

# UACM

Universidad Autónoma  
de la Ciudad de México

*Nada humano me es ajeno*

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

LICENCIATURA EN CIENCIAS GENÓMICAS

**Caracterización de la metalotioneína-1 (TvMT-1) de *Trichomonas vaginalis*.**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

P R E S E N T A

**BRYAN ALEXIS NETZAHUALCOYOTZI RODRÍGUEZ**

D I R E C T O R A

**Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez**

Ciudad de México, junio 2019

## 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.

## **DIRECTORA**

**Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez**

Profesora-Investigadora

Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

## **ASESORES**

**Dra. Minerva Camacho Nuez**

Profesora-Investigadora

Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

**Dra. Lilia López Cánovas**

Profesora-Investigadora

Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

**Dr. Mauricio Castañón Arreola**

Profesor-Investigador

Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

**Dr. Jonathan Puente Rivera**

Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Universidad Autónoma de la Ciudad de México por todo el apoyo y financiamiento del proyecto que desarrollé durante el proceso de titulación, gracias al Posgrado en Ciencias Genómicas por permitir mi colaboración en los laboratorios de investigación, a la Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez por todos los conocimientos que obtuve durante su dirección. Al Hospital General por permitirme el uso del microscopio confocal. A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme el uso del Bioterio.

## **DEDICATORIA**

A la Dra. Elizabeth, mi directora de tesis, por el apoyo que me brindó durante mi transcurso en el laboratorio y por todas las enseñanzas.

A los asesores, que me guiaron en este camino para mejorar.

A Jonathan, Laura, Alma y Jaqui que me ayudaron a crecer como estudiante y por todo el conocimiento que me transmitieron.

A mi familia que estuvo a mi lado en las noches de desvelo y todas mis frustraciones para llegar hasta este punto.

A Alejandra y la Sra. Guadalupe que me apoyaron en todo momento, tanto profesional como personalmente, que estuvieron en mi camino, dándome fuerzas para seguir adelante y recordándome que todo se puede con esfuerzo.

Al “wero” y “chino” que estuvieron a mi lado cuando los experimentos no salían como queríamos.

A todos mis amigos de la carrera y del posgrado, que siempre estuvieron en las buenas y en las malas, a los buenos amigos que me enseñaron de los errores.

# ÍNDICE

## RESUMEN

### 1. INTRODUCCIÓN

1.1.	Tricomoniasis	10
1.2.	Epidemiología	10
1.3.	Morfología	11
1.4.	Ciclo de vida	13
1.5.	Genoma	15
1.6.	Metabolismo	15
1.7.	Patogénesis	16
1.7.1.	Citoadherencia	17
1.7.2.	Citotoxicidad	18
1.7.3.	Evasión de la respuesta inmune	19
1.7.4.	Hemólisis	20
1.8.	Efecto de iones metálicos en los seres vivos	20
1.8.1.	Metales presentes en el tracto urogenital masculino	23
1.8.2.	Zinc	24
1.8.3.	Cadmio	24
1.8.3.1.	Ingreso del cadmio a la célula	25
1.8.3.2.	Efectos del cadmio a la salud	25
1.8.3.3.	Regulación génica por cadmio	27
1.8.4.	Mecanismos de detoxificación de metales	30
1.9.	Metalotioneínas	32
1.9.1.	Estructura	33
1.9.2.	Clasificación	35
1.9.3.	Función	37
1.9.4.	Inductores	38
1.9.5.	TvZNF1 y su regulación por zinc	38
1.9.6.	Regulación de la biosíntesis de metalotioneínas	39

<b>2.</b>	<b>ANTECEDENTES</b>	<b>43</b>
-----------	---------------------	-----------

<b>3.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>46</b>
-----------	----------------------	-----------

<b>4.</b>	<b>HIPÓTESIS</b>	<b>46</b>
-----------	------------------	-----------

<b>5. OBJETIVOS</b>	47
<b>6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b>	48
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	49
7.1. Análisis <i>in-silico</i>	49
7.2. Extracción de DNA genómico	49
7.3. Amplificación por PCR	50
7.4. Clonación	51
7.4.1. Preparación de células competentes	51
7.4.2. Clonación en TOPO-TA	51
7.4.3. Extracción de DNA plasmídico	52
7.4.4. Secuenciación	52
7.5. Análisis de expresión de <i>tvmt-1</i>	52
7.5.1. Cultivo de <i>T. vaginalis</i> en presencia de iones metálicos	52
7.5.2. Extracción de RNA total	53
7.5.3. Síntesis de cDNA	53
7.5.4. Amplificación por PCR semi-cuantitativa	54
7.6. Identificación de TvMT-1 en <i>T. vaginalis</i>	55
7.6.1. Diseño y selección del péptido sintético	55
7.6.2. Obtención de sueros policlonales anti-TvMT-1	56
7.6.3. Ensayo de Western Blot	56
7.6.4. Inmunolocalización por microscopia confocal	57
<b>8. RESULTADOS</b>	58
8.1. Análisis bioinformático	58
8.2. Amplificación mediante PCR del gen <i>tvmt-1</i> de <i>T. vaginalis</i>	61
8.3. Clonación y Extracción de DNA plasmídico	64
8.4. Secuenciación	66
8.5. Análisis de expresión de <i>tvmt-1</i> de <i>T. vaginalis</i>	68
8.6. Inmunodetección de TvMT-1 en <i>T. vaginalis</i>	72
8.7. Inmunolocalización de TvMT-1 en <i>T. vaginalis</i>	75
<b>9. DISCUSIÓN</b>	77
<b>10. CONCLUSION</b>	80
<b>11. BIBLIOGRAFÍA</b>	86

## ÍNDICE DE FIGURAS

**FIG. 1.** Morfología de *Trichomonas vaginalis*.

**FIG. 2.** Ciclo de vida de *Trichomonas vaginalis*.

**FIG. 3.** Rutas de toxicidad por presencia de iones metálicos.

**FIG. 4.** Efecto del cadmio en la señalización y expresión de genes.

**FIG. 5.** Mecanismos de detoxificación de metales pesados presentes en microorganismos procariotas y eucariotas.

**FIG. 6.** Ejemplos de estructura tridimensional de metalotioneínas de distintos organismos.

**FIG. 7.** Regulación de la expresión génica de las MTs.

**FIG. 8.** Identificación de metalotioneínas de *T. vaginalis*.

**FIG. 9.** Análisis de metalotioneínas de otros organismos.

**FIG. 10.** DNA genómico de *T. vaginalis*.

**FIG. 11.** Amplificación del gen *tvmt-1*.

**FIG. 12.** Extracción de DNA plasmídico y Amplificación de *tvmt-1*.

**FIG. 13.** Alineamiento de secuencias.

**FIG. 14.** RNA total de *T. vaginalis*.

**FIG. 15.** Expresión del gen *tvmt-1* de *T. vaginalis* en presencia y ausencia de iones divalentes.

**FIG. 16.** Expresión relativa del gen *tvmt-1* en presencia y ausencia de cationes divalentes.

**FIG. 17.** Titulación de sueros anti-TvMT-1.

**FIG. 18.** Expresión relativa de la proteína TvMT-1.

**FIG. 19.** Inmunolocalización de TvMT-1 en *T. vaginalis*.

## ÍNDICE DE TABLAS

**TABLA 1.** Concentraciones de iones metálicos en el plasma seminal de hombres sanos.

**TABLA 2.** Clasificación de las MTs en distintas familias de acuerdo a su estructura primaria.

**TABLA 3.** Concentraciones de iones metálicos en cultivo.

## **ABREVIATURAS**

**mM.** Milimolar

**Ap.** Proteína de adhesión

**ARE.** Elemento de respuesta antioxidante

**cDNA.** Ácido desoxirribonucleico complementario

**RNA.** Ácido ribonucleico

**DNA.** Ácido desoxirribonucleico

**DNAg.** Ácido desoxirribonucleico genómico

**Zn.** Zinc

**Cd.** Cadmio

**TYM.** Medio extracto tripticasa-levadura

**kDa.** Kilodaltones

**VEC.** Células del epitelio vaginal

**CP.** Cisteín proteinasa

**Cu.** Cobre

**Mg.** Magnesio

**Mn.** Manganeseo

**Fe.** Hierro

**Co.** Cobalto

**Na.** Sodio

**K.** Potasio

**Hg.** Mercurio

**Ag.** Plata

**Pb.** Plomo

**HSPs.** Proteínas de choque térmico

**MT.** Metalotioneína

**μM.** Micromolar

**g.** Gramos

**Bi.** Bismuto

**MRE.** Elementos de respuesta a metal

**MTF-1.** Factor de transcripción 1 en respuesta a metal

**GRE.** Elemento de respuesta a glucocorticoides

**RT-PCR.** Transcripción reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa

**qRT-PCR.** Reacción en Cadena de la Polimerasa-Cuantitativa en Tiempo Real

**μl.** Microlitros

**min.** Minutos

**rpm.** Revoluciones por minuto

**PCR.** Reacción en Cadena de la Polimerasa

**nt.** Nucleótido

**PBS.** Buffer fosfato salino

**HRP.** Peroxidasa de rábano picante

**pb.** Pares de bases

**Cys.** Cisteína

**NCBI.** National Center for Biotechnology Information

**PDB.** Protein Data Bank

## RESUMEN

La tricomoniasis es una infección causada por el parásito *Trichomonas vaginalis*, es una de las más frecuentes a nivel mundial. El parásito infecta el tracto urogenital humano, principalmente el femenino, y es capaz de adaptarse al microambiente manteniendo una infección crónica. Se sabe que el  $Zn^{2+}$  a una concentración de 1.6 mM, es capaz de resolver o autolimitar la infección de *T. vaginalis*, por lo que el parásito es incapaz de colonizar el tracto urogenital masculino. Se han descrito factores como el factor de transcripción dedos de zinc de *T. vaginalis* (TvZNF1) y el factor de transcripción de respuesta a metales (MTF-1) en el humano, que son regulados por la presencia de iones metálicos. Estos factores son capaces de unirse a elementos reguladores de metales (MRE) que se encuentran en moléculas llamadas metalotioneínas (MT). Las MT son proteínas de bajo peso molecular capaces de quelar iones metálicos, por lo que mantienen la homeostasis celular y control del estrés oxidativo. El objetivo de este trabajo fue determinar los genes de MTs presentes en *T. vaginalis* y expresión en presencia y ausencia de cationes como  $Zn^{2+}$  y  $Cd^{2+}$ . Los resultados del análisis bioinformático del genoma de *T. vaginalis* mostraron la formación de dominios repetidos en las secuencias de las MTs de *T. vaginalis*. Se mostró un incremento en la expresión de *tvmt-1* hasta de 3000 veces en presencia de  $Cd^{2+}$  y 6 veces en presencia de  $Zn^{2+}$  con respecto al control sin la adición de algún catión. Para TvMT-1 en presencia de  $Cd^{2+}$  se observó un incremento en la cantidad de la proteína de hasta 3 veces más y en presencia de  $Zn^{2+}$  de 2 veces más con respecto del control sin adición de algún catión, TvMT-1 en los ensayos de inmunolocalización se observó en el citoplasma del parásito.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. Tricomoniasis**

Tricomoniasis es una infección de transmisión sexual (ITS) causada por el parásito *Trichomonas vaginalis*. Esta infección es sintomática en mujeres, se asocia a consecuencias como vaginitis, cervicitis, secreciones malolientes, y dolor abdominal, además de complicaciones severas incluyendo: infertilidad, resultados adversos durante el embarazo como partos prematuros, bebés con bajo peso al nacer y otras como predisposición al cáncer cervical (Spiegel y col., 1990; Wolner Hanssen y col., 1989). Sin embargo, en los hombres más del 75% de los infectados son asintomáticos, el resto presenta síntomas como uretritis, prostatitis y epididimitis, además de complicaciones como infertilidad, predisposición a cáncer de próstata, se produce por daño al epitelio urogenital e inhibición de la apoptosis (Krieger y col., 1982; Krieger y col., 1995). Además, tanto en hombres como en mujeres la infección está asociada a un aumento en el riesgo de infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (Sutcliffe y cols., 2009). El principal tratamiento para la tricomoniasis está restringido a la clase de 5-nitroimidazoles, metronidazol y sus derivados como, metronidazol benzoato, además del tinidazol, aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, EE. UU.) (Bitencourt y cols., 2018).

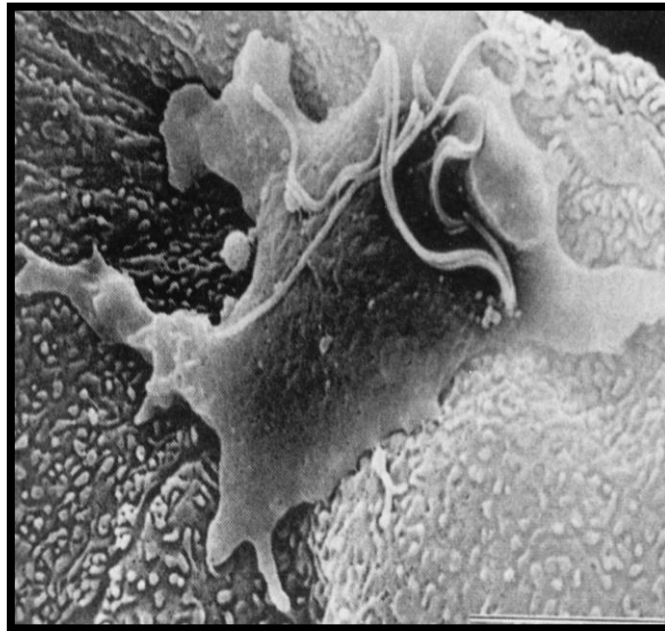
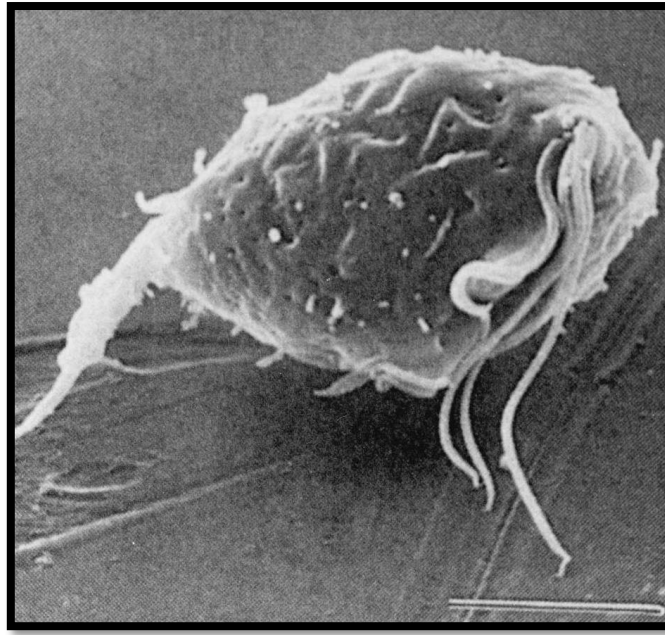
### **1.2. Epidemiología**

En el año 2016 la OMS (Organización Mundial de la Salud) reportó un estimado de 357 millones de nuevos casos de infecciones de transmisión sexual como: clamidia, gonorrea, sífilis y tricomoniasis, de las cuales, 143 millones de casos son adjudicados a la tricomoniasis, siendo ésta la que presenta mayor número de casos anualmente (OMS, 2016). En México se reportaron en 2014/76,729 casos, en 2015/61,128 casos, en 2016/47,009 casos, en 2017/47,004 y en 2018/42,603 casos, hasta la semana 52 de cada año. En el 2019 hasta la semana 13 se han reportado en Veracruz (1,404), Puebla (1,133), Estado de México (1,390), Chiapas (577) y Tamaulipas (509), siendo estos estados los de mayor incidencia del país (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2018).

### 1.3. Morfología

*T. vaginalis* es uno de los parásitos más estudiados, este patógeno presenta un tamaño de 10  $\mu\text{m}$  de longitud y 7  $\mu\text{m}$  de ancho. Este protozoario apicomplexa presenta cinco flagelos de los cuales, cuatro se encuentran en la porción anterior y el quinto está adosado a la membrana ondulante, que a su vez esta soportada por una costa delgada no contráctil. Estas estructuras son las encargadas de proporcionarle una motilidad temblorosa que es característica del microorganismo. El núcleo del parásito está ubicado en la parte anterior, rodeado por una envoltura nuclear porosa. *T. vaginalis* presenta una estructura hialina tipo varilla denominada axostilo que comienza en el núcleo y divide al protozoo longitudinalmente, penetra a través del extremo posterior del parásito terminando en una punta afilada; se ha propuesto que esta estructura es la encargada de anclarse al epitelio vaginal (Petrin y cols., 1998).

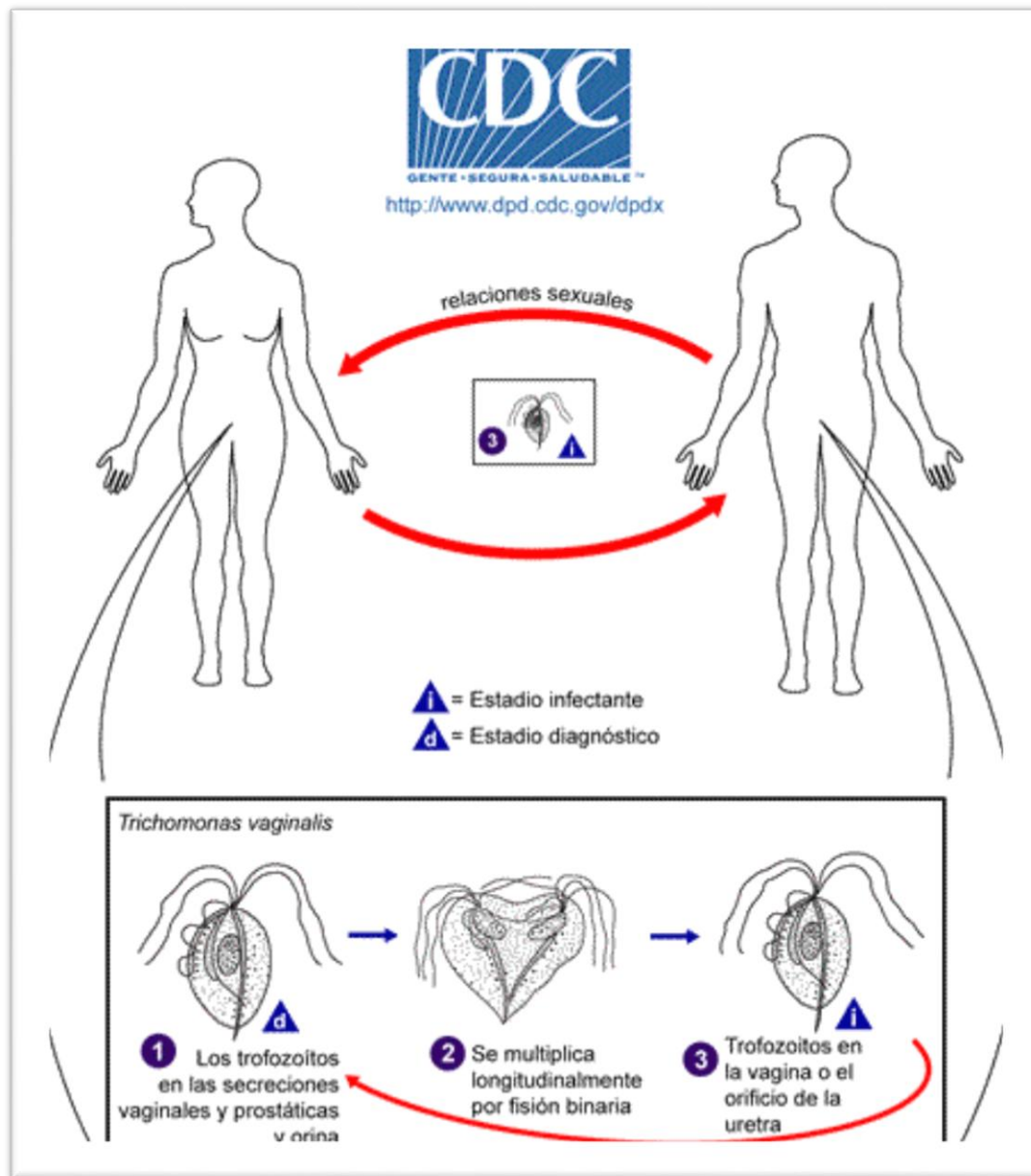
La morfología de *T. vaginalis* se ve afectada por las condiciones microambientales en las que se encuentra. En cultivo el parásito tiende a presentar una forma ovalada o de pera, sin embargo, cuando éste se une a células epiteliales vaginales toma una forma ameboide. También se ha propuesto que en condiciones desfavorables o de estrés este puede redondearse e internalizar sus flagelos, dando una forma característica de pseudoquiste. *T. vaginalis* se compone principalmente de fibras de actina y tubulina presentes en el citoesqueleto. El parásito presenta dos conjuntos de gránulos uno paracostal y otro paraxostilar, una característica distintiva de *T. vaginalis* es, que el segundo se encuentra dispuesto a lo largo del axostilo en tres filas paralelas que se puede visualizar por microscopia electrónica (Petrin y cols., 1998).



