protein-DNA interactions at an atomic level. *Nucleic Acid Research*. 29(13):2860-2874.
 98. Malik, S.B., y cols. (2007). An expanded inventory of conserved meiotic genes provides evidence for sex in *Trichomonas vaginalis*. *PLoS One*. 3(8):e2879.
 99. Martínez, M., y cols. (2006). An engineered plant that accumulates higher levels of heavy metals than *Thlaspi caerulescens* with yields of 100 times more biomass in mine soils. *Chemosphere*. 64:478–485.
 100. Matsuo, Y., y cols. (2006). Roles of the human Rad51 L1 and L2 loops in DNA binding. *FEBS Journal* ,273:3148–3159.

101. Mazin, A.V., y cols. (2000). Tailed duplex DNA is the preferred substrate for Rad51 protein-mediated homologous pairing. *EMBO J.* 19(5):1148–1156.
102. McKean, P.G., y cols. (2001). Identification and characterisation of a RAD51 gene from *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol.* 115(2):209-16.
103. Mendiola, J., y cols. (2011). Relationships between heavy metal concentrations in three different body fluids and male reproductive parameters: a pilot study. *Environmental Health.* 10(1):6.
104. Méplan, C., y cols. (1999). Cadmium induces conformational modifications of wild-type p53 and suppresses p53 response to DNA damage in cultured cells. *J Biol Chem.* 274(44):31663-70.
105. Mering, C., y cols. (2003). STRING: a database of predicted functional associations between proteins. *Nucleic Acids Res.* 31(1):258-61.
106. Meza-Cervantes, P., y cols. (2011). Pyruvate ferredoxin oxidoreductase (PFO) is a Surface-associated cell-binding protein in *Trichomonas vaginalis* and is involved in trichomonal adherence to host caells. *Microbiology.* 157:3469-3482.
107. Moreno-Brito, V., y cols. (2005). A *Trichomonas vaginalis* 120 kDa protein with identity to Hydrogenosome pyruvate:ferredoxin oxidoreductase is a surface adhesion induced by iron. *Cellular Microbiology.* 7(2):245-258.
108. Morris, A.L., y cols. 1992). Stereochemical quality of protein structure coordinates. *Proteins.* 12:345-364.
109. Müller, M. (1993). The hydrogenosome. *Journal of General Microbiology.* 139:2879-2889.
110. Neale, M.J. y Keeney, S., (2006). Clarifying the mechanics of DNA strand exchange in meiotic recombination. *Nature.* Nature. 442:153–158.
111. Netzahualcoyotzi, B.A., y cols. (2019). Cadmium-dependent expression of a new metallothionein identified in *Trichomonas vaginalis*. *Biometals.* 32:887-899.
112. New, J.H., y cols. (1998). Rad52 protein stimulates DNA strand exchange by Rad51 and replication protein A. *Nature.* 391:407–410.
113. Nielsen, M.H., y Nielsen, R. (1975). Electron microscopy of *Trichomonas vaginalis* Donné interaction with vaginal epithelium in human trichomoniasis. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 83:381-9.