**Figura 1. Morfología de *Trichomonas vaginalis*.** **A** Forma ameboide característica que presenta el parásito en cultivo *in-vitro*. **B** Forma de trofozoito que adquiere el parásito cuando se encuentra adherido a células del epitelio (Petrin y cols., 1998).

#### **1.4. Ciclo de vida**

*T. vaginalis* presenta un ciclo de vida relativamente simple, su reproducción es asexual y ocurre por fisión binaria longitudinal, no presenta huéspedes intermediarios, este parásito se adhiere a la mucosa de la vagina donde permanecen a pesar de las condiciones adversas del microambiente. La transmisión de *T. vaginalis* se lleva a cabo de persona a persona únicamente durante el contacto sexual con personas infectadas (Schwebke y cols., 2004).



**Figura 2. Ciclo de vida de *Trichomonas vaginalis*.** El ciclo que presenta el parásito es simple (Schwebke y cols., 2004).

## 1.5. Genoma

*T. vaginalis* presenta un genoma con un tamaño de 160 Mb, el cual está distribuido en 6 cromosomas, presenta ~60,000 genes que codifican para proteínas, ~65 de los genes contienen intrones con un sitio de splicing conservado de 12 nucleótidos en la región 3' del RNAm. Además, el genoma de *T. vaginalis* presenta genes que codifican para los RNAs de transferencia (tRNAs) para todos los aminoácidos que codifican a las proteínas y 250 RNAs ribosomales. El parásito presenta 59 familias de repetidos entre los que destacan transposones, retrotransposones y virus, abarcando un total de ~39 Mb de todo genoma. También el genoma de *T. vaginalis* presenta el gen de DICER-like, 2 genes argonautas y 41 genes helicasa, sugiriendo la existencia de RNA de interferencia (Carlton y cols., 2007).

*T. vaginalis* presenta 29 genes que codifican para proteínas que participan en la reparación del daño al ADN, 75 proteínas de tipo GP63-like homólogas a proteínas de superficie de *Leishmania major*, características por tener un dominio transmembrana C-terminal predicho como un anclaje de la superficie celular. Además, *T. vaginalis* presenta ~650 proteínas homologas a BspA caracterizadas por presentar una repetición rica en leucina. También dentro del genoma de *T. vaginalis* hay 446 genes que codifican para proteasas de las cuales 6 son aspartato-proteasas, 220 cisteína-proteasas, 123 metalo-proteasas, 80 serina-proteasas y 17 treonina-proteasas (Carlton y cols., 2007). El parásito presenta un solo miembro de la familia retropepsina de VIH-1 de tipo aspartato peptidasa con una posible actividad como inhibidor de la peptidasa anti-VIH, incluso presenta proteínas de tipo subtilisina con actividad en el procesamiento de proteínas de superficie, además de la asparaginasa que es de tipo treonina peptidasa y 3 proteínas similares a la cistatina, inhibidores naturales de la peptidasa que regulan la actividad de la ceptina peptidasa (Carlton y cols., 2007).

## 1.6. Metabolismo

*T. vaginalis* es un organismo eucariota similar en muchos aspectos a otros eucariotas, es un parásito obligado ya que depende de su hospedero por carecer de muchas vías de síntesis de *novo*, siendo incapaz de sintetizar ácidos grasos saturados e insaturados y colesterol, debido a que no presenta genes que codifican para enzimas que participan en la degradación o síntesis de lípidos. Sin embargo, es capaz de usar

aminoácidos arginina como sustrato para la producción de energía (Mack y Muller, 1980). También *T. vaginalis* es incapaz de llevar a cabo la síntesis de poliaminas, y su obtención se lleva a cabo por la actividad de un sistema antiporter putrescina/espermina, proceso que introduce 1 molécula de espermina por cada 2 moléculas de putrescina que son secretadas. Se ha observado que esta vía presenta una doble actividad, durante su inhibición con diamino-2-butanona (DAB) se incrementa la unión al epitelio vaginal, sin embargo, la citotoxicidad se inhibe. La putrescina es sintetizada por la enzima ornitina descarboxilaza mediante la vía de arginina hidrolasa para la producción de energía en el parásito (Álvarez Sánchez y cols., 2008).

El parásito no presenta mitocondrias, sin embargo, presentan estructuras semejantes para la obtención de energía denominados hidrogenosomas, que al igual que las mitocondrias, tienen un diámetro de 0.5 a 1  $\mu$ m y se encuentran rodeadas por una doble membrana, sin embargo, a diferencia de la mitocondria este orgánulo no contiene ADN. Los hidrogenosomas son el sitio de oxidación fermentativa del piruvato por medio de la ferredoxina oxidoreductasa la cual no está presente en las mitocondrias, también presentan Coenzima A Sintetasa de  $\beta$ -succinil encargada de llevar a cabo la catálisis de ATP por fosforilación a nivel de sustrato, también estos organelos están encargados de producir hidrógeno molecular, además de procesar la mitad de los carbohidratos de la célula y presentan enzimas homologas a las que se encuentran en otros organismos tanto eucariotas como procariotas (Petrin y cols., 1998). Se ha sugerido que el hidrogenosoma de *T. vaginalis* ha experimentado una evolución reductiva comparable a otros protistas que poseen proteomas mitocondriales reducidos (Carlton y cols., 2007).

### **1.7. Patogénesis**

El parásito presenta diferentes propiedades de virulencia para colonizar a su hospedero. Estas propiedades de virulencia son modificadas por factores que existen en el microambiente del tracto urogenital de humano, como: el pH, la temperatura y la presencia de cationes. A continuación, se describirá cada una de las propiedades de virulencia, las moléculas que participan y los factores que la afectan.

### 1.7.1. Citoadherencia

Para llevar cabo el proceso de adhesión el parásito presenta proteínas como las adhesinas AP120, AP65, AP51, AP33 y AP23. Durante la adhesión a las células se observa un incremento en la expresión génica de estas adhesinas. Durante la adhesión, *T. vaginalis* perturba el complejo de unión en las células epiteliales, produciendo una disminución en la resistencia eléctrica transepitelial, la alteración en el patrón de distribución de proteínas complejas funcionales, como se observó para E-caderina, y una ampliación del espacio entre las células epiteliales. Estos efectos dependen de la virulencia del parásito, la expresión de proteínas de adhesión en la superficie del parásito y la concentración de hierro en el medio (Alderete y cols., 1988; Vieira y cols., 2015).

Se ha descrito que la regulación de la expresión de las moléculas involucradas en el mecanismo de adhesión se ve afectada por presencia de hierro el cual es un elemento esencial para los organismos vivos desde los más simples hasta organismos más complejos. El hierro contribuye a funciones biológicas, como la síntesis de ácidos nucleicos, transporte de oxígeno y las reacciones metabólicas. *T. vaginalis* ha desarrollado múltiples sistemas de captación de hierro, como receptores para hololactoferrina, hemoglobina (HB), haemina (HM) y unión a grupo hemo, así como adhesinas a eritrocitos y células epiteliales. El hierro desempeña una función crucial para el proceso de la adhesión debido a que, durante la presencia del hierro, la citoadherencia incrementa, se modula la adhesión a la matriz extracelular y la expresión de la cisteín-proteinasas como CP30 y CP62 que participan también en el proceso de adhesión. Estas CPs participan también en la activación de precursores inactivos de APs presentes en la superficie, que pasarían a conformaciones activas tras la digestión específica, o bien podrían intervenir en la modificación de los receptores de las células diana. Estas APs se encuentran enmascaradas en la superficie del parásito por proteínas específicas. Las CPs eliminan de forma específica proteínas inmunogénicas de enmascaramiento, permitiendo que las AP lleven a cabo su función en el reconocimiento y adhesión a las células del hospedador (Vieira y cols., 2015).

Las proteínas recombinantes como AP65, AP51 y AP33 compiten por la unión a células HeLa, como si fueran las adhesinas originales de *T. vaginalis*. Además, se ve un incremento en la cantidad de proteína cuando el organismo es crecido en un medio rico con hierro (García y cols., 2003).

La AP65 es una de las adhesinas más abundantes que participan en el mecanismo de adhesión del parásito. El mecanismo transcripcional de regulación por hierro que modula a *ap65-1*, involucra la participación de tres factores transcripcionales Myb1, Myb2 y Myb3 mediante una secuencia conservada que funciona como promotor de respuesta a hierro. También se ha sugerido que existe una regulación post-transcripcional por hierro basado en una interacción de RNA-proteína, este elemento de respuesta se localiza en regiones no traducidas del RNAm (Hsu y cols., 2012; Hsu y cols., 2013).

### **1.7.2. Citotoxicidad**

Las CP de *T. vaginalis* se encuentran en diferentes compartimentos celulares, tales como: lisosomas y membrana plasmática, o secretadas al medio de cultivo a través de exosomas, median la citotoxicidad a través de la membrana plasmática. *In vivo*, las CP se han encontrado en las secreciones vaginales de pacientes con tricomoniasis aguda, y algunas CP son inmunogénicas. Al menos cinco proteínas de tipo cisteín-proteinasas se han descrito, siendo estas CP70, CP65, CP39, CP25 y CP20, implicadas en la interacción entre parásitos y células prostáticas DU-145. La citotoxicidad hacia las células DU-145 es 80% más baja que en las células HeLa. Además, los parásitos muestran una forma ovalada y se forman pseudópodos al entrar en contacto con las células DU-145, pero no se observaron trofozoítos ameboides. (Quintas-Granados y cols., 2013).

La CP65 lleva a cabo la degradación de colágena IV y fibronectina, siendo inmunogénica en pacientes con tricomoniasis. Está reportado que las concentraciones de hierro reducen la actividad proteolítica al igual que la cantidad de CP65 y la citotoxicidad de *T. vaginalis* (Álvarez Sánchez y cols., 2007). En presencia de Zn<sup>2+</sup> a una concentración de 1.6 mM la expresión y la cantidad de proteína también se ven disminuidas, sin embargo, un estudio demuestra que la adición de putrescina exógena logra recuperar la actividad proteolítica a nivel de transcrito, transcrito y por lo tanto el

mecanismo de citotoxicidad (Vázquez Carrillo y cols., 2011). Otra de las CPs que participan en el mecanismo de citotoxicidad es CP39 capaz de degradar colágena I, III, IV, y V, fibronectina y hemoglobina humana, e inmunoglobulinas A y G, son inmunogénicas lo que sugiere que juega un papel importante en la infección. Al igual que CP65, CP39 es regulada por hierro (Hernández y cols., 2004).

Se han propuesto funciones importantes para CP en diversos procesos tales como citotoxicidad, citoadherencia, metabolismo, invasión de células hospedadoras, degradación de moléculas, factores de virulencia, hemólisis y evasión de la respuesta inmune del huésped, entre otros. (Hernández y cols., 2014)

La MP50 es una molécula que se ha demostrado que interviene en el mecanismo de citotoxicidad con actividad proteolítica y que causa daño a las células del hospedero, y pertenecen a la subfamilia A de metaloproteinasas de tipo amino-peptidasa. Esta molécula es regulada por zinc y posee una maquinaria similar al de otras proteínas que responden a iones metálicos, con acción de un factor de transcripción MTF-1. El mecanismo de regulación de MP50 es similar a la regulación que esta mediada por hierro que se da en la adhesina *ap65-1*, sin embargo, debido a la presencia del factor de transcripción MTF-1, esta expresión también se verá regulada por la presencia de zinc en el medio (Villalpando y cols., 2017).

### **1.7.3. Evasión de respuesta inmune**

Las CPs son capaces de degradar la porción C3 del complemento en la superficie del organismo; esto le permite al organismo evadir la destrucción mediada por el complemento, sin embargo, aún no se han identificado completamente las CP que llevan a cabo este mecanismo. Se ha observado que la resistencia al complemento depende de una alta concentración de hierro, un nutriente que es verdaderamente abundante durante la menstruación (Hernández y cols., 2014).

Entre las moléculas que son capaces de llevar a cabo esta función se ha encontrado a CP39 de *T. vaginalis*, una proteinasa de 39 KDa y con un punto isoeléctrico de 4.5, esta proteína es de tipo papaína (una familia de proteínas que incluye endopeptidasas, aminopeptidasas, dipeptidil peptidasas y otras enzimas con actividades tanto exo-peptolíticas como endo-peptolíticas) (Hernández y cols., 2014).

Al igual que muchos otros parásitos protozoarios, *T. vaginalis* presenta variaciones fenotípicas como un mecanismo de evasión inmunológica. Se ha identificado un inmunógeno de superficie llamado P270, una glicoproteína que presenta el epítotope repetido DREGRD, importante para la unión del anticuerpo con parásitos vivos. En este mecanismo de evasión el hierro modula la localización de P270; esta reportado que parásitos crecidos en ausencia de hierro tienen expresión de P270 (Dailey y cols., 1991). Otro inmunógeno que está presente en la superficie de todos los parásitos, es el P230, que sufre cambios conformacionales que le permiten evadir el anticuerpo (epítotope de variación fenotípica). La IgG vaginal, que es reactiva al P230 de *T. vaginalis*, no fue citolítica, incluso en presencia de complemento (Petrin y cols., 1998).

#### **1.7.4. Hemólisis**

La identificación de una CP de 60 kDa en *T. vaginalis* capaz de degradar la hemoglobina, respalda la hipótesis de que este parásito puede usar la hemoglobina como fuente de hierro. Los parásitos metabólicamente activos son necesarios para la lisis de los eritrocitos. Los inhibidores de la CP reducen en gran medida la lisis de eritrocitos, lo que sugiere que las CP pueden ser un factor lítico implicado en el mecanismo de hemólisis. La lisis de los eritrocitos parece estar mediada por receptores de proteínas en las superficies de eritrocitos y parásitos. La evidencia empírica de los estudios con eritrocitos humanos sugiere que las proteínas similares a la perforina pueden estar involucradas. (Hernández y cols., 2014).

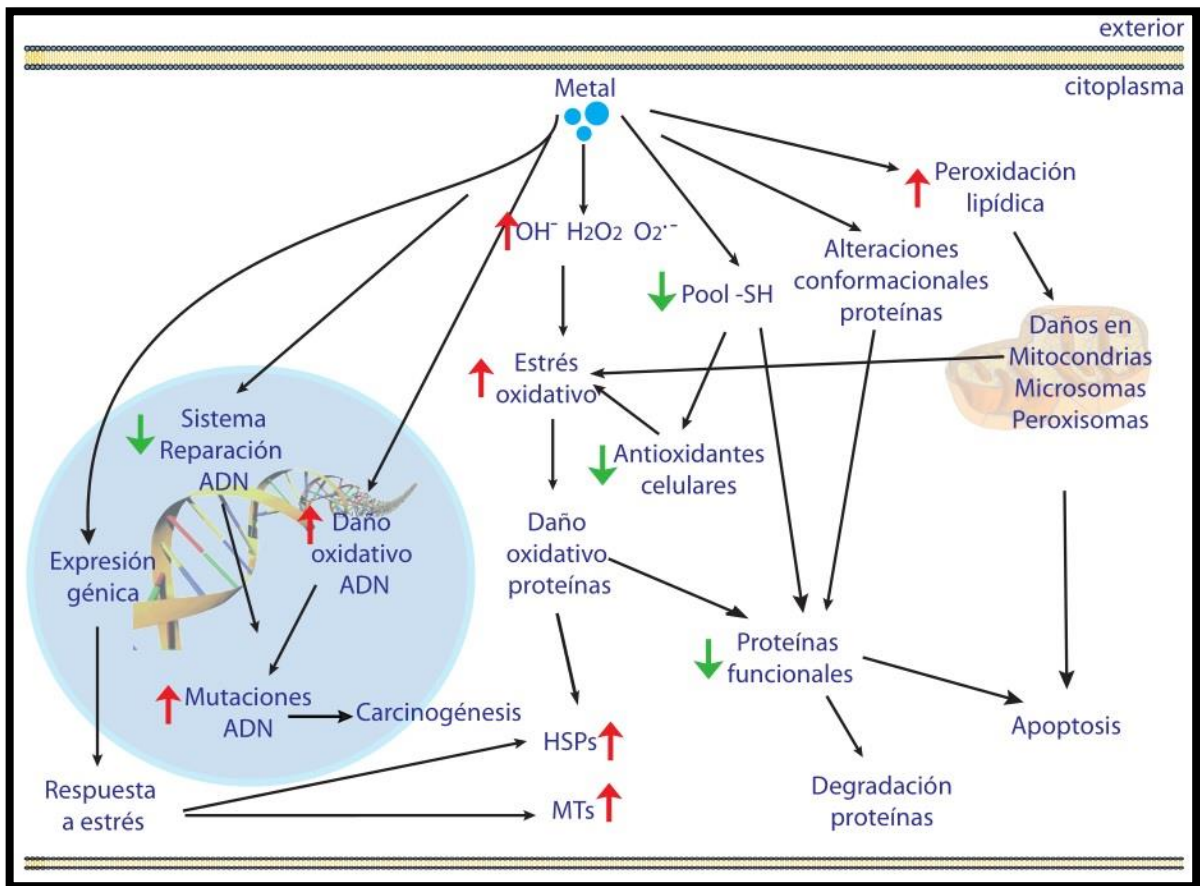
#### **1.8. Efecto de iones metálicos en los seres vivos**

Algunos metales como:  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{2+}$  y  $\text{K}^{2+}$  desempeñan funciones significativas en los seres vivos, contribuyen estabilizando estructuras y moléculas biológicas, o funcionan como cofactores en una gran cantidad de reacciones enzimáticas. Son esenciales para el metabolismo y crecimiento celular, aunque se requieran en concentraciones muy bajas. En cambio, otros como:  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Pt}^{2+}$ , son considerados como no esenciales, además de que son muy tóxicos incluso a concentraciones muy bajas (Bertin y cols., 2006).

Todos los metales presentan características únicas que en todo momento deben ser evaluadas, se debe tomar en cuenta si estos presentan o no algún riesgo para la salud

o que perjudiquen el medio ambiente. Algunos metales son componentes naturales encontrados en diferentes ecosistemas, además, dependiendo de la ubicación geográfica la concentración de ion metálico varía. Los iones metálicos que requiere el organismo para llevar a cabo sus funciones metabólicas se encuentran mezclados con otros metales para ser introducidos en el ambiente, como consecuencia de las actividades que realizan los humanos. Sin embargo, se sabe que algunos de ellos pueden interactuar entre sí de forma aditiva, en cambio otros actúan de forma antagonica o sinérgica. (Preston y cols., 2000).

Los diferentes estados de valencia de un compuesto influirán en la biodisponibilidad y el efecto que tengan sobre los seres vivos, cada compuesto esta biodisponible cuando se encuentra de forma libre y además, es capaz de pasar a través de la membrana citoplasmática, sin embargo, la biodisponibilidad del compuesto también se verá afectada por la condiciones físico-químicas del ambiente en el que se encuentre por ejemplo: pH, concentración de oxígeno, salinidad e incluso la presencia de otros iones. Cabe destacar que no solo este tipo de condiciones afectará al organismo, sino también condiciones biológicas como actividad metabólica o quelación (Bondarenko y cols., 2008).



**Figura 3. Rutas de toxicidad por presencia de iones metálicos.** En el diagrama se muestran las vías que el metal va a activar o inactivar en la célula. HSPs: proteínas de choque térmico. MTs: metalotioneínas. Flecha roja: aumento. Flecha verde: disminución (Bertin y cols., 2006).

### 1.8.1. Metales presentes en el tracto urogenital masculino

En los seres humanos se han realizado estudios que han puesto de manifiesto la importancia de la presencia de iones metálicos en la salud, y su efecto en la salud reproductiva, sin embargo, el daño celular puede darse incluso a concentraciones bajas. Se debe tomar en cuenta que la mayoría de los metales pesados son nocivos, alterando el eje hipotalámico-pituitario o incluso directamente en el proceso de espermatogénesis (Mendiola y cols., 2011). En la siguiente tabla se presentan algunos iones metálicos que podemos encontrar en el plasma seminal de hombres sanos.

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

<b>Ion metálico</b>	<b>Concentración</b>
<b>Plomo</b>	29 µg/L
<b>Cadmio</b>	0.8 µg/L
<b>Mercurio</b>	11.5 µg/L
<b>Magnesio</b>	12.62 mg/dL
<b>Cobre</b>	173.29 µg/mL
<b>Manganeso</b>	0.7 µg/L
<b>Hierro</b>	28.7 p.p.m
<b>Zinc</b>	154.6 mg/L

### **1.8.2. Zinc**

El zinc es el segundo metal de transición más abundante en organismos vivos después del hierro, se incorpora en aproximadamente el 10% de las proteínas humanas y es necesario para más de 300 enzimas (Buracco y cols., 2018). Es un metal esencial fundamental para todos los seres vivos. Comprende el centro catalítico y estructural de una gran variedad de proteínas que intervienen en una amplia gama de funciones fisiológicas que incluyen en la síntesis de ADN y ARN, crecimiento celular, síntesis proteica, metabolismo energético, defensa antioxidante celular, desarrollo cerebral, formación ósea y sistema inmune función. Está presente en las seis principales clases funcionales de enzimas y se requiere catalíticamente para la actividad de ADN y ARN polimerasas. También es el componente estructural de muchos reguladores de la transcripción que se unen al ADN, donde se requieren para el plegamiento adecuado y la unión al ADN (Kumari y cols., 2017).

La importancia del zinc en la célula se destaca aún más porque es el único metal que necesitan toda clase de enzimas. Contribuye a mantener el equilibrio redox celular mediante diversos mecanismos. Además, está involucrado en la apoptosis de células de cáncer de mamíferos, lo que sugiere que este micronutriente tiene varias funciones en el mantenimiento de los mecanismos celulares fundamentales. (Saini y cols., 2017). El principal punto de control para la homeostasis del zinc es la regulación de la absorción de zinc a través de la membrana plasmática. Poco se sabe sobre el mecanismo y la regulación de la absorción de zinc en mamíferos y plantas. (Zhao y cols., 1997).

### **1.8.3. Cadmio**

El cadmio (Cd), es un metal pesado que se acumula en el ambiente como resultado de las actividades industriales, como: la fabricación de baterías (níquel-cadmio), quema de combustibles fósiles, generación de polvos por el proceso de fabricación de cemento y fertilizantes fosfatados. También se utilizan pigmentos a base de  $Cd^{2+}$  para crear tintes, pinturas, plásticos y cerámica. Estas actividades industriales son consideradas como una gran fuente de emisión a la atmósfera y de contaminación para mantos acuíferos y suelos. Los ríos contaminados con Cd pueden irrigar tierras de cultivos, además de que el Cd 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. Se considera que la mayor cantidad de Cd en el suelo proviene del uso de fertilizantes de fosfatos para la agricultura, lo cual produce que se acumule a lo largo de la cadena alimenticia en plantas y animales (Farkas y col. 2007; Pan y col. 2009).

#### **1.8.3.1. Ingreso del cadmio a la célula**

La entrada de  $\text{Cd}^{2+}$  a la célula se lleva a cabo por diversas vías, dependiendo del tipo celular y de las condiciones fisiológicas. Los mecanismos responsables de la acumulación de  $\text{Cd}^{2+}$ , se deben a la competencia del  $\text{Cd}^{2+}$  y metales esenciales como el  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{2+}$  que tienen un sistema de transporte específico. Una tercera parte del Cd entra al hepatocito por canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y sugieren que la presencia de antagonistas de canales de Ca como la nifedipina y verapamilo, reducen la entrada de  $\text{Cd}^{2+}$ , confirmando una interferencia con el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ . Debido a que el  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Cd}^{2+}$  tienen un radio iónico y carga similar se puede explicar por qué los dos elementos tienen rutas similares de entrada en la célula (Fotakis y col, 2006).

#### **1.8.3.2. Efectos del cadmio a la salud**

Muchos metales no esenciales son conocidos contaminantes inorgánicos, persistentes y tóxicos en nuestro planeta. La toxicidad del metal puede surgir de la interacción con biomoléculas, como proteínas o ácidos nucleicos, cuya estructura y función nativa puede alterarse (De Francisco y cols., 2017).

La exposición crónica al  $\text{Cd}^{2+}$  puede causar efectos adversos en riñón, hígado, pulmón, páncreas, testículos, placenta y hueso (Satarug y col. 2010); sin embargo, este metal puede disparar mecanismos adaptativos, como generar especies reactivas de oxígeno (ERO) que actúan como mediadores de la señalización celular y la respuesta anti-apoptótica. Esta respuesta tiene importancia médica ya que este tipo de exposición se ha asociado con varios tipos de cánceres (Liu y col. 2009). Los efectos de la toxicidad por  $\text{Cd}^{2+}$  dependen del tipo de exposición, ya sea a través de la inhalación de aire contaminado, particularmente cerca de fundidoras y las incineradoras o del humo del cigarro, consumo de alimentos y agua contaminados. Además, la deficiencia de metales esenciales como el  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$  en el cuerpo humano facilita la

absorción de  $\text{Cd}^{2+}$ . Se estima que entre un 10-50% de  $\text{Cd}^{2+}$  se absorbe en pulmón, mientras que a nivel gastrointestinal la absorción es del 8%. El  $\text{Cd}^{2+}$  asimilado, es captado por el hígado donde forma complejos con pequeños péptidos como el glutatión (GSH) ( $\text{Cd}$ -GSH) o con proteínas de bajo peso molecular como la MT ( $\text{Cd}$ -MT) y es secretado en la bilis o bien liberado a la circulación (Storelli 2009; Ololade y col. 2011).

El  $\text{Cd}^{2+}$  es nefrotóxico y el daño renal se manifiesta con proteinuria, que se determina por un incremento de proteínas de bajo peso molecular como transferrina, albúmina, N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa (NAG) y  $\beta$ 2-microglobulina en la orina que son utilizadas como marcadores de daño renal. La continua exposición además de causar disfunción tubular, también puede progresar a daño glomerular con una disminución en la filtración glomerular (GFR). El  $\text{Cd}^{2+}$  se encuentra asociado a una alta mortalidad por cáncer. El  $\text{Cd}^{2+}$  regula la expresión del gene *aeg-1*, cuya proteína codificada podría ser importante para el desarrollo del tumor, progresión y metástasis a través del factor NF- $\kappa$ B en células de cáncer de mama (Luparello y col., 2012).

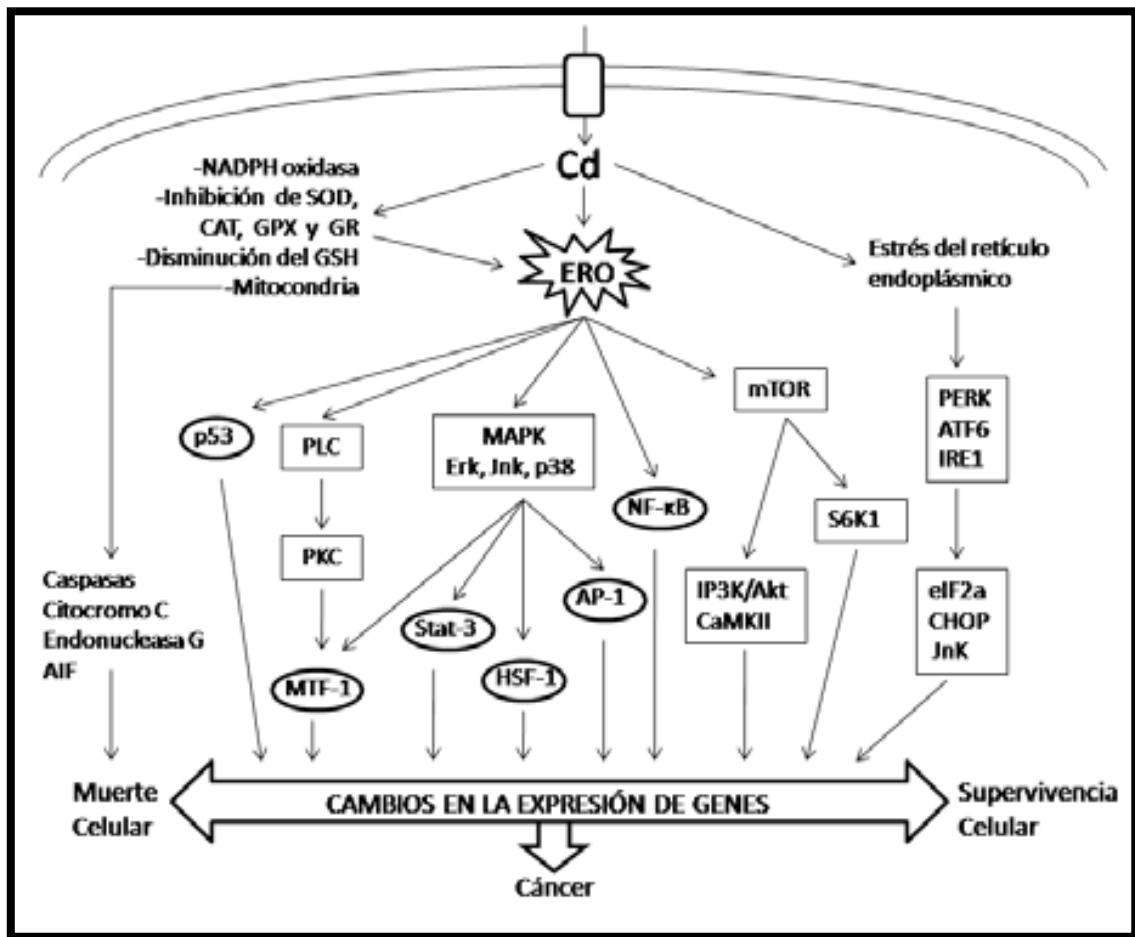
Varios mecanismos han sido propuestos para explicar el daño inducido por el  $\text{Cd}^{2+}$  en el organismo y las especies reactivas de oxígeno (ERO) son consideradas como mediadores importantes en esta respuesta. Las ERO son moléculas radicales o no radicales libres que son consideradas como agentes oxidantes, se caracterizan por ser muy reactivos, debido a que tienden a sustraer un electrón de moléculas estables con la finalidad de alcanzar su estabilidad electroquímica. Las ERO comprenden al: radical  $\text{O}_2$ , peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo y lipoperóxidos que se han relacionado con una variedad de enfermedades. El  $\text{Cd}^{2+}$  puede generar ERO de manera indirecta, provocando daño en el ADN, en proteínas, en membranas y alterando la cadena de electrones mitocondrial. La alteración funcional de la mitocondria por el  $\text{Cd}^{2+}$  se da primero, una interacción del  $\text{Cd}^{2+}$  con los grupos -SH de cisteínas de las proteínas de la membrana mitocondrial disipando el potencial de membrana, que provoca un desacoplamiento y posteriormente, una inhibición de la cadena respiratoria con la generación de ERO que causa la lipoperoxidación mitocondrial (Mao y col., 2011).

Las células cuentan con una variedad de antioxidantes endógenos de tipo enzimático y no enzimático para controlar las ERO generadas durante el estrés oxidativo. Entre los antioxidantes no enzimáticos tenemos al ácido ascórbico (vitamina C), el  $\alpha$ -

tocoferol (vitamina E), la albúmina, la MT, el GSH, por mencionar algunos. El glutatión es considerado como un antioxidante importante, debido a que ayuda a mantener los grupos SH de las proteínas en estado reducido y también ayuda a remover peróxidos tóxicos. Para evitar estos efectos es necesario reducir la disponibilidad de  $Cd^{2+}$  en el suelo y las plantas mediante la neutralización de acidez del suelo; además de mantener una dieta rica en hierro para que la absorción intestinal de  $Cd^{2+}$  se reduzca (Mao y col., 2011).

### **1.8.3.3. Regulación génica por cadmio**

El cadmio propicia la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) vía la mitocondria o la NADPH oxidasa, pero también por la inhibición de las enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX), la glutatión-reductasa (GR) o por la disminución en el contenido de GSH. Además, el  $Cd^{2+}$  activa diferentes cascadas de señalización que son sensibles a las ERO como: la fosfolipasa C (PLC), la 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 ARN ligada al RE (PERK), proteína reclutadora de inositol 1 (IRE1) y la cinasa trifosfato inositol/proteína cinasa B (PI3K/Akt). El daño en la mitocondria, así como el estrés del retículo endoplásmico y las cascadas de señalización, favorecen la activación de diversos factores de transcripción como el factor de transcripción-1 que responde a metales (MTF-1), factor de transcripción de choque térmico 1 (HSF-1), transductor de señal y activador de la transcripción-3 (Stat-3), proteína activadora-1 (AP-1), factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), activador del factor de transcripción 6 (ATF-6), factor de transcripción Chop (proteína homóloga a C/EBP), factor de iniciación de la traducción eucariótica 2  $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ), 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).



**Figura 4. Efecto del cadmio en la señalización y expresión de genes.** La regulación por cadmio afecta muchas vías de señalización involucradas en distintos procesos celulares, debido a la generación de especies reactivas de oxígeno (Zhang y cols., 2010).

La exposición a  $\text{Cd}^{2+}$  está asociada con la inflamación inducida por el ión, involucrando la producción y liberación de citocinas tales como la interleucina- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8) y el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). La respuesta mediada por el TNF- $\alpha$ , involucra la infiltración de células inflamatorias, la generación de ERO y la regulación de la expresión de otras citocinas. El  $\text{Cd}^{2+}$  puede inducir inflamación, pero las bases moleculares no se conocen con exactitud (Lag y col., 2010).

Diversos reportes en la literatura han contribuido a ampliar la lista de genes que responden al  $\text{Cd}^{2+}$ ; entre ellos los del ciclo celular, respuesta inmune, metabolismo, oncogenes y transportadores. Sin embargo, se ha determinado que los genes más expresados son los relacionados con las MTs, las proteínas de choque térmico (Hsp) y la apoptosis (Wang y col., 2012).

Recientemente, el grupo de Zhang y col. en 2012, determinaron que el  $\text{Cd}^{2+}$  induce un incremento en los niveles de  $\text{Zn}^{2+}$  en el hígado y riñón que se correlaciona con la expresión del ARNm y la síntesis de la MT, dándole al  $\text{Zn}^{2+}$  un papel positivo. El  $\text{Zn}^{2+}$  interacciona con el factor de transcripción MTF-1 formando un complejo que se une a elementos ARE en la región promotora del gen de la MT para inducir su expresión. Otra de las proteínas que se inducen en respuesta a la exposición de  $\text{Cd}^{2+}$  es la Hsp70 que se activa rápidamente en respuesta al estrés y tiene gran importancia en la protección y tolerancia al  $\text{Cd}^{2+}$ . Como molécula chaperona, la Hsp70 tiene la capacidad para unirse a proteínas en proceso de desnaturalización y así prevenir su degradación, dicha proteína puede ser considerada como una respuesta adaptativa inducida por el  $\text{Cd}^{2+}$ , permitiendo a las células realizar sus funciones esenciales para sobrevivir (Selim y col., 2012). Un ensayo de expresión reveló que el gen hsp70-1 es activado por cadmio, el cual indujo fuertemente la expresión de hsp70-1 tras 5 y 15 horas después de la exposición (Wirth y cols., 2002).