114. Ogra, Y., y Suzuki, K.T. (2000). Nuclear trafficking of metallothionein: possible mechanisms and current knowledge. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 46:357-365.
115. Ogura, T., y Wilkinson, A.J. (2001). AAA+ superfamily ATPases: common structure--diverse function. *Genes Cells*. 6(7):575-97.
116. Pan, J., y cols. (2010). Cadmium levels in Europe: implications for human health. *Environmental geochemistry and health*. 32(1):1-12.
117. Pereira-Neves, A., y cols. (2003). Pseudocysts in Trichomonads – New insights. *Protist*. 154:313-329.
118. Peterson, K.M., y Alderete, J.F. (1982). Host plasma proteins on the surface of pathogenic *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun*. 37:755-762.
119. Petrin, D., y cols. (1998). Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clin Microbiol Rev*. 11:300-17.
120. Pettersen, E.F., y cols. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. 25(13):1605-12.
121. Petukhova, G., y cols. (1998). Catalysis of homologous DNA pairing by yeast Rad51 and Rad54 proteins. *Nature*. 393(6680):91-94.
122. Preston, S., y cols. (2000). Biosensing the acute toxicity of metal interactions: Are they additive, synergistic, or antagonistic. *Env Tox Chem*. 19:775-780.
123. Provenzano, D., y Alderete, J.F. (1995). Analysis of human immunoglobulin-degrading cysteine proteinases of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun*. 63:3388-3395.
124. Puchta, H. (1999). Double-strand break-induced recombination between ectopic homologous sequences in somatic plant cells. *Genetics*. 152(3):1173-1181.
125. Puente-Rivera, J., y cols. (2017). The 50kDa metalloproteinase TvMP50 is a zinc-mediated *Trichomonas vaginalis* virulence factor. *Mol Biochem Parasitol*. 217:32-41.
126. Quintas-Granados, L.I., y cols. (2013). TvMP50 is an immunogenic metalloproteinase during male trichomoniasis. *Molecular & cellular proteomics: MCP*. 12(7):1953–1964.
127. Radtke, F., y cols. (1995). *Nucleic Acids Res*. 23(12):2277-86.

128. Rein, M.F., y Muller, M. (1990). *Trichomonas vaginalis* and trichomoniasis. In: Holmes K.K., ed. *Sexually transmitted diseases* (McGraw-Hill, New York), pp. 481–92.
129. Rivera-Martínez, F. (2007). Análisis estructural de la proteína rEhRad51 de *Entamoeba histolytica*. (Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía).
130. Saini, S., y cols. (2017). Zinc depletion promotes apoptosis-like death in drug-sensitive and antimony-resistance *Leishmania donovani*. *Sci Rep.* 7(1):10488.
131. Santos-Diéguez, I. (2014). Tricomoniasis: una visión amplia. *Iatreia.* 27(2):198-205.
132. Satterwhite, C.L., y cols. (2013). Sexually transmitted infections among US women and men: prevalence and incidence estimates, 2008. *Sex Transm Dis.* 40:187-193.
133. Schwebke, J.R., y Burgess, D. (2004). Trichomoniasis. *Clinical Microbiology Reviews.* 17(4):794-803.
134. Schwede, T., y cols. (2003). Swiss-Model: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research.* 31(13): 3381-3385.
135. Sehorn M.G., y cols. (2004). Human meiotic recombinase Dmc1 promotes ATP-dependent homologous DNA strand exchange. *Nature.* 429:433–437.
136. Seitz, E.M., y cols. (2000). DNA Recombination and Repair in the Archaea, (Sections of Microbiology and of Molecular and Cellular Biology Center for Genetics and Development University of California).
137. Shanahan, H.P., y cols. (2004). Identifying DNA-binding proteins using structural motifs and the electrostatic potential. *Nucleic Acids Research.* 32(16):4732–4741.
138. Sheridan, S.D., y cols. (2008). Un análisis comparativo de filamentos de nucleoproteína Dmc1 y Rad51. *Ácidos nucleicos Res.* 36:4057–4066.
139. Shi, W., y cols. (2010). The role of RPA2 phosphorylation in homologous recombination in response to replication arrest. *Carcinogenesis.* 31(6):994–1002.