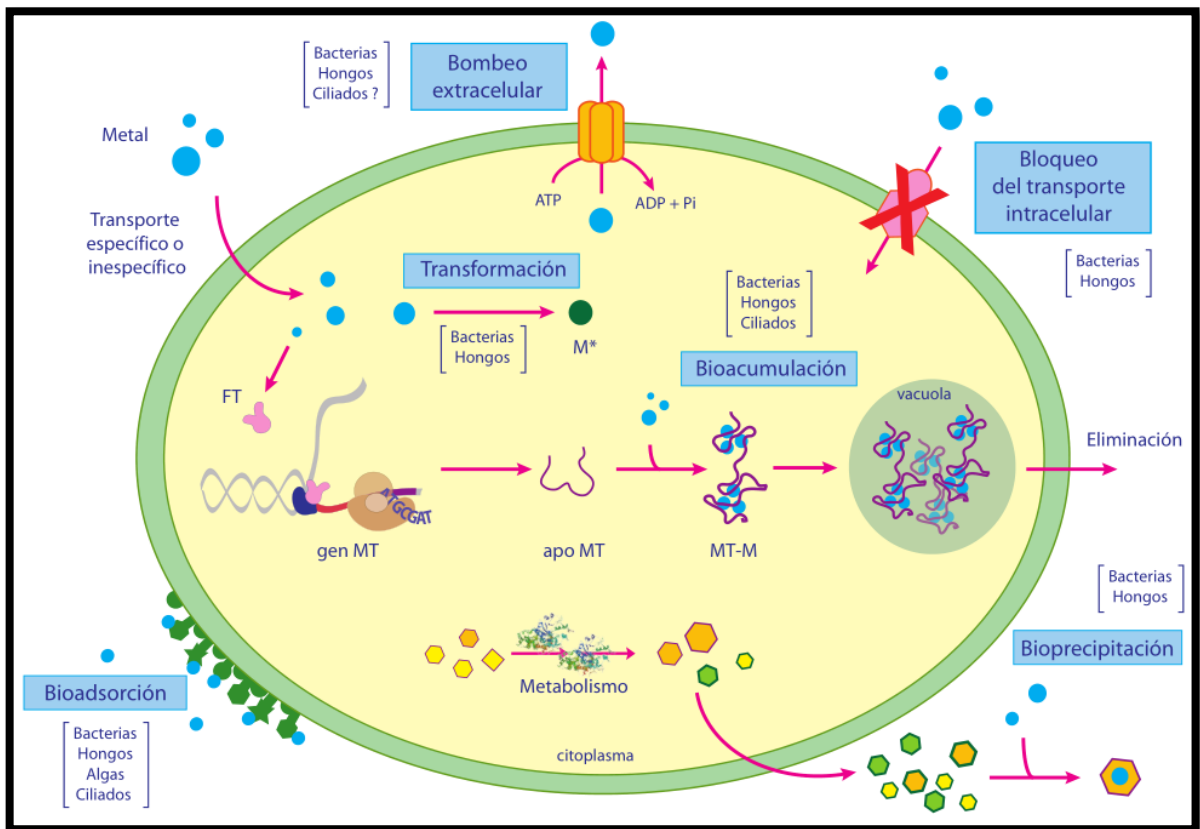
La apoptosis inducida por  $\text{Cd}^{2+}$ , involucra las vías intrínseca y extrínseca. La vía intrínseca es mediada por señales de estrés celular (daño al ADN) y la activación de la caspasa-9 mientras la extrínseca implica la activación de receptores de muerte Fas y la activación de la caspasa-8. La caspasa-8 y 9 activan a las caspasas efectoras 3 y 7, que participan en la muerte celular. Por lo tanto, la generación de ERO, la alteración

del potencial de membrana mitocondrial y la activación de la caspasa-9, representan los principales elementos de la vía apoptótica mitocondrial. Por otro lado, estudios realizados en osteoblastos que fueron pre-tratados con el inhibidor de la cinasa Erk 1/2, señalan una disminución en la apoptosis inducido por el  $Cd^{2+}$ . Varios metales pesados incluyendo al  $Cd^{2+}$  pueden activar la vía de señalización de la cinasa serina/treonina mTOR provocando la muerte por apoptosis. Sin embargo, dependiendo de la concentración de  $Cd^{2+}$ , la célula puede desarrollar respuestas de adaptación a la apoptosis inducida por el metal (Arbon y col., 2012).

#### **1.8.4. Mecanismos de detoxificación de metales**

Todos los metales, especialmente los no esenciales, tienen efectos tóxicos sobre los seres vivos. Por esta razón la célula presenta una serie de mecanismos de resistencia frente a estos contaminantes ambientales (Gadd, 2000).

El bloqueo del transporte intracelular es un mecanismo de resistencia típicamente bacteriano, y se expresa en presencia de metales no esenciales que utilizan los sistemas de transporte activo de metales esenciales. La modificación química del ión metálico se da procesos metabólicos celulares para que el ión metálico sea transformado a una forma menos tóxica para la célula. El bombeo extracelular del ión metálico, consiste en expulsar mediante sistemas de transporte dependientes de energía, los cationes metálicos que se acumulan en el citoplasma (Silver y cols., 2005). La bioprecipitación es un mecanismo propio de hongos y bacterias, capaces de excretar al medio una serie de productos metabólicos (compuestos reducidos de azufre o ácidos orgánicos) que inmovilizan los cationes metálicos tóxicos de manera inespecífica. La bioadsorción consiste en la captación inespecífica y pasiva de los iones metálicos por polímeros o estructuras de la superficie celular (paredes, cápsulas) (Lovley, 2000). La bioacumulación consiste en la inmovilización citoplasmática de los cationes metálicos uniéndolos a una molécula ligando y, en algunos organismos, la posterior compartimentalización del complejo molécula ligando-metal. Finalmente, el complejo metal-ligando es eliminado de la célula como complejo no tóxico. En los seres vivos existen tres tipos principales de moléculas queladoras de metales pesados implicadas en bioacumulación: las MTs, las fitoquelatinas (FQs), y el tripéptido glutathion (GSH) (Rauser, 1999).



**Figura 5. Mecanismos de detoxificación de metales pesados presentes en microorganismos procaríotas y eucaríotas.** Se observan los procesos de: bioprecipitación, bombeo extracelular del ion metálico, bioadsorción y bioacumulación. M: Metal pesado, M\*: Metal reducido o metilado, MT: Metalotioneína, MT-M: Complejo MT-metal, FT: Factor de Transcripción. Entre paréntesis se indican los grupos de microorganismos que presentan alguno de estos mecanismos (Gutiérrez y cols., 2008).

Poco se conoce sobre los mecanismos de detoxificación de metales en ciliados, siendo la bioacumulación el mejor estudiado en estos microorganismos, aunque no se descarta la existencia de otros (Díaz y cols., 2006).

En diversas especies de ciliados se ha descrito la presencia de inclusiones metálicas en el citoplasma, o en el interior de vacuolas en células expuestas a distintos metales pesados. Estas inclusiones se observan como gránulos electrodensos mediante microscopía electrónica de transmisión, independientemente del metal empleado. Es probable que estas acumulaciones representen complejos formados por los cationes metálicos y MTs, de modo que los metales pesados no se encuentren en forma biodisponible y por lo tanto no sean tóxicos para la célula. Tales acumulaciones metálicas también han sido detectadas en diversos ciliados mediante microscopía de fluorescencia (Díaz y cols., 2006).

Las principales moléculas queladoras responsables de la bioacumulación de metales, tienen naturaleza peptídica y pueden ser péptidos sintetizados enzimáticamente (GSH y fitoquelatinas), o proteínas codificadas genéticamente: MTs (Piccini y cols., 1994).

### **1.9. Metalotioneínas**

Las MTs fueron descubiertas en el año 1957 en el córtex de hígado de caballo, se encontró una proteína responsable de la acumulación de cadmio (Margoshes y Vallee, 1957). Después se demostró que las MTs además de cadmio, son capaces de unir zinc y cobre (Kägi y Vallee 1960; Pulido et al. 1966). En la actualidad se ha demostrado que las proteínas son capaces de unir hasta 17 iones metálicos distintos, tanto monovalentes como divalentes, aunque algunos autores afirman que *in vivo* sólo se pueden unir a  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Bi^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  y  $Ag^{2+}$ . La afinidad con los distintos metales varía según el metal y los tipos de MTs. La capacidad de quelación también varía, y depende de la estructura de la MT (Coyle y cols., 2002).

Desde la primera MT purificada de caballo hasta la actualidad, se han descrito más de 200 MTs en diversos organismos. Las MTs se han identificado en vertebrados e invertebrados (artrópodos, moluscos, equinodermos, nemátodos y anélidos), microorganismos eucariotas (hongos y levaduras, microalgas y protozoos), microorganismos procariotas (cianobacterias y proteobacterias) y en plantas. La gran

cantidad de MT detectadas hasta ahora demuestra claramente la existencia de isoformas intermedias, lo que hace que la clasificación de MT sea muy desafiante (Robinson y cols., 2001).

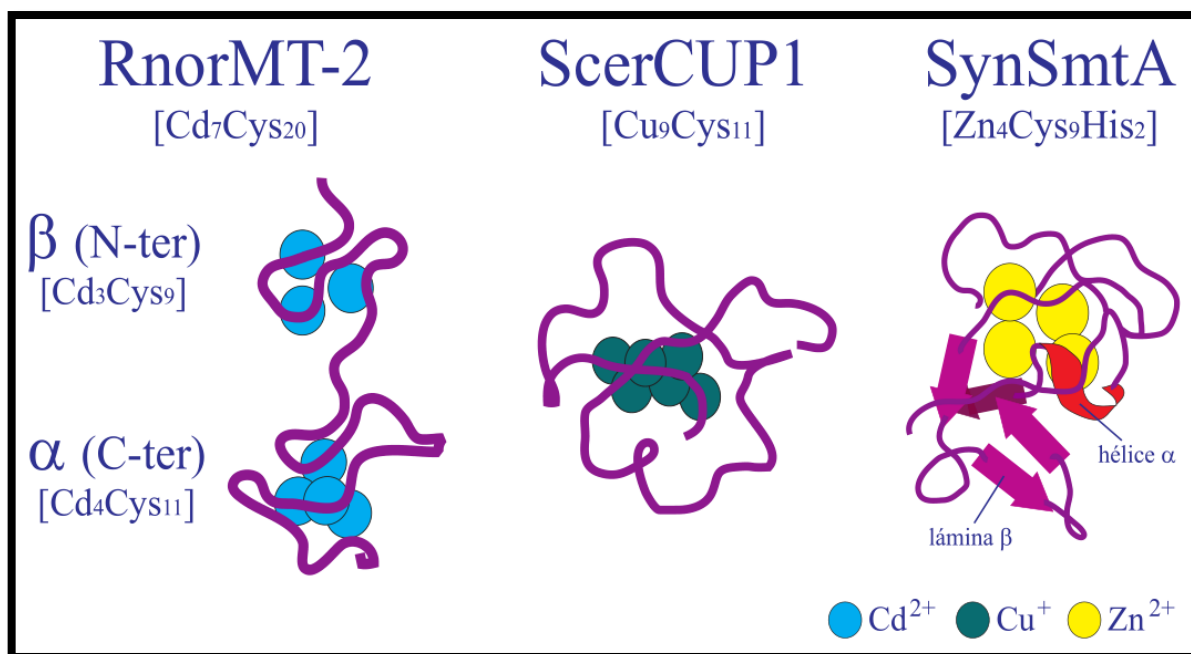
### 1.9.1. Estructura

Las MTs representan una superfamilia de proteínas de baja masa molecular (< 7-10 kDa), generalmente no contiene aminoácidos aromáticos ni histidina en su secuencia. Las MTs se encuentran en muchos organismos, desde procariontes hasta vertebrados y son muy ricas en residuos de cisteína (aproximadamente constituye del 23-33 % de la proteína), este aminoácido le confiere la capacidad de quelar iones metálicos, principalmente Cd, Zn<sup>2+</sup> o Cu. Los residuos de cisteína se distribuyen en diferentes dominios: Cys-X-Cys, Cys-XX-Cys y Cys-Cys (donde X es un aminoácido distinto a Cys) (Kägi, 1991).

En general las MTs no presentan estructura secundaria, aunque se pueden encontrar hélices  $\alpha$  o láminas  $\beta$  en algunas MTs, como por ejemplo la *SmtA* descrita en *Synechococcus sp.*, la MT-3 de mamíferos, la MT de *N. coriiceps*, o la MT-A de *S. purpuratus*. Cuando la MT no está acomplejada con metales, presenta una estructura tridimensional desordenada. Las MTs adquieren su estructura terciaria dependiendo de la unión de metales por los residuos de Cys (Capasso y cols., 2003).

La estructura tridimensional de las MTs es preferentemente inducida por Cd (Cd-MTs) y se ha estudiado principalmente en mamíferos, crustáceos y equinodermos. A pesar de sus diferencias en la secuencia de aminoácidos, su estructura tridimensional es bastante similar. En mamíferos las Cd-MTs se componen de unos 61-68 aminoácidos, de los cuales 20 de ellos son Cys capaces de unir 7 cationes bivalentes preferentemente de Cd<sup>2+</sup> o Zn<sup>2+</sup> (Klaassen y cols., 1999). Cuando se une a cationes metálicos la apometalotioneína adquiere forma de “yo-yo” y los residuos de cisteína se disponen en dos dominios, denominados  $\alpha$  (carboxilo-terminal) y  $\beta$  (amino-terminal). En el bivalvo marino *C. gigas* se ha propuesto un modelo tridimensional para una Cd-MT (CgMT2) consistente en un dominio  $\alpha$  y 2  $\beta$ , siendo la duplicación del dominio  $\beta$  una consecuencia de la respuesta de adaptación al estrés inducido por metal. Con respecto a las MTs preferentemente inducidas por Cu<sup>2+</sup> (Cu-MTs), parece existir una mayor diversidad, tanto en la secuencia de aminoácidos como en la estructura

tridimensional, aunque sólo se han analizado en muy pocos grupos biológicos (Tanguy y Moraga, 2001).



**Figura 6. Ejemplos de estructura tridimensional de metalotioneínas de distintos organismos.** RnorMT-2: MT-2 de *Rattus norvegicus*. ScerCUP1: CUP1 de *Saccharomyces cerevisiae*. SynSmtA: SmtA de *Synechococcus sp* (Capasso y cols., 2003).

### **1.9.2. Clasificación**

Inicialmente las MTs fueron agrupadas en tres clases diferentes. El descubrimiento de nuevas secuencias generó que se propusiera una nueva clasificación basada en la similitud de las secuencias de aminoácidos, pero que no tiene en cuenta caracteres funcionales o evolutivos. Esta clasificación considera a las MTs como una superfamilia de proteínas con características comunes. Actualmente las MTs se clasifican en 15 familias distintas, que agrupan a aquellas MTs que comparten un conjunto específico de caracteres relacionados con la secuencia de aminoácidos como: longitud de la secuencia en nucleótidos, organización de las cisteínas, formación de estructura secundaria, etc. Tabla 2. Los miembros de una familia no pueden incluirse en otra, y se considera que se trata de organismos relacionados evolutivamente. A cada familia le corresponde un número de identificación como se muestra a continuación (Binz y Kägi, 1999).

Familia MT	aa <sup>3</sup>	MM (kDa)	%Cys	CCC <sup>4</sup>	arom <sup>6</sup>	His <sup>7</sup>	Estructura 3D (Nter → Cter)	Ejemplos
1 Vertebrados	60-68	6-7	32-34	SI <sup>5</sup>	0	0-1	Dominio β + Dominio α	RnorMT2, HsapMT2, MmusMT1
2 Moluscos	64-87	7-9	28-30	SI <sup>5</sup>	0	0-4	Similares a vertebrados. Algunas isoformas pueden tener más de 2 dominios	AedMT10a, CvirMT4, HpomMT1
3 Crustáceos	58-64	8-8,2	31-33	SI <sup>5</sup>	0	0	Dominio β + Dominio β	HameMTH, CsapMT1b
4 Equinodermos	64-67	6-7	29-31	NO	SI	0	Dominio α + Dominio β	SpurMTA SgraMT1
5 Dípteros	40-43	3,9	25	NO	0	0	Un dominio <sup>2</sup>	DmelMT1, DmelMT2, DmelMT3
6 Nemátodos	62-74	6,6-8	25-28	NO	SI	1-4	Un dominio	CmelMT1, CeleMT2
7 Ciliados	99-181	10-19,6	22-30	SI	SI	0-2	Dominio β + Dominio α	[pigMT-1, TpyrMT-1, TtheMTT1
8 Hongos 1	25-27	2,5	27	NO	0	0	Un dominio	NcraMT, AbisMT
9 Hongos 2	63	6,4	28,6	NO	0	3	Un dominio	<sup>1</sup> CglaMT2a
10 Hongos 3	51	5,3	30,8	NO	SI	1	Un dominio	<sup>1</sup> CglaMT2b
11 Hongos 4	54-55	5,8	16-17	SI <sup>5</sup>	SI	1-2	Un dominio	YlipMT1/MT2/MT3/MT4
12 Hongos 5	61	6,7	19,7	NO	SI	1	Un dominio	<sup>1</sup> ScerCUP1
13 Hongos 6	69	7,3	27,5	NO	0	2	Un dominio	<sup>1</sup> ScerCRS5
14 Bacterias	53-58	6-8	17-19	NO	SI	SI	Un sólo dominio que contiene una α-hélice.	SynSmtA, TvuISmtA
15 Plantas Tipo1	45-75	4,6-7	16-29	NO	SI	0-1	Dos dominios separados por un	AthaMT1a, PsatMT1a
Plantas Tipo2	77-81	7,6-8	17-18	NO	SI	0-1	segmento de 40 aminoácidos	AthaMT2a, OsatMT2
Plantas Tipo3	60-69	6,4-8	15-17	NO	SI	0-1		AthaMT3, OsatMT3
Plantas Tipo4	76-81	7,8-8	19-21	NO	SI	0-1		AthaMT4, ZmayMT4.

**Tabla 2. Clasificación de las MTs en distintas familias de acuerdo a su estructura primaria.** La clasificación interna de las MTs de plantas ha sido propuesta por Cobbet y Goldsbrough (2002). Se muestran algunos ejemplos de MTs pertenecientes a cada una de las familias. 1 La familia actualmente está formada por una sola MT. 2 Por semejanza a la CUP1 de *S. cerevisiae* se ha supuesto que la estructura 3D esté formada por un solo dominio. 3 aa: número de aminoácidos que presenta la proteína. 4 CCC: motivos Cys-Cys-Cys. 5 SI: se ha encontrado una isoforma que contiene un motivo CCC en su secuencia. 6 arom: se indica si alguna isoforma de la familia contiene aa aromáticos. 7 His: se indica el número de residuos de Histidina que pueden presentar las isoformas de la familia. Estructura 3D: estructura tridimensional o terciaria. MT: metalotioneina. MM: masa molecular (Binz y Káji 1999).

### 1.9.3. Función

Los organismos han desarrollado una gama de mecanismos para reducir la toxicidad de los iones metálicos. Uno de los procesos de desintoxicación celular universal es la quelación de cationes metálicos. Este mecanismo permite el secuestro de iones metálicos por los grupos -SH de los residuos de cisteína y su almacenamiento intracelular en vacuolas o inclusiones citoplásmicas. Luego, estos complejos de proteína-metal son expulsados de la célula como compuestos no tóxicos o raramente tóxicos (De Francisco y cols., 2017).

Las MTs son conocidas por exhibir una gran cantidad de funciones biológicas, incluida la protección contra la toxicidad del metal, el control del estrés oxidativo y la regulación de homeostasis fisiológica. Además de su papel central como secuestradores de metales, las MT también están involucradas en una serie de actividades celulares, incluida la proliferación celular, la diferenciación, la apoptosis y la respuesta inmune. Por último, MT también han ganado atención en los estudios biomédicos, debido a su propuesta de participación en el cáncer y las enfermedades neurológicas. En los mamíferos, MTs funcionan en la protección contra enfermedades neurodegenerativas. En términos generales, las MT se han considerado como proteínas multifuncionales y como elementos clave del programa de respuesta al estrés integrado celular (De Francisco y cols., 2017).

En los organismos existen iones metálicos esenciales para el correcto funcionamiento de enzimas actuando como cofactores. Debido a que el cobre en forma iónica es altamente tóxico para la célula es necesario que las MTs fijen el metal para mantener una concentración baja, funcionando como un sistema de detoxificación. También se considera al cadmio altamente tóxico para la célula, sin embargo, la alta afinidad de las MTs por este metal hace que estas proteínas sean sumamente adecuadas para la eliminación del cadmio. En cambio, en cuestión del zinc las MTs funcionan como una fuente lábil del ion, permitiendo que sea utilizado cuando se requiera para la activación de apoenzimas (García-Rico y cols., 1999; Brambila y cols., 1999).

#### 1.9.4. Inductores

Existen una gran variedad de factores fisiológicos en la célula que son capaces de regular la expresión de estas proteínas, además de los metales ya mencionados, se conocen otros como los enlistados a continuación (Colombres y cols., 1999).

➤ Iones metálicos: Cd, Zn, Ca, Hg, Au, Ag, Co, Ni, Bi.	➤ Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno
➤ Glucocorticoides	➤ Tetracloruro de carbono
➤ Progesterona	➤ Inanición
➤ Estrógenos	➤ Infección
➤ Glucagón	➤ Inflamación
➤ Catecolaminas	➤ Laparotomía
➤ Interleucina 1	➤ Estrés físico
➤ Interferón	➤ Irradiación por Rayos X
➤ Butirato	➤ Alta tensión de oxígeno
➤ Ésteres de forbol	➤ Cloroformo
➤ Endotoxinas	➤ Diabetes
➤ Etanol	

#### 1.9.5. TvZNF1 y su regulación por zinc

Las proteínas de tipo dedos de zinc (ZNF) se encuentran en la mayoría de los eucariotas, conocidas como una gran familia de proteínas que se unen a ADN y que actúan como factores de transcripción. Estas proteínas dedos de zinc tienen un motivo denominado C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-ZNF, con una longitud de 20-30 residuos, uniendo un ion zinc cada dos residuos de cisteína y dos de histidina (krishna, 2003). Se han descrito diferentes funciones para este tipo de proteínas, una de las cuales involucra la regulación transcripcional de genes de virulencia reportado en la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (Esposito et al. 2006). Las proteínas dedos de zinc están involucradas como factores de *splicing* o proteínas de reparación de daño al ADN y unión al ADN utilizando sus dominios ZNF (Theunissen et al. 1992).

Por otro lado, el factor de transcripción regulado por metales 1 (MTF-1) y el regulador transcripcional que responde al zinc (Zap1) son factores de transcripción de proteínas C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-ZNF capaces de detectar y mantener la homeostasis de metales como Zn<sup>2+</sup> (Hardyman et al. 2016; Rutherford y Bird 2004). MTF-1 reconoce secuencias MRE en

la región 5'-UTR del RNAm en respuesta a  $Zn^{2+}$  (Hogstrand et al. 2008) y Zap1 de *S. cerevisiae* son capaces de unirse a una secuencia conservada, el elemento de respuesta (ZRE) aumentando su expresión en presencia de bajas concentraciones de  $Zn^{2+}$  (Bird et al. 2000; Zhao et al. 1998). Curiosamente, TvZNF1 y MTF-1 no son proteínas ortólogas, sino proteínas parálogas, con una función similar (Tadepally et al. 2008). Sin embargo, la comparación de secuencias C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-ZNF, entre TvZNF1 y MTF-1 sugiere que la unión a MRE se logra mediante un mecanismo diferente de reconocimiento al ADN, con la misma secuencia de nucleótidos, pero con una combinación diferente de residuos reconociendo distintos subsitios de la región de MRE (Villalpando y cols., 2017).

Un estudio previo de *T. vaginalis* reveló por medio de ensayos de RT-PCR que la expresión del gen *tvznf1* se ve aumentada por la presencia de  $Zn^{2+}$  en el medio (Villalpando y cols., 2017). Esta evidencia sugiere que la proteína TvZNF1 es regulada por la presencia de iones metálicos, expresándose por medio de la unión a sitio MRE como en el caso de las MTs (Villalpando y cols., 2017).

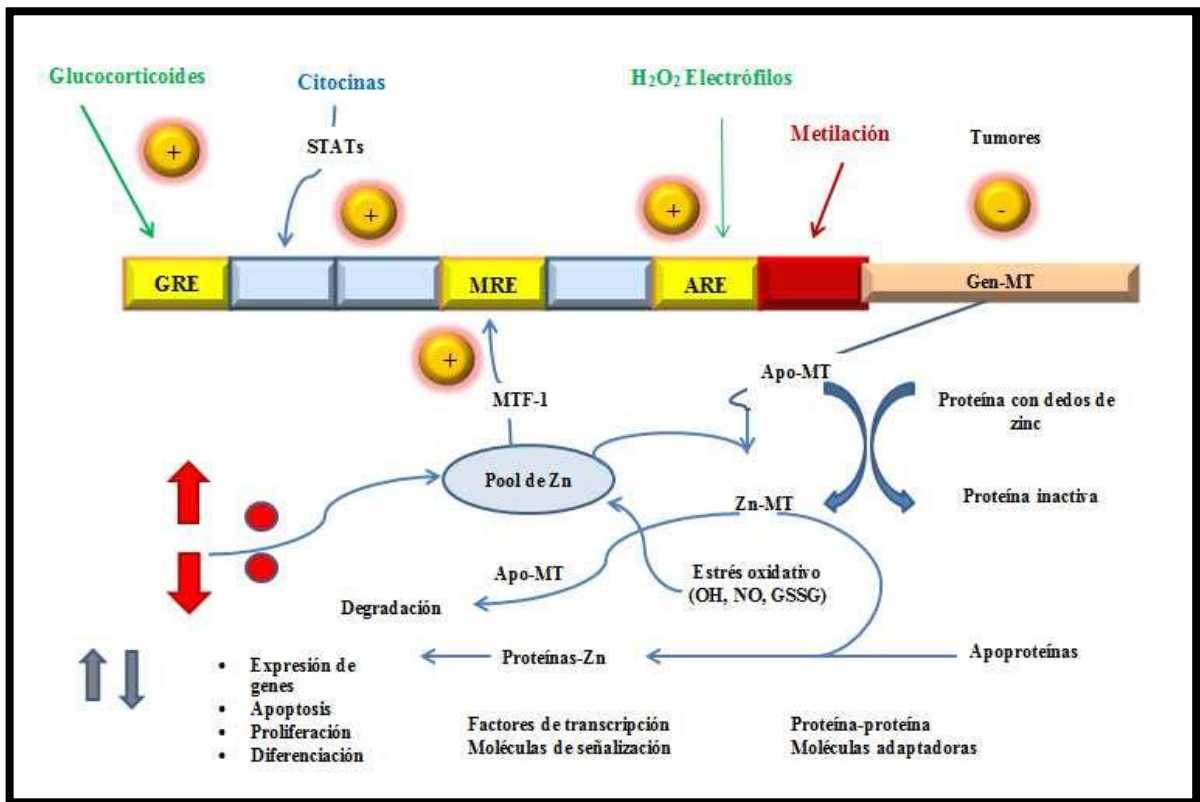
#### **1.9.6. Regulación de biosíntesis de metalotioneínas**

La biosíntesis de las MTs se induce por una gran variedad de estímulos. Entre ellos se encuentran metales, agentes oxidantes y citotóxicos, hormonas y factores de crecimiento, antibióticos, agentes inflamatorios y citocinas, radiaciones, y otros agentes que son interpretados por la célula como señales de estrés. Además, sus niveles de expresión se modifican durante el desarrollo, el envejecimiento y procesos patológicos como el cáncer. Aunque también hay indicios de regulación postranscripcional, la expresión de las MTs está regulada principalmente a nivel transcripcional, debido a la existencia de elementos de respuesta o elementos cis en la región promotora de los genes que las codifican, a los que se pueden unir distintos factores de transcripción. Algunos factores son esenciales para la expresión basal, mientras que otros activan la transcripción en respuesta a diferentes estímulos (Miles y cols., 2000). Esta reportado en la literatura que la transcripción en *T. vaginalis* se da por la presencia de un motivo bien identificado llamado Inr, altamente conservado (Carlton y cols., 2007).

La regulación transcripcional de los genes de MTs se ha estudiado en vertebrados e invertebrados, plantas y microorganismos eucariotas. En la región promotora de los genes de MTs de diversos organismos, se han identificado múltiples secuencias cortas similares entre sí, denominadas MREs (elementos de respuesta a metales). Los MREs, cuya secuencia consenso es TGC(G/A) CNC (donde N es cualquier nucleótido), están implicados en la expresión basal y la activación de la transcripción por algunos metales y estrés oxidativo.

En humanos, ratones, peces, levaduras e insectos se ha identificado el factor de transcripción MTF-1 (factor-1 de transcripción en respuesta a metales), que se une a las secuencias MREs activando la transcripción de los genes MT (Westin y Schaffner, 1988). MTF-1 presenta en su región N-terminal 6 dominios en dedos de zinc. Es esencial para la expresión basal de estas MTs y la inducción por metales y estrés oxidativo. MTF-1 se expresa constitutivamente en humanos y ratón. Como consecuencia del estrés generado por la exposición a metales MTF-1 se transloca desde el citoplasma al núcleo (Smirnova et al. 2000), donde se une a los MRE activando la transcripción del gen MT (Andrews, 2000; Hsu y cols., 2012).

Según el modelo propuesto, MTF-1 requiere  $Zn^{2+}$  para unirse al ADN, el  $Zn^{2+}$  induciría la expresión de los genes MTs activando directamente a MTF-1 para que éste se una a los MREs de la región promotora. El resto de metales no pueden unirse y activar a MTF-1, de modo que inducen la expresión de los genes MT por otras vías. El  $Cd^{2+}$  es altamente reactivo e induce estrés oxidativo y disminución de los niveles de GSH (Stohs y Bagchi, 1995).



**Figura 7. Regulación de la expresión génica de las MTs.** En el esquema se muestran los elementos que son regulados por la presencia de iones metálicos: Elementos de respuesta a metal (MRE), Elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE), Elementos activados por STAT y Elementos de respuesta a estado redox (ARE), (Ruttkay y cols., 2013).

El estrés oxidativo causado por la exposición a  $\text{Cd}^{2+}$  podría activar la transcripción de los genes MT directamente a través de la unión de MTF-1 a ARE (elementos de respuesta antioxidantes), e indirectamente aumentando los niveles citoplasmáticos de  $\text{Zn}^{2+}$  de la reserva celular de  $\text{Zn}^{2+}$  que se encuentra unido a proteínas (nivel basal de MTs u otras proteínas). Esto último, en cambio, no concuerda con los resultados de expresión de MTs de peces y moluscos, por lo que aún no está claro cómo el Cd activa indirectamente la transcripción a través de MTF-1 (Bourdineaud y cols., 2006).

Muchos promotores de genes MT contienen elementos de respuesta antioxidante (ARE) que presentan una secuencia consenso GTGACNNNGC, e intervienen en la respuesta a agentes oxidantes, así como a algunos metales y diversos compuestos xenobióticos. En el promotor de la MT-1 de ratón se ha identificado un elemento ARE que contiene un sitio de unión del factor de reconocimiento USF (factor de estimulación hacia el extremo 5'), implicado en la inducción de la expresión de dicha MT-1 en respuesta a la presencia de  $\text{Cd}^{2+}$  o  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Otras secuencias reguladoras de la expresión de MTs son las secuencias GRE (elementos de respuesta a glucocorticoides), a los que se une el receptor activado de estas hormonas, participan en la respuesta a glucocorticoides, y aparecen en el promotor de genes MTs de mamíferos (Andrews, 2000).

En los promotores de genes MT de algunos organismos también se han identificado distintos sitios de unión de factores GATA ([A/T]GATA[A/G]), AP-1 (TGA[G/C]TCA), y cajas GC (GGGGCGGGG) a la que se unen factores de transcripción con dedos de  $\text{Zn}^{2+}$  de la familia Sp/XKLF, como *sp1*, y que participa en la expresión basal de las MTs (Haq y cols., 2003).

Este ión metálico presenta mayor fuerza de unión para algunas MTs y desplaza a otros iones metálicos. Expresado seguidamente en orden creciente, de izquierda a derecha, la fuerza de unión con mayor energía de los iones principalmente tóxicos para las apometalotioneínas. ( $\text{Fe}^{2+} < \text{Zn}^{2+} < \text{Pb}^{2+} < \text{Bi}^{2+} < \text{Cu}^{2+}, \text{Ag}^{2+}, \text{Hg}^{2+} < \text{Cd}^{2+}$ ) (Norberg y col., 1979).

## 2. ANTECEDENTES

Al administrar sales de cadmio en animales de experimentación, se ha observado que este se transporta a través del torrente sanguíneo acumulándose inicialmente en el hígado, donde se induce la síntesis de la MT. Posteriormente el Cd<sup>2+</sup> hepático continúa su camino hacia el riñón, posiblemente en forma extracelular con Cd-MT. Este complejo es una potente nefrotoxina que tiene una vida media mayor a la de Zn-MT y que afecta los túbulos proximales. Cuando la concentración de Cd<sup>2+</sup> en el tejido renal alcanza los niveles críticos (100-200 µg/g) se producen daños tubulares. Este efecto tóxico también se ha demostrado al administrar Cd-MT tanto en ratas como en células del epitelio renal, encontrándose que una concentración de 10 µg/g de Cd es suficiente para producir daños renales (Torra y cols., 1994).

En otro estudio en *Tetrahymena thermophila*, se analizó mediante RT-PCR cuantitativa el nivel de expresión de *mtt5*, después de haber sido expuesto a cadmio (0.9 µM) durante 2 horas se indujo la expresión del gen *mtt5*. El aumento en el nivel de transcripción de *mtt5* en GFPMTT5 en comparación con SB1969 fue de aproximadamente 400 veces. Mientras que con 8 µM de cadmio fue letal para las células SB1969, esa concentración fue tolerada por GFPMTT5. Los niveles de transcripción de MTT5 fueron aproximadamente 2,000 veces más altos que los niveles de ARNm del gen de la *α-tubulina* (control del gen de mantenimiento) (Amaro y cols., 2014).

También en *Oncorhynchus kisutch* (salmón Coho) se han hecho estudios, exponiéndolos a concentraciones ambientalmente relevantes de Cd<sup>2+</sup> en el agua (2 y 30 mg/L) durante 48 h y (0,3 y 2 mg/L) durante 16 días, seguido de una depuración de 16 días asociada con la emigración. Las exposiciones al Cd<sup>2+</sup> inhibieron las respuestas de comportamiento hacia la L-cisteína y los odorantes específicos. Las alteraciones del comportamiento después de la exposición a 30 mg/L se asociaron con un aumento de la expresión del gen epitelial olfativo de MT (*mt1a*) y hemo oxigenasa (*hmox1*); Las alteraciones del comportamiento en la exposición a 0,3 y 2 mg/L de Cd<sup>2+</sup> se asociaron con un aumento de *mt1a* (Williams y cols., 2016).

Un estudio en *Crassostrea iredalei* y *glomerata* muestra la relación entre el contenido de metales pesados y el nivel de MT. Los resultados mostraron que un aumento en Pb

disminuyó el nivel de MT en 30,919.060 ng/g. Además, un aumento de  $\text{Cd}^{2+}$  aumentó el nivel de MT a alrededor de 139,589.243 ng/g y un aumento en el nivel de  $\text{Hg}^{2+}$  aumentó el nivel de MT en 146,797.196 ng/g. Además, se investigó la relación entre el nivel de metales pesados en el agua de mar y los niveles de MT en el estómago de *C. iredalei*. Los resultados mostraron que el aumento de  $\text{Pb}^{2+}$  reduce el nivel de MT a 53,844.1 ng/g. Además, un aumento de la concentración de  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Hg}^{2+}$  elevó el nivel de MT a alrededor de 268,073 ng/g y 658,306 ng/g, respectivamente. Los resultados mostraron que un aumento en la concentración de  $\text{Pb}^{2+}$  disminuyó el nivel de MT en branquias a 29,404.578 ng/g. sin embargo, un aumento en la concentración de  $\text{Cd}^{2+}$  eleva el nivel de MT a 223,621.464 ng/g y el aumento de la concentración de  $\text{Hg}^{2+}$  eleva la concentración de MT a 144733.404 ng/g. Además, el nivel de metales pesados tiene una asociación significativa con el nivel de MT en el estómago. Los resultados mostraron que el aumento de la concentración de  $\text{Pb}^{2+}$  disminuye el nivel de MT a 4,991.670 ng/g y aumentar la concentración de  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Hg}^{2+}$  eleva el nivel de MT a 105,058.703 ng/g y 225,262.150 ng/g, respectivamente (Hertika y cols., 2018).

En otro estudio se menciona que de 21 nuevos genes MT de *Tetrahymena* solo se pudieron analizar 6, debido a la gran similitud entre las secuencias de nucleótidos de los genes, lo que hace imposible diseñar cebadores específicos para diferenciar cada gen. En general, los valores de inducción son mayores en 1 h de tratamiento que después de 24 h de haber sido expuesto a metales, excepto en TborMTT2 de CdMT en tratamientos con  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  o  $\text{Pb}^{2+}$ . Los genes que codifican para la proteína CdMT putativos de *T. borealis* (TborMTT1 y TborMTT2) son inducidos por  $\text{Cd}^{2+}$  entre otros cationes inorgánicos, pero hay varias diferencias en los patrones de expresión de cada isoforma del gen. En exposiciones de 1 y 24 h de  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  o  $\text{As}^{2+}$ , los niveles de expresión para TborMTT1 son considerablemente más altos que para el gen TborMTT2. Por otro lado, la isoforma del gen TborMTT2 parece ser inducida más tarde y más uniformemente con estos metales. A 1 h de tratamiento con este metal tóxico, TborMTT1 se induce aproximadamente 300 veces, mientras que TborMTT2 solo se induce 20 veces. Después de comparar los valores de qRT-PCR de diferentes genes de *Tetrahymena* MT, se pueden inferir algunas consideraciones generales: a) En general, los genes de *Tetrahymena* CdMT se inducen principalmente por  $\text{Cd}^{2+}$  ( $\text{Cd}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$ ), mientras que los genes CuMT son inducidos por  $\text{Cu}^{2+}$  ( $\text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+}$ ). Esta

diferencia corrobora su separación en dos subfamilias previamente bien definidas (De Francisco y cols., 2016).

En *Biomphalaria glabrata* el gen MT en la glándula del intestino medio, no mostró una regulación positiva transcripcional significativa tras la exposición a concentraciones de Cd (75 µg/L) a diferencia de otras especies de gasterópodos, parece que la expresión constitutiva de este gen ya estaba muy elevada en condiciones de control. Incluso los niveles de ARNm de MT durante los primeros 8 días de exposición no varían mucho dando la impresión de que la tendencia de larga duración de la inducción del ARNm de MT durante todo el período de exposición no se ve afectado por la exposición al Cd<sup>2+</sup>. Dado que la MT de *Biomphalaria glabrata* no es específica de Cd<sup>2+</sup> en absoluto, en este caso la unión de metales a la proteína se puede lograr a través de reacciones de intercambio en los sitios de unión de la proteína, por ejemplo, con iones Cd<sup>2+</sup> que reemplazan a Zn<sup>2+</sup> (Niederwanger y cols., 2017).