140. Shimobayashi, M., y Hall, M.N. (2014). Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15:155–162.
141. Shin, D., y cols. (2003). Full-length archaeal Rad51 structure and mutants: mechanisms for RAD51 assembly and control by BRCA2. *The EMBO Journal.* 22(17):4566-4576.
142. Shinohara, A., y cols. (1997). *Saccharomyces cerevisiae* recA homologues RAD51 and DMC1 have both distinct and overlapping roles in meiotic recombination. *Genes Cells.* 2:615–629.
143. Sievers, F., y Higgins, D.G. (2014). Clustal Omega, accurate alignment of very large numbers of sequences. *Methods Mol Biol.* 1079:105-16.
144. Silva-Filho, F.C., y cols. (2002). How laminin-1 can be recognized by the protozoan parasite *Tritrichomonas foetus*: possible role played by the extracellular matrix glycoprotein in both cytoadhesion and cytotoxicity exerted by the parasite. *Parasitol Int.* 51(3):305-7.
145. Solano-González, E., y cols. (2006). Location of the cell-binding domain of CP65, a 65 kDa cysteine proteinase involved in *Trichomonas vaginalis* cytotoxicity. *Int J Biochem Cell Biol.* 38:2114-27.
146. Sorvillo, F., y cols. (2001). *Trichomonas vaginalis*, HIV, and African-Americans. *Emerging Infect Dis.* 7(6):927-932.
147. Sternlicht, M.D., y Werb, Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17:463–516.
148. Story, R.M., y cols. (1993). Relación estructural de proteínas RecA bacterianas con proteínas de recombinación del bacteriófago T4 y levadura. *Science.* 259:1892–1896.
149. Sung, P. (1997). Function of yeast Rad52 protein as a mediator between replication protein A and the Rad51 recombinase. *J. Biol. Chem.* 272:28194–28197.
150. Sutcliffe, S., y cols. (2009). Trichomonosis and subsequent risk of prostate cancer in the Prostate Cancer Prevention Trial. *International journal of cancer.* 124(9):2082-2087.

151. Suzuki, J.S., y cols. (1988). Isolation and identification of metallothionein isoforms (MT-1 and MT-2) in the rat testis. *Biochem J.* 334:695-701.
152. Syed, A., y Tainer, J.A. (2018). The MRE11-RAD50-NBS1 Complex Conducts the Orchestration of Damage Signaling and Outcomes to Stress in DNA Replication and Repair. *Annu Rev Biochem.* 87:263-294.
153. Tebbs R.S., y cols., (1995) Correction of chromosomal instability and sensitivity to diverse mutagens by a cloned cDNA of the XRCC3 DNA repair gene. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 92, 6354–6358.
- 154.
155. Thomas, J.A. (1999). Diet micronutrients and the prostate gland. *Nutr Rev.* 57(4):95-103.
156. Thorburn, A.L. (1974). Alfred François Donné, 1801-1878, discoverer of *Trichomonas vaginalis* and of leukaemia. *Br J Vener Dis.* 50(5):377-80.
157. Torres-Romero JC., y cols. (2020). In silico analysis of putative metal response elements (MREs) in the zinc-responsive genes from *Trichomonas vaginalis* and the identification of novel palindromic MRE-like motif. *Biometals.* 33(4-5):229-240.
158. Toshihiko, A., y cols. (2005). Structure of RadB recombinase from a hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis* KOD1: an implication for the formation of a near-7-fold helical assembly. *Nucleic Acids Research.* 33(10):3412-3426.
159. Twu O, y cols., (2014). *Trichomonas vaginalis* homolog of macrophage migration inhibitory factor induces prostate cell growth, invasiveness, and inflammatory responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111(22):8179-84.
160. Vázquez-Carrillo, L.I., y cols. (2011). The effect of Zn²⁺ on prostatic cell cytotoxicity caused by *Trichomonas vaginalis*. *Journal Of Integrated Omics.* 198-210.
161. Villalpando, J.L., y cols. (2017). TvZNF1 is a C₂H₂ zinc finger protein of *Trichomonas vaginalis*. *Biometals.* 30(6):861-872.
162. Vitkup, D., y cols. (2001). Completeness in structural genomics. *Nature Structural Biology.* 8:482-4.