Lo anterior sugiere que la MT puede no ser necesariamente el actor principal para la desintoxicación de Cd<sup>2+</sup> en *Biomphalaria glabrata*. Como alternativa, las fitoquelatinas pueden participar en la desintoxicación de Cd<sup>2+</sup>, como se muestra para *Lymnaea stagnalis* expuesta a Cd<sup>2+</sup>, un pariente cercano de *Biomphalaria glabrata* (Niederwanger y cols., 2017).

Los genes identificados en el genoma de *T. vaginalis* que codifican para las MTs siguen anotados como metalotioneínas hipotéticas, aún queda determinar si las MTs identificadas llevan a cabo la función de detoxificación de iones metálicos en el parásito, y si esta función contribuye a la supervivencia en el tracto urogenital humano.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La tricomoniasis a nivel mundial ha incrementado, por ello es necesario entender la biología de *T. vaginalis* y su adaptación al microambiente del tracto urogenital masculino, por ser el principal portador transitorio y transmisor de la enfermedad. Es importante conocer la maquinaria de moléculas de *T. vaginalis*, como las MTs las cuales el parásito utiliza para sobrevivir en presencia de metales pesados como el  $Cd^{2+}$ , encontrado en el microambiente del tracto urogenital masculino, de esta forma de podrían proponer estrategias alternativas de diagnóstico y tratamiento para esta infección, con lo cual poder ayudar a la población y evitar que la infección se propague.

### 4. HIPÓTESIS

La expresión de *tvmt-1* y síntesis de TvMT-1, están regulados por la presencia de iones metálicos en el medio, como una estrategia de supervivencia de *T. vaginalis*.

## 5. OBJETIVOS

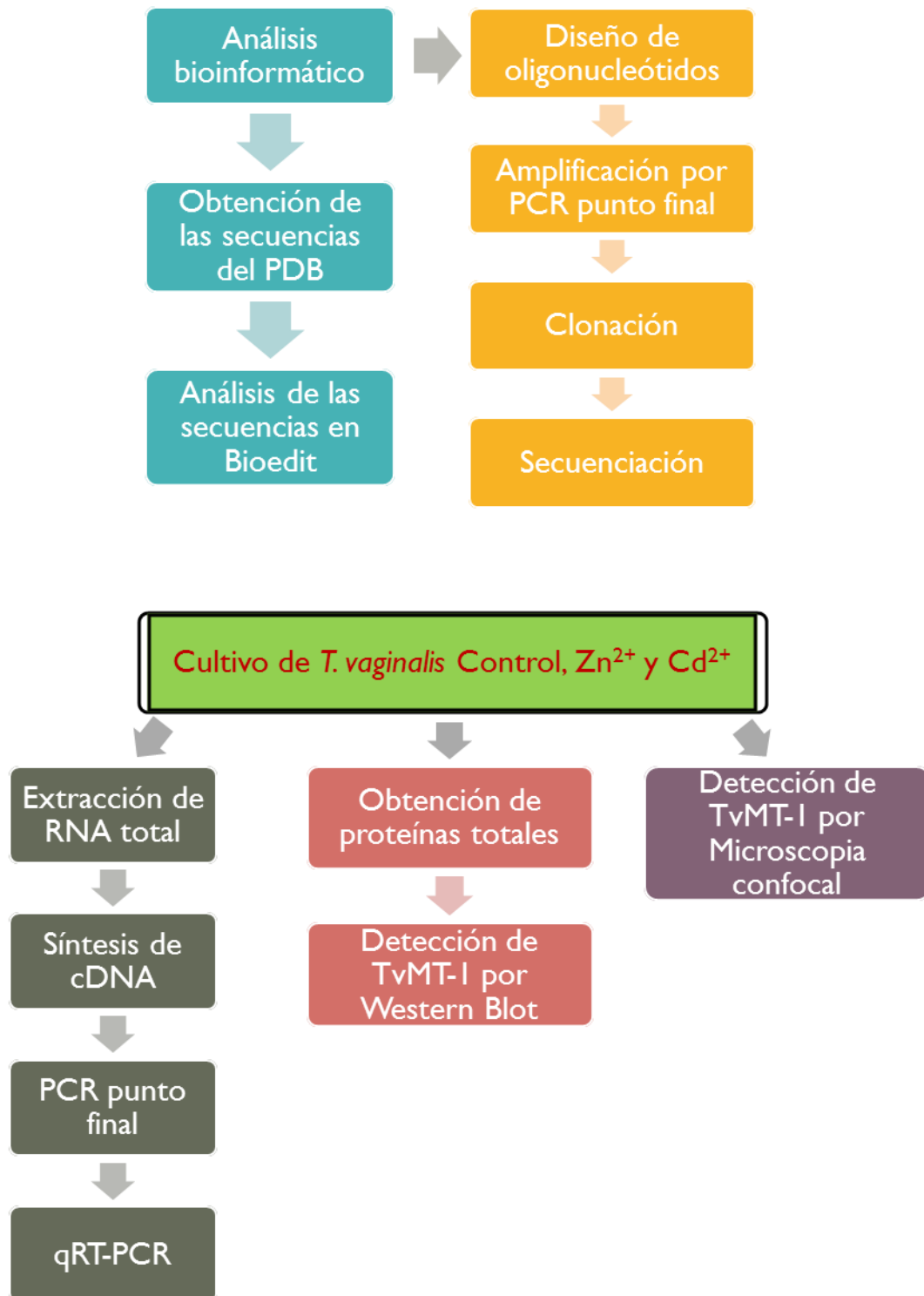
### General

- Evaluar la expresión de *tvmt-1* y localización de TvMT-1 de *T. vaginalis* en respuesta a la presencia de iones metálicos.

### Particulares

- Analizar *in-silico* la estructura secundaria de las metalotioneínas de *T. vaginalis*.
- Determinar el efecto de diferentes concentraciones de  $Zn^{2+}$  y  $Cd^{2+}$  en la expresión del gen *tvmt-1* de *T. vaginalis*.
- Identificar a TvMT-1 de *T. vaginalis* en lisados de parásitos cultivados presencia y ausencia de  $Zn^{2+}$  y  $Cd^{2+}$ .
- Determinar la localización de TvMT-1 en *T. vaginalis* cultivados en presencia y ausencia de  $Zn^{2+}$  y  $Cd^{2+}$ .

## 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1. Análisis in-silico

La secuencia del gen *tvmt-1* en *T. vaginalis* se buscó en la base de datos TrichDB (Trichdb.org). Se realizó un BLAST, utilizando la secuencia de la metalotioneína-1 para identificar otras posibles MTs en el genoma del parásito, se identificaron las siguientes en GeneBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) con números de acceso: XP\_001304130.1, XP\_001584034.1, XP\_001321169.1 y XP\_001321197.1 las cuales se pasaron al programa Bioedit para su alineamiento y análisis. Las secuencias de MTs de otros organismos obtenidas de PDB con números de acceso: 1M0J (*Notothenia neglecta*), 1M0G (*Notothenia neglecta*), 2MHU (*Homo sapiens*), 1MHU (*Homo sapiens*), 2MRB (*Oryctolagus cuniculus*), 1MRB (*Oryctolagus cuniculus*), 1QJK (*Strongylocentrotus purpuratus*), 1QJL (*Strongylocentrotus purpuratus*), 6GRV (*Pseudomonas fluorescens*), 6GV7 (*Pseudomonas fluorescens*), 1JJD (*Synechococcus elongatus*), 2KAK (*Triticum aestivum*), 1DME (*Callinectes sapidus*), 1J5M (*Homarus americanus*) y 2L61 (*Triticum aestivum*) fueron analizadas, se hizo un alineamiento para identificar la similitud entre las secuencias del parásito y las de otros organismos y saber si guardan similitud entre los dominios que presentan las diferentes MTs identificadas.

### 7.2. Extracción de DNA genómico

A partir  $2 \times 10^7$  parásitos de *T. vaginalis* se centrifugó a 1800 rpm/5 min/4°C y se lavó 3 veces con PBS pH7. Después a la pastilla se agregó 300 µl de amortiguador de lisis y 300 µl de fenol, se agitó por inversión 30s y se centrifugó a 13000 rpm/5 min/4°C, se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo. Posteriormente se adicionó 300 µl de cloroformo y se mezcló suavemente. Posteriormente se centrifugó a 13000 rpm/5 min/4°C y transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo, después se adicionó 2.5 volúmenes de etanol absoluto y 1/10 de acetato de sodio pH 8, se incubó durante 2h/-20°C, posteriormente se centrifugó a 13000 rpm/15 min y se eliminó el sobrenadante. La pastilla se lavó con etanol al 70% frío y se centrifugó a 13000 rpm/15 min, se dejó secar a temperatura ambiente y se adicionó 30 µl de agua libre de DNAsas. Posteriormente al producto se le dio tratamiento con RNAsa por 30 min/37°C. el producto se cuantificó y se midió la pureza por el NanoDrop 2000. La integridad del

DNA genómico se visualizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con Redgel (Biotium). Finalmente se almacenó a -20°C.

### 7.3. Amplificación por PCR

Los oligonucleótidos se diseñaron específicos para la secuencia de *tvmt-1*, a partir de DNAg se realizó una PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), con un volumen final de 25 µl con las condiciones adecuadas (12.5 µl de Master Mix (Roche), 10 pmol de oligonucleótido sentido, 10 pmol de oligonucleótido antisentido, 100 ng de Templado y 9.5 µl de Agua).

Los iniciadores que se utilizaron para la amplificación fueron:

Sentido: 5´ - GGGATCCATGTCTGCTCAAGAAACATGC – 3´

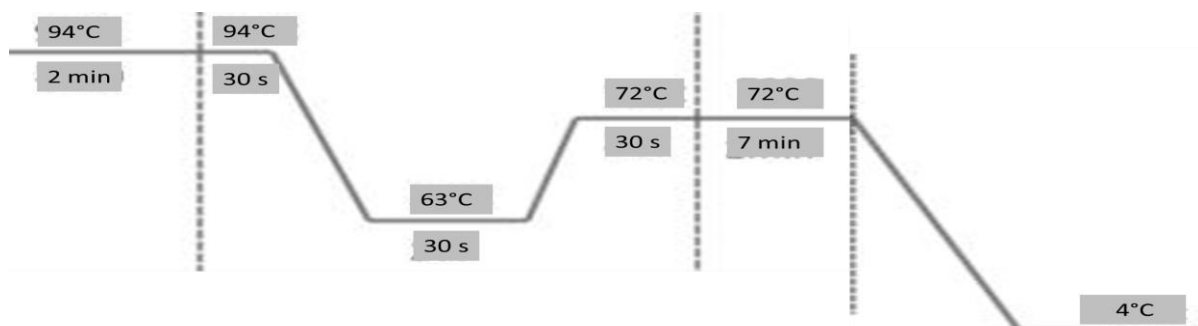
Longitud: 28 nt. TM: 61.4°C

Antisentido: 5´ - GAAGCTTTTAATGATCACAATGGCAATCTG – 3´

Longitud: 30 nt. TM: 57.1°C

Amplicón: 267 pb

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



La integridad de la PCR se visualizó por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con Redgel (Biotium).

## **7.4. Clonación**

### **7.4.1. Preparación de células competentes**

A partir de la última resiembra se picó de 1 a 3 colonias de la cepa deseada, crecida en medio LB a 37°C durante 16 hrs, se inoculó en 10 ml de LB y se incubó con agitación a 200 rpm/37°C. Después el cultivo anterior se inoculó 5 ml en 30 ml de LB se incubó a 37°C durante 2 hrs hasta alcanzar una densidad óptica de 0.3-0.5 a 600 nm, después el cultivo se transfirió a tubos de 50 ml y se centrifugó a 1600 rpm/5 min/4°C. El tubo se decantó y se resuspendió la pastilla en 16 ml de buffer I (100 mM RbCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub> 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, glicerol 15 %) (4 ml de buffer I por cada 50 ml de cultivo), se centrifugó nuevamente a 1600 rpm/5 min/4°C y se decantó el sobrenadante, después se adicionó el buffer II (MOPS 10 mM, RbCl<sub>2</sub> 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 75 mM, glicerol 15 %) y se incubó en hielo durante 10 min. Finalmente, de la mezcla se hicieron alícuotas de 50 µl y se almacenó a -80°C. Para ver la eficiencia se tomó un vial de las células competentes y se transformó con 50 pg de PUC-19 (invitrogen) por choque térmico a 42°C/45 seg, posteriormente el tubo con células se incubó a 200 rpm/37°C/2hrs, después las células se sembraron en una placa con LB agar con ampicilina (100 µg/ml) y se incubó a 37°C/16 hrs. Las colonias crecidas se cuantificaron en la placa para determinar la eficiencia.

### **7.4.2. Clonación en TOPO-TA**

Para la clonación se utilizó 4.5 µl del producto de PCR, 1 µl de solución de sales y 0.5 µl de vector TOPO-TA (invitrogen); posteriormente la reacción se mezcló gentilmente e se incubó por 5 min a temperatura ambiente, después la reacción se pasó al hielo, finalmente de la reacción se adicionó 2 µl a las células competentes y se transformó por choque térmico a 42°C/45 seg, el tubo con las células se pasó al hielo durante 1 min y se adicionó 300 µl de medio LB, posteriormente se incubó a 200 rpm/37°C/2hrs, después se centrifugó el tubo con bacterias a 1600 rpm/5 min y se sembró en una placa con LB agar con ampicilina (100 µg/ml) y se incubó a 37°C/16 hrs. Posteriormente 5 clonas se picaron y se realizó PCR de colonia con los oligonucleótidos de *tvmt-1* para verificar que las clonas eran positivas. El producto obtenido de la PCR se visualizó por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con Redgel (Biotium).

### **7.4.3. Extracción de DNA plasmídico**

A partir de las clonas positivas, se creció en medio LB con ampicilina (100 µg/ml), se incubó a 200 rpm/37°C/16 hrs, posteriormente se centrifugó a 1600 rpm/5 min, después se agregó 250 ul de solución de resuspensión y se agitó gentilmente, posteriormente se adicionó 250 ul de solución de lisis y se mezcló por inversión del tubo gentilmente, se incubó en hielo por 5 min, después se adicionó 350 ul de solución de neutralización y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente la mezcla se pasó a un tubo de 1.5 ml y se centrifugó a 13000 rpm/10 min/4°C, después el sobrenadante se pasó a un tubo nuevo y se adicionó 2 volúmenes de isopropanol y se incubó 2 hrs a -20°C para precipitar el DNA. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 13000 rpm/10 min/4°C y después se lavó 2 veces con isopropanol al 70%, pasado el segundo lavado la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente y esta se resuspendió en 20 ul de agua libre de DNAsas. Posteriormente al DNA plasmídico se dió tratamiento con RNAsa y se incubó a 37°C/30 min. El DNAp se cuantificó y se midió la pureza por el NanoDrop 2000 La integridad se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con Redgel (Biotium).

### **7.4.4. Secuenciación**

El DNA plasmídico obtenido de las clonas positivas, se utilizó como templado para el proceso de secuenciación, adicionalmente se añadieron los oligonucleótidos específicos sentido y antisentido para el plásmido TOPO-TA (invitrogen), posteriormente el DNA plasmídico se marcó con el siguiente programa de secuenciación: 40 ciclos de 96°C/6 min, 96°C/10 seg, 50°C/5 seg, 60°C/4 min, 60°C/10 seg y finalizando a 4°C. Posteriormente el producto se purificó por columnas DyeEX 2.0 spint kit. Lo recolectado en los tubos se llevó al speedback (Concentrator 5301) por 40 min hasta evaporar todo y después se cubrió de la luz y se almacenó a -20°C hasta ser inyectado en el equipo 3130 Genetic Analyzer.

## **7.5. Análisis de expresión de *tvmt-1***

### **7.5.1. Cultivo de *T. vaginalis* en presencia de iones metálicos**

Antecedentes sobre la expresión de la MT confirman que puede inducirse por la presencia de iones metálicos en el medio. Se cultivó *T. vaginalis* del aislado HGMN01

en medio suplementado con 1.6 mM de  $Zn^{2+}$  y 0.1 mM de  $Cd^{2+}$ . El cultivo se hizo en medio TYM (tripticasa-extracto de levadura-maltosa) por 37°C/24 h. Como control se utilizó el cultivo de *T. vaginalis* en medio TYM sin presencia de iones metálicos.

### **7.5.2. Extracción de RNA total**

A partir de  $2 \times 10^7$  parásitos que fueron crecidos en medio TYM suplementado con 1.6 mM de  $Zn^{2+}$  y 0.1 mM de  $Cd^{2+}$ , se centrifugó a 1800 rpm/5 min y se lavó la pastilla con 1 ml de PBS pH7 3 veces. Posteriormente la pastilla se resuspendió en 1 ml de Trizol y se almacenó a -80°C, después se incubó por 30 min/4°C hasta descongelar, se adicionó 200  $\mu$ l de cloroformo y se mezcló por 15 seg/4°C, se centrifugó a 10000 rpm/15 min/4°C y se la fase acuosa se recuperó y se pasó a un tubo nuevo estéril. Posteriormente a la fase acuosa se adicionó 500  $\mu$ l de isopropanol y se incubó durante 2 horas/-20°C, después se centrifugó a 10000 rpm/15 min/4°C y la pastilla se lavó dos veces con 600  $\mu$ l de etanol al 100%, se centrifugó a 10000 rpm/5 min/4°C y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente, se resuspendió en 60  $\mu$ l de agua libre de RNAsas. Posteriormente al RNA se le dió tratamiento con DNAsa 37°C/1 hr, después se inactivó a 65°C/10 min. El RNA se cuantificó y se midió la pureza por el NanoDrop 2000. La integridad del RNA total se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

### **7.5.3. Síntesis de cDNA**

De 1-3  $\mu$ g de RNA se cuantificaron y se incubó con 1  $\mu$ l de DNAsa (1 unidad) durante 1 h/37°C, se adicionó 1  $\mu$ l de solución de paro para DNAsa y se incubó 10 min/65°C. el tratamiento con DNAsa se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1%, se cuantificó el RNA tratado y se adicionó de 1-3  $\mu$ g en un tubo nuevo, se adicionó 1  $\mu$ l de Oligo dT y agua DEPC para un volumen final de 12  $\mu$ l. se desnaturalizó por 15 min/70°C, después el tubo se pasó al hielo durante 5 min y en el hielo se adicionó la siguiente mezcla:

- Buffer 5X            4  $\mu$ l
- DTT 0.1 M        2  $\mu$ l
- dNTPs 10 mM    2  $\mu$ l

Se Incubó 2 min/42°C y se adicionó 1 µl de RT (Retrotranscriptasa Reversa, Thermo Fisher), se incubó nuevamente 50 min/42°C y se inactivó 10 min/70°C. El producto se cuantificó en el Nano Drop 2000.

#### 7.5.4. Amplificación por PCR semi-cuantitativa.

Los oligonucleótidos se diseñaron específicos para la secuencia de *tvm1-1*, a partir de cDNA se realizó una PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), para un volumen final de 25 µl con las siguientes condiciones (12.5 µl Master Mix (Roche), 10 pmol de oligonucleótido sentido, 10 pmol oligonucleótido antisentido, 100 ng de Templado y 9.5 µl de Agua).

Los iniciadores para el análisis del transcrito del gen *tvm1-1* fueron:

Sentido: 5´-TGCTCAAGAAACATGCCAGTG-3´

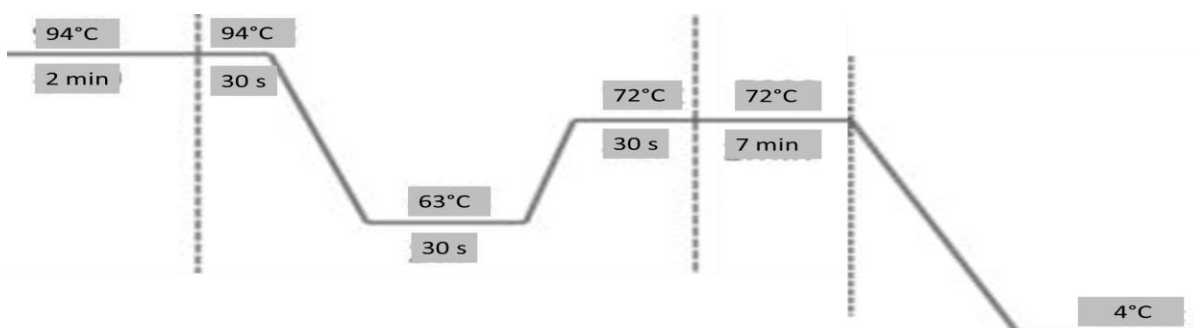
Longitud: 21 nt. TM: 47.6°C

Antisentido: 5´-TGCAGCCTTCGTTGCATTT-3´

Longitud: 19 nt. TM: 47.4°C

Amplicón: 104 pb

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

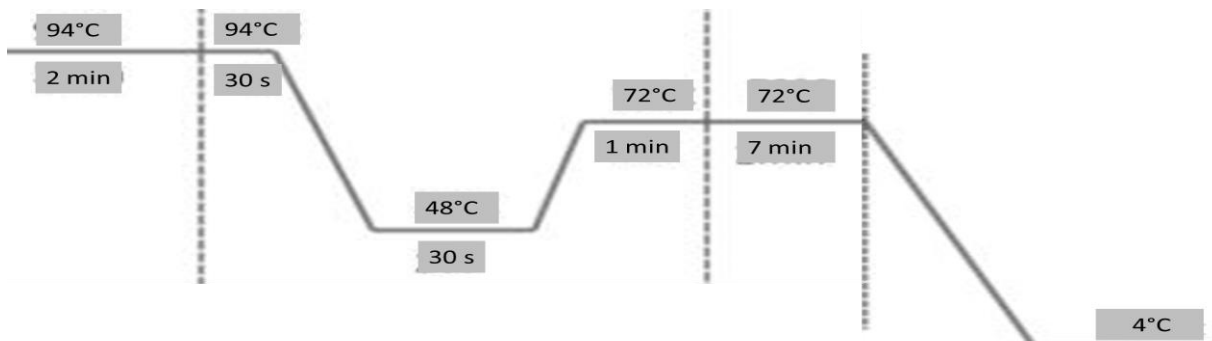


Para la amplificación del gen de  $\beta$ -*tubulina*, el cual fue utilizado como control de carga para las diferentes condiciones, se utilizaron los siguientes iniciadores.

Sentido: TUB9 5' - CATTGATAACGAAGCTCCTTTACGAT – 3'

Antisentido: TUB2 5' - GCATGTTGTGCCGGACATAACCAT – 3'

Se amplificó utilizando los siguientes parámetros para el termociclador:



El producto de la PCR se visualizó por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con Redgel (Biotium).

Para el ensayo de qRT-PCR se preparó una placa de 96 pozos con la reacción, con los siguientes volúmenes: Master Mix Syber Green (Qiagen) 12.5  $\mu$ l, oligonucleótido sentido 100nM, oligonucleótido antisentido 100 nM, templado 100 ng, H<sub>2</sub>O 9.5  $\mu$ l a un volumen final de 25  $\mu$ l. El ciclaje que se usó es igual al de la PCR semicuantitativa y con los mismos oligonucleótidos.

Para el análisis densitométrico se midió la intensidad de pixeles de cada una de las bandas obtenidas en el gel correspondientes a cada condición, se utilizó el programa Image Lab de Bio-Rad. La medición se efectuó considerando el 100% de la expresión de *tvmt-1* de la condición normal y los datos se normalizaron con respecto a la expresión del gen  $\beta$ -*tubulina*.

## 7.6. Identificación de TvMT-1 en *T. vaginalis*

### 7.6.1. Diseño y selección del péptido sintético

Se diseñó un péptido sintético de TvMT-1 para utilizarlo en la inmunización de ratones y obtener anticuerpos anti-TvMT-1. Estos anticuerpos se utilizaron en la inmunodetección de TvMT-1 en extractos proteicos de *T. vaginalis*. Para el diseño del péptido se tomó como templado la secuencia del gen *tvmt-1* y se realizó la traducción a aminoácidos. Posteriormente la secuencia peptídica de TvMT-1 se analizó para

determinar los sitios que son potencialmente epítomos usando los servidores ABCpred y Bepipred. Los datos mostraron distintos péptidos candidatos de los cuales se descartaron los de menor inmunogenicidad, mayor inestabilidad fisicoquímica, menor identidad.

### 7.6.2. Obtención de sueros policlonales anti-TvMT-1

Primeramente, el suero preinmune se obtuvo de 5 ratones Balb/c previo a la inmunización. Después los 5 ratones se inmunizaron con el péptido TvMT-1. La inmunización se realizó vía intraperitoneal utilizando como adyuvante TiterMax en una relación 1:1 con el antígeno administrado como se muestra a continuación:

Semana	Antígeno/ $\mu$ g	TiterMax/ $\mu$ l	Sangrado
1	100	100	X
2	100	100	X
3	100	100	X
4	100	100	X
5	100	100	X

Los sueros obtenidos de cada sangrado, se prepararon con PBS pH7 a una dilución 1:100, 1:500 y 1:1000 para cada uno de los 5 ratones. La reactividad de cada suero se verificó por Western Blot.

### 7.6.3. Ensayo de Western Blot

A partir de  $2 \times 10^7$  parásitos que fueron crecidos en medio TYM suplementado con 1.6 mM de  $Zn^{2+}$  y 0.1 mM de  $Cd^{2+}$ , se centrifugó a 1800 rpm/5 min/4°C y se lavó 3 veces con PBS pH7. Posteriormente a la pastilla se adicionó ácido tricloroacético (TCA) al 10% con PBS pH7 y se mezcló, se incubó 18hrs/4°C. Después el tubo se centrifugó a 13000 rpm/3 min/4°C y la pastilla se lavó 5 veces con PBS pH7. Se adicionó buffer de muestra 5X y se hirvió durante 5 min, después la muestra se cargó en un gel de poliacrilamida al 15% y corrió a 100 volts. Terminado el tiempo de electroforesis se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se bloqueó la membrana con leche al 5% disuelta en PBS-Tween 20 al 0.1% a 4°C O/N. Se lavó 5 veces con PBS-Tween 20 al 0.1% y se incubó con el anticuerpo primario en una dilución 1:1000 a 4°C O/N. Se lavó 5 veces la membrana con PBS-Tween 20 0.1% x 5 min cada lavado e incubó con el

anticuerpo secundario (anti-ratón) conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) en una dilución 1:3000 durante 2h en agitación a temperatura ambiente, posteriormente la membrana se lavó 5 veces con PBS-Tween 0.1% x 5 min cada lavado. Finalmente, el revelado se realizó por quimioluminiscencia (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate), y se observó en el equipo ChemiDoc de Bio-Rad.

### **7.7. Inmunolocalización por microscopia confocal**

A partir de una caja de cultivo con  $12 \times 10^7$  parásitos crecidos en medio TYM suplementado con 1.6 mM de  $Zn^{2+}$  y 0.1 mM de  $Cd^{2+}$ , del cultivo anterior se pasaron  $8 \times 10^6$  de parásitos a cada pozo de una placa de seis pozos, con un cubre depositado en cada pozo de la placa y se incubó a  $37^\circ C$ -O/N, al siguiente día el medio se eliminó con cuidado de cada pozo y se lavó 5 veces con PBS 1X pH7 (no agregar directamente al cubreobjetos), el líquido se eliminó completamente y se adicionó 600  $\mu$ l de paraformaldehído al 2%, se incubó a temperatura ambiente durante 2 h, el líquido se eliminó completamente, nuevamente se lavó 5 veces con PBS 1X pH7 y el líquido se eliminó completamente, posteriormente a cada pozo se adicionó 1 ml suero fetal bovino al 1% y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente, el líquido se eliminó completamente y se lavó nuevamente 5 veces con PBS 1X pH7, a cada pozo se adicionó 1 ml de glicina al 0.5 M y se incubó durante 1 h, nuevamente se lavó 5 veces con PBS 1X pH7, el líquido se eliminó completamente y se adicionó anti-TvMT-1 (1:100) directamente al cubre con parásitos, que se incubó  $4^\circ C$ /ON, se lavó 5 veces con PBS 1X pH7 y posteriormente el anticuerpo secundario (anti-ratón) conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) se adicionó a una dilución 1:100, se incubó durante 2h a temperatura ambiente. En un portaobjetos marcado, se colocó el cubreobjetos que tiene los parásitos fijados en contacto con 4  $\mu$ l de Vectashield, se selló cuidadosamente el cubreobjetos adherido al portaobjetos y se cubrió de la luz, las laminillas se almacenaron a  $4^\circ C$ . Las imágenes se adquirieron de un microscopio confocal invertido Nikon Ti Eclipse equipado con un sistema de imágenes A1, ambos controlados desde el software propietario NIS Elements v.4.50 (Nikon).

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Análisis bioinformático

Usando la secuencia de aminoácidos TvMT-1 de *T. vaginalis* reportada en la base de datos TrichDB.org (<http://trichdb.org/trichdb/>) con número de acceso TVAG\_220940, se realizó un BLAST en la base de datos de NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), se identificaron otras secuencias de MTs en el genoma de *T. vaginalis*, con números de acceso: XP\_001304130.1, XP\_1584034.1, XP\_001321197.1 Y XP\_001321169.1. Estas secuencias se analizaron en Bioedit, donde se llevó a cabo el alineamiento local. El resultado mostró que la secuencia de TvMT-1 está formada por dominios repetidos y las otras 3 secuencias de MTs identificadas en el genoma del parásito *T. vaginalis* también se encuentran formadas por dominios repetidos similares entre sí, cada dominio se conforma de 11 Cys para 4 iones, 9 Cys para 3 iones, 6 Cys para 2 iones y 4 Cys para 1 ión. También se llevó a cabo un análisis en el PDB (<https://www.rcsb.org/>), identificando secuencias de MTs con similitud en sus dominios, con número de acceso: 1M0J,1M0G, 2MHU, 1MHU, 2MRB, 1MRB, 1QJK, 1QJL, 6GRV, 6GV7, 1JJD, 2KAK, 1DME, 1J5M y 2L61. Después estas secuencias se pasaron al programa Bioedit, se hizo el alineamiento, el resultado indica que, aunque guardan similitud entre sus dominios para captar iones metálicos, estas no presentan similitud en la secuencia.

El alineamiento muestra que las MTs de *T. vaginalis*, no pertenecen a ninguna de las 15 familias que están descritas en la literatura, sin embargo, estas presentan similitud en sus dominios, estos dominios son encontrados en las secuencias tanto del parásito como las de los otros organismos. Una vez identificada la secuencia de la MT, ésta se analizó en la base de datos NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>). Estas proteínas no tienen un dominio conservado, la similitud que guardan solo es en los dominios descrita como una forma de “yoyo”.

```

N-Terminal Domains
XP_001304130.1      MSAQETCCQCNKQSSENCHCDGECCKHQK-----
XP_001584034.1      MSSETTCHCNKQATETCHCGKECKCCGSKQEGKT-----
N-Terminal_Signature  MSXXXTCXCNKQXXEXCHCXXECKCCXXXXXXXXX-----
MB_6Cys:2Cd2+      -----1-2-----3-4---5-6+-----

N-Terminal Domains
XP_001321197.1      MSSQKTCDCNKQAGKSQWF-----
XP_001321169.1      MSSQQTCECNKQAGKSQWF-----
N-Terminal_Signature  MSSQXTXCXCNKQAGKSQWF-----
MB_2Cys      -----1-2-----

Repeated Domains
XP_001304130.1_D1    E-CKCNEGCMCGNDCHCTKDNKCSFDC HCG-----
XP_001304130.1_D2    EGCHCNEGCKCGNDCHCTKDNKCSFDC HCDH-----
XP_001584034.1_D1    E-CHCCEGCKCGPDCHCTKDNKCCPECKCG-----
XP_001584034.1_D2    EGCHCCEGCKCGPDCHCTKDNKCCPECKCG-----
XP_001584034.1_D3    EGCHCCEGCKCGPDCHCTKDNKCCPECKCG-----
XP_001584034.1_D4    EGCHCCEGCKCGPDCHCTKDNKCCPECKCDH-----
XP_001321197.1_D1    K-CQCCPGCKCGSNCHCTKDNKCSFDC HCG-EGCNCN-
XP_001321197.1_D2    EGCYCNEGCKCGSNCHCTKDNKCSFDC HCG-----
XP_001321197.1_D3    EGCHCNEGCKCGSNCHCTKDNKCSFDC HCG-EGCNCN-
XP_001321197.1_D4    EGCYCNEGCKCGSNCHCTKDNKCSFDC HCG-EGCNCN-
XP_001321197.1_D5    EGCYCNEGCKCGSNCHCTKDNKCSFDC HCG-----
XP_001321197.1_D6    EGCHCNEGCKCGSNCHCTKDNKCSFDC HCG-EGCNCN-
XP_001321197.1_D7    EGCYCNEGCKCGSNCHCTKDNKCSFDC HCG-EGCNCN-
XP_001321197.1_D8    EGCYCNEGCKCGSNCHCTKDSKCSFDC HCG-----
XP_001321197.1_D9    EGCNCNEGCKCGADCHC NN-----
XP_001321169.1_D1    K-CQCCPGCKCGSNCHCTKDNKCSFDC HCG-----
XP_001321169.1_D2    EGCHCNEGCKCGADCHCTKDNKCSFDC HCG-----
XP_001321169.1_D3    EGCHCNEGCKCGADCHCTKDNKCSFDC HCG-----
XP_001321169.1_D4    EGCHCNEGCKCSFDC HCTKDNKCSFDC HCG-----
XP_001321169.1_D5    EGCHCNEGCKCSFDC HCG-----
XP_001321169.1_D6    EGCHCNEGCKCGADCHCTKDNKCSFDC HCG-EGCHCN-
XP_001321169.1_D7    EGCKCGADCHCGEGCHCNEGCKCSFDC HCNH-----

More_conserved_resid  EGCHCNEGCKCGSNCHCTKDNKCSFDC HCG-EGCNCN-
MB_9Cys+2Cys:4Cd2+  --1-2+--3-4---5-6-----7---8-9--|1-2-
Other_resid          K-CYCCPDCHCSADCHCNEGCKCCPECKCD-EGCHCN-
MB_9Cys:3Cd2+      --1-2+--3-4---5-6---+7+--8-9-----
MB_6Cys:2Cd2+      --1-2---3-4---5-6-----

```

**Figura 8. Identificación de metalotioneínas de *T. vaginalis*.** Se observan las secuencias obtenidas del BLAST de TvMT-1 y la identidad de los dominios identificados en la secuencia de aminoácidos de MTs de *T. vaginalis*. Los números de acceso de las secuencias utilizadas obtenidas de Gene Bank son: XP\_001304130.1, XP\_001584034.1, XP\_001321169.1 y XP\_001321197.1

```

5ML1          GSSMSVFGAGCTDVCKQTECGCATSGCNCTDDCKQDSG KYGAGCTDTCKQTECGCCSGCNKEDCHQSSC STACKAAGSKCKGKGTGIDCKCDRSQSC
MB_9Cys:3Cd2+ |-----1-2-----3-4-----5-6---7-8-9-|---1-2-----3-4---5-6---7-8-9-|-1-2-----3-4---5-----6-7---8-9-

1M0J-1M0G    --DT--CFG--SKSGICNCGGSCITNCSKSKCH--SCCPCPSGCTKCAAGCVCKGKI-----CDTSQQ
2MHU-1MHU    -MDP--NCSG--AAGDSCTCAGSKCKEKRCTSKH--KSCCSCPVGCAKCAQGCICRGAS-----DKC--SCCA
2MRB-1MRB    -MDP--NCSAAAGDSCTCANSCTCKACKCTSKH--KSCCSCPVGCAKCAQGCICRGAS-----DKC--SCCA
1JI9         -----1-2-----3-4-----5-6---7-8-9-|---1-2-----3-4---5-----6-7---8-9-
MB_9Cys:3Cd2+ -----1-2-----3-4-----5-6---7-8-9-|---1-2-----3-4---5-----6-7---8-9-
MB_11Cys:4Cd2+ -----1-2-----3-4-----5-6---7-8-9-|-12-34---5-6---7-8-----9---01-

1QJK-1QJL    -FDVKVCTTEGKECACFGQDCCVTEGCKDGTCCGI CTNAACKANGCKCGSGCBTEGNCAQ
MB_11Cys:4Cd2+ -|-1-23-----4-5-----67---89---01-|-----1-2-3-4-5-6-7-8-9
MB_9Cys:3Cd2+ -----1-2-----3-4-----5-6---7-8-9-|-1-2-3-4-5-6-7-8-9

6GRV         -NELRCGCEDCCKVDPERVFNHDGEANCSQACAECH--ENGEPCPADDCPCERSCKVGGDLTNN
MB_9Cys+2His:4Cd2+ -|-1-2-3-4-----5-----6---7-8-----9---0-1-----

6GV7         -NELRCGCEDCCKVDPERVFNHDGEANCSQACAECH--ENGEPCPADDCPCERS
1JJD         -FLVKCAEELCNVDESKAIDRNGLVYCEACADGHVGGSKGCGHTGCNCHG
MB_9Cys+2His:4Cd2+ -|-1-2-3-4-----5-----6---7-8-----9-0-1-----

2KAK         GEHTTCGCGEHCGCNFCACGRECTESGHANRRANCSGAACNCAACGSAIARQ
MB_2Cys+2His:1Zn2+ |1-----2-----3-4-----
MB_9Cys:3Zn2+  -|-1-2-3-4-----5-6---7-8-9-----

1DME         -GFCNDKCVCEGGCKAGCCTSCRCS
1J5M         -GFCCKDKCECAEGGCKTGCKTSCRCS
MB_9Cys:3Cd2+ -|-12---3-4-----5---6-7-8-9-

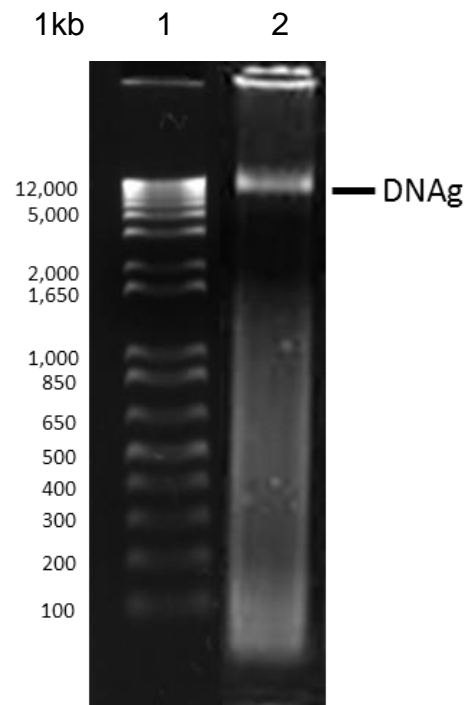
2L61         GSGDDKCGCAVFCFGGTCRCISAR
MB_6Cys:2Cd2+ -|-1---2-3-4-----5-6-----

```

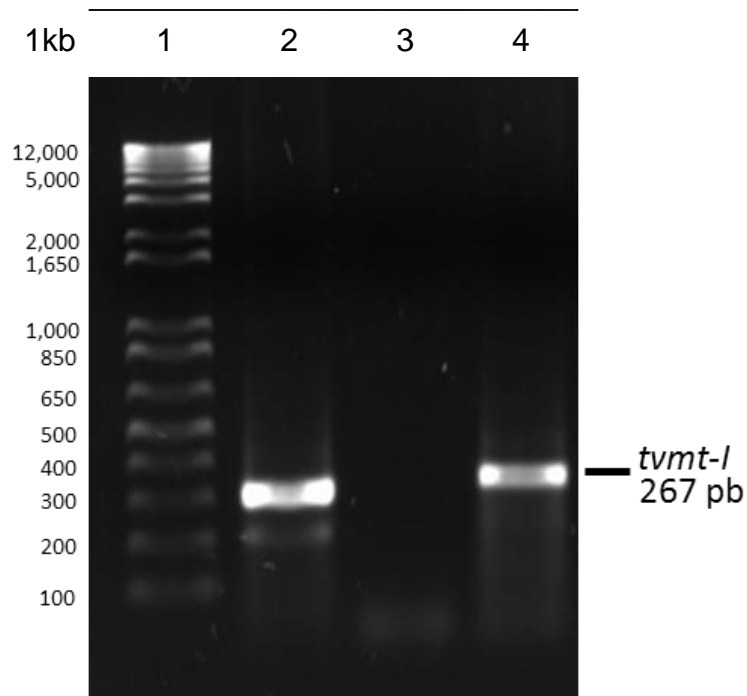
**Figura 9. Análisis de metalotioneínas de otros organismos.** Alineamiento de dominios de MTs de otros organismos, obtenidas de la base de datos PDB (<https://www.rcsb.org/>), se observan la cantidad de cisteínas que presenta cada dominio, los números de acceso de las secuencias de aminoácidos obtenidas de PDB son: 1M0J (*Notothenia neglecta*), 1M0G (*Notothenia neglecta*), 2MHU (*Homo sapiens*), 1MHU (*Homo sapiens*), 2MRB (*Oryctolagus cuniculus*), 1MRB (*Oryctolagus cuniculus*), 1QJK (*Strongylocentrotus purpuratus*), 1QJL (*Strongylocentrotus purpuratus*), 6GRV (*Pseudomonas fluorescens*), 6GV7 (*Pseudomonas fluorescens*), 1JJD (*Synechococcus elongatus*), 2KAK (*Triticum aestivum*), 1DME (*Callinectes sapidus*), 1J5M (*Homarus americanus*) y 2L61 (*Triticum aestivum*).

## **8.2. Amplificación mediante PCR del gen *tvmt-1* de *T. vaginalis***

El DNA genómico se utilizó como templado para llevar a cabo la amplificación del gen, este proceso se realizó mediante el uso de oligonucleótidos específicos de la secuencia de *tvmt-1* y como control positivo se utilizaron oligonucleótidos previamente diseñados para el mismo gen. La integridad del DNA genómico se visualizó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y la amplificación fue visualizada en un gel de agarosa al 2 % donde se observó un amplicón de 267 pb.



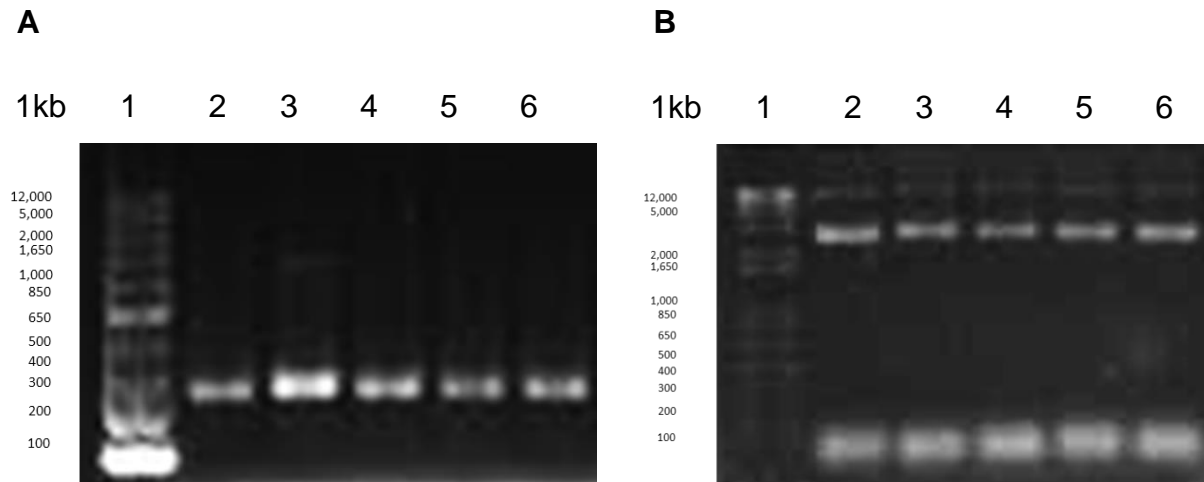
**Figura 10. DNA genómico de *T. vaginalis*.** Se muestra la banda de DNA genómico de *T. vaginalis*, obtenidas por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %. Carriles: 1) marcador de 1 kb, 2) DNA genómico.



**Figura 11. Amplificación del gen *tvmt-1*.** En la imagen se muestra la amplificación del fragmento de 267 pb correspondiente al tamaño de *tvmt-1*, visualizado por electroforesis en gel de agarosa al 2%. Carriles: 1) Marcador de 1 kb, 2) Control positivo (oligonucleótidos diseñados anteriormente) 3) Control negativo, 4) PCR DNA genómico.

### **8.3. Clonación y Extracción de DNA plasmídico**

Posteriormente de la clonación, de las clonas obtenidas en la placa, se picaron 5 y se hizo PCR de colonia, para verificar que las clonas seleccionadas, tengan el fragmento de 267 pb correspondiente a *tvm1-1*. En la electroforesis en gel de agarosa observamos que la amplificación es positiva dando una banda en el tamaño esperado de 267 pb correspondiente al tamaño del gen. Después de obtener un resultado positivo por PCR de colonia, se extrajo el DNA plasmídico y la integridad se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1%, se observó la presencia de 3 bandas correspondientes al DNA plasmídico en su forma relajada, enrollada y súper enrollada.



**Figura. 12. Extracción de DNA plasmídico y Amplificación de *tvmt-1*.** **A** Se observa la amplificación del amplicón de 267 pb correspondiente a *tvmt-1*, obtenida por PCR colony, se verifico por electroforesis en gel de agarosa al 2%. En los carriles 1) marcador de 1 Kb, 2) PCR de clona 1, 3) PCR de clona 2, 4) PCR de clona 3, 5) PCR de clona 4 y 6) PCR de clona 5. **B** Se observa el DNA plasmídico obtenido de las clonas positivas en PCR de colonia, se visualizó por electroforesis en gel de agarosa al 1%. En los carriles 1) marcador de 1 Kb, 2) Clona 1, 3) Clona 2, 4) Clona 3, 5) Clona 4 y 6) Clona 5.

#### **8.4. Secuenciación**

Para este ensayo se utilizó como templado el DNA plasmídico obtenido de las 5 clonas positivas, y que presenta el amplicón de 267 pb obtenido por PCR de colonia, una vez realizado el protocolo de secuenciación las muestras se analizaron con el secuenciador, posteriormente las secuencias obtenidas se analizaron por alineamiento local en ClustalW. El análisis mostro que el fragmento clonado presenta gran identidad a la secuencia del gen *tvmf-1* obtenido de la base de datos TrichDB, este resultado revela una diferencia en dos nucleótidos en la secuencia clonada, sin embargo, la diferencia no modifica la estructura.

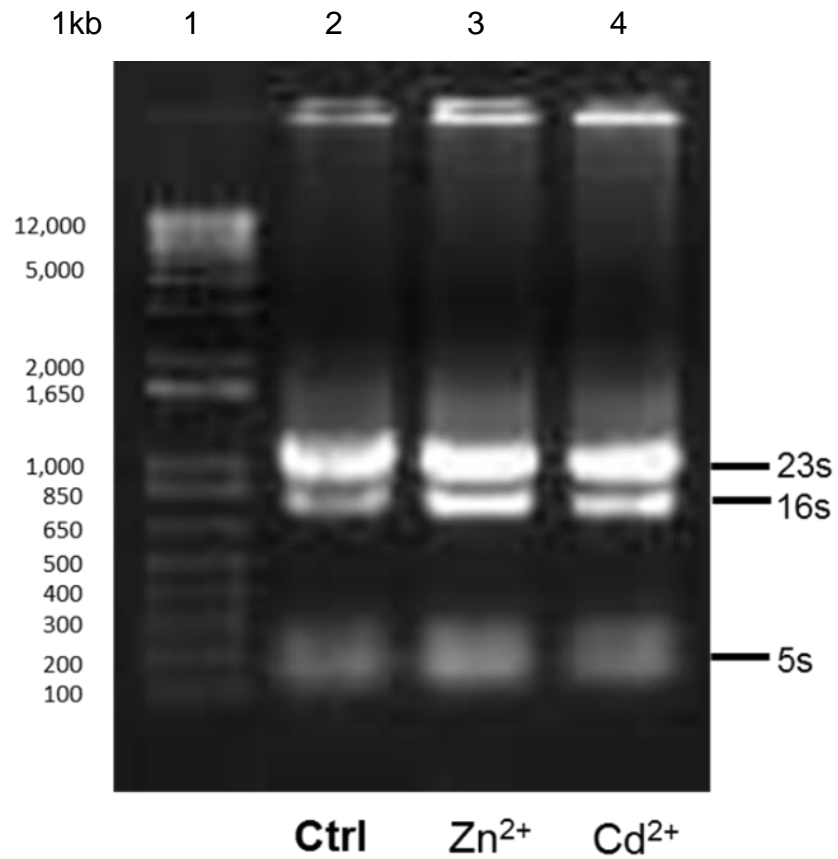
**tvmt-1**

```
CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignmentmeta
-----ATGTCSTR1
CCATTCTAAAAGGGGGCGATTGATTTAGCGGCCGCGAATTCGCCCTTGGGATCCATGTC
*****meta
TGCTCAAGAAACATGCCAGTGCAACAAGCAATCCTCAGAGAAGTCCACTGTGATGGTGASTR1
TGCTCAAGAAACATGCCAGTGCAACAAGCAATCCTCAGAGAAGTCCACTGTGATGGTGA
*****meta
GTGCAAGTGTGATCAGAAGGAATGCAAAATGCAACGAAGGCTGCATGTGTGGAAACGATTGSTR1
GTGCAAGTGTGATCAGAAGGAATGCAAAATGCAACGAAGGCTGCAAGTGTGGAAACGATTG
*****meta
CCACTGCACAAAAGACAACAAATGCTCACCAGATTGCCATTGTGGAGAAGGCTGCCATTGSTR1
CCACTGCACAAAAGACAACAAATGCTCACCAGATTGCCATTGTGGAGAAGGCTGCCATTG
*****meta
CAACGAAGGCTGCAAGTGTGGAAACGATTGCCACTGCACAAAAGACAACAAATGCTCACSTR1
CAACGAAGGCTGCAAGTGTGGAAATGATTGCCACTGCACAAAAGACAACAAATGCTCAC
*****meta
AGATTGCCATTGTGATCATTAA-----STR1
AGATTGCCATTGTGATCATTAAAGCTTCAAGGGCGAATTCGTTTAAACCTGCAGGACTA
*****meta
-----STR1
GTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTCTGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGT
meta
-----STR1
GTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTA
```

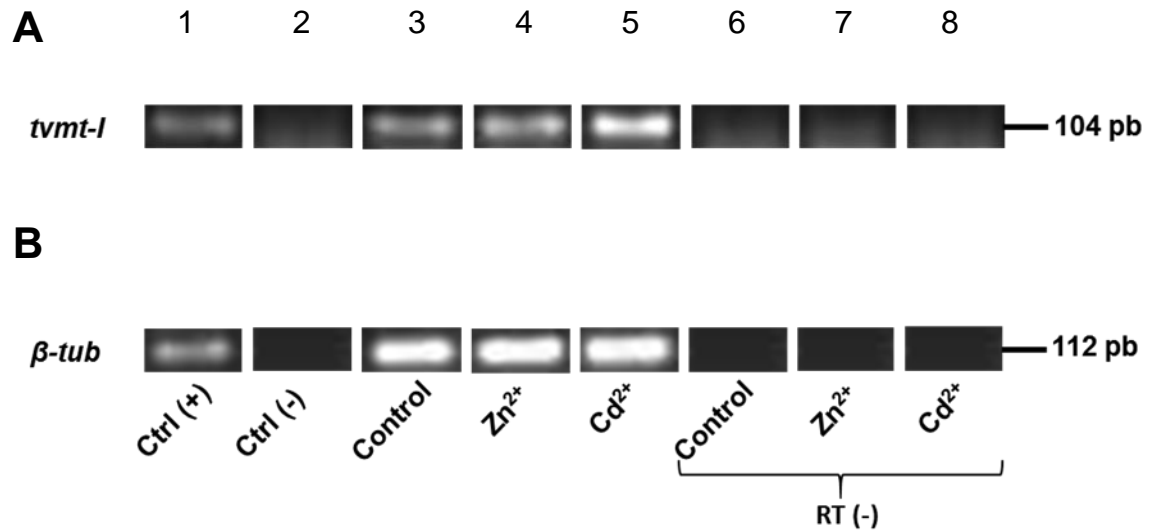
**Figura. 13. Alineamiento de secuencias.** En la imagen se observa dentro del recuadro rojo el alineamiento que se llevó a cabo para la secuencia obtenida de la secuenciación y la secuencia obtenida de la base de datos TrichDB. Dentro del recuadro azul se observan los nucleótidos que son diferentes entre las dos secuencias.

### **8.5. Análisis de expresión de *tvmt-1* de *T. vaginalis*.**

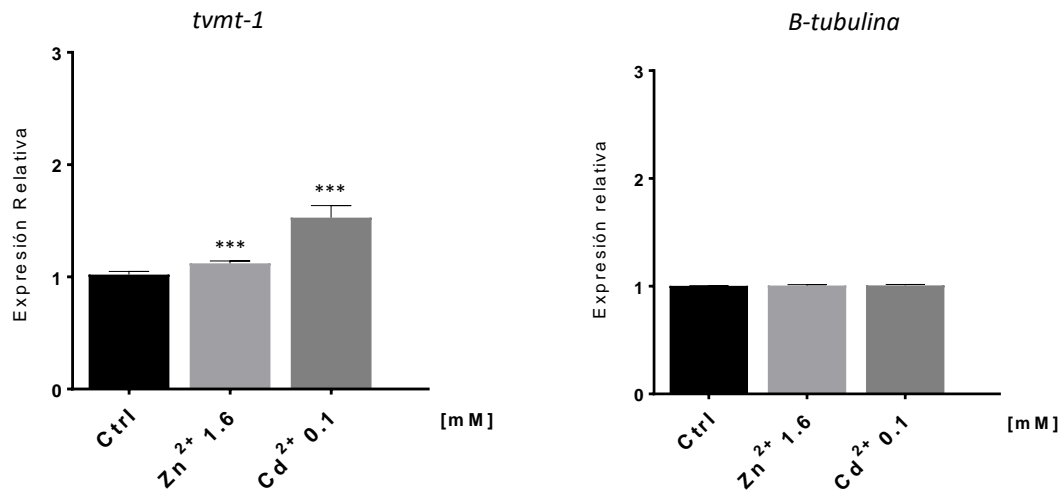
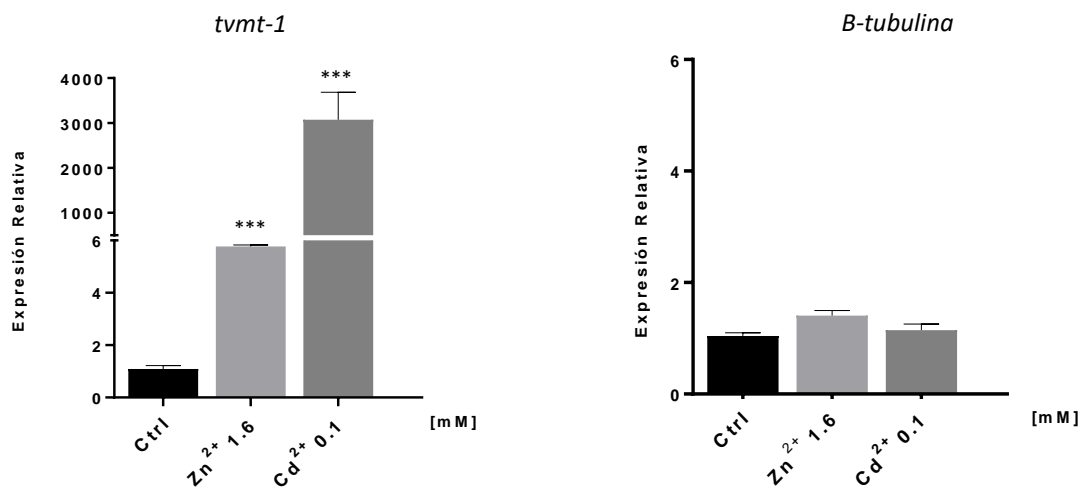
A partir del RNA total obtenido del cultivo de parásitos de las 3 condiciones de cultivo control, y condición de cultivo con medio suplementado con  $Zn^{2+}$  1.6 mM y  $Cd^{2+}$  0.1 mM, se realizó la cuantificación para llevar a cabo la RT-PCR utilizando 1  $\mu$ g de RNA para la síntesis del cDNA, para la posterior amplificación del gen *tvmt-1* con los oligonucleótidos diseñados específicamente, usando 100 ng de cDNA como templado, amplificando un fragmento de 104 pb. Como control de carga se utilizó el amplificado del gen de  *$\beta$ -tubulina* (112 pb), se expresa constitutivamente y presenta cambios en las 3 condiciones de cultivo. El análisis densitométrico del experimento se realizó midiendo la densidad de las bandas del gel de agarosa obtenido después de la amplificación. Se