163. Waalkes, M.P., y cols. (1992). Toxicological principles of metal carcinogenesis with special emphasis on cadmium. *Crit Rev Toxicol.* 22:175-201.
164. Walker, J.E., y cols. (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1(8):945-51.
165. Wei-Hsuan, L., y cols. (2020). Rad51 facilitates filament assembly of meiosis-specific Dmc1 recombinase. *PNAS.* 117-(21):11257-11264.
166. Wendel, B. M., Cole, J. M., Courcelle, C. T., Courcelle, J. (2018). SbcC-SbcD and Exol process convergent forks to complete chromosome replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 115 (2) 349-354.
167. Wetzler, M., y cols. (2012). Peptoid Oligomers: Peptidomimetics for Diverse Biomedical Applications. *Polymer Science: A Comprehensive Reference*, Volume 9, pp.267-287.
168. Willmott, F., y cols. (1983). Zinc and recalcitrant trichomoniasis. *Lancet.* 1:1053.
169. Yadav, M., y cols. (2007). Cysteine proteinase 30 in clinical isolates of *T. vaginalis* from symptomatic and asymptomatic infected women. *Exp Parasitol.* 116:399-406.
170. Yarden, R., Pardo-Reoyo, S., Sgagias, M. (2002). BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage. *Nat Genet* 30, 285–289.

Apéndice

Amortiguador de transferencia para membrana de nitrocelulosa

Tris-base 25 mM	3.03 g
Glicina 0.2 M	15.01 g
Metanol absoluto	200 ml
Agua destilada cbp	2000 ml

Amortiguador salino de fosfatos (PBS) pH 7.0

NaCl (Merck) 137 mM	8.00 g
KCl (Merck) 2.7 mM	0.20 g
Na ₂ HPO ₄ (Merck) 4.3 mM	1.15 g
Agua destilada cbp	1000.00 ml

Amortiguador de muestra 1 x (BM 1X)

SDS-amortiguador 2x	400µl
B-mercaptoetanol 5%	50µl
Azul de bromofenol (stock 10 mg/ml)	50µl

Amortiguador de acetatos 100 mM (amortiguador de activación de proteasas)

Acetato de Sodio (Sigma)	13.60 g
Agua destilada	800 ml

Ajustar al PH deseado (4.5, 5.0 y 6.0) con ácido acético glacial (Merck). Al momento de agregar β-mercaptoetanol al 0.1%.

Tris-Cl/SDS pH 6.8 4x

Tris-base (Sigma) 5mM	6.05 g
SDS (Sigma) 0.13 mM	0.40 g

Tris-Cl/SDS pH 8.8 4x

Tris-base (Sigma) 15 mM	18.6 g
SDS (Sigma) 0.13 mM	0.40 g

Disolver en 20 ml de agua destilada, ajustar el pH y aforar a 100 ml

SDS-amortiguador 2x

Trizma-base 1.52 g

SDS 2.00 g

Disolver en 50 ml de agua destilada y ajustar el pH a 6.8. posteriormente aforar a 100ml.

Solución Colorante de proteínas (Azul brillante de Coomassie)

	0.05%	0.2%
Metanol	500 ml	500 ml
Ácido Acético glacial	100 ml	100 ml
Agua destilada	400 ml	400 ml
Azul de Coomassie R250	0.50 ml	2.00 g

Tapar perfectamente el matraz y disolver toda la noche. Filtrar con papel "Whatman" no. 1 y proteger de la luz. Almacenar a temperatura ambiente.

Amortiguador TBE 10x

Triz base (Sigma) 108 g

Ácido Bórico (Merck) 55 g

EDTA (Sigma) 9.3 g

Agua destilada cbp 1 000 g

Amortiguador de lisis (extracción de DNA genómico)

SDS (Sigma) 0.2 %

NaCl 100 mM

EDTA 100 mM, pH 8.0

Tris-HCl 100 mM, pH 8.0

Gracias a la Universidad Autónoma de la Ciudad de México por el apoyo económico otorgado para la impresión y empastado de esta tesis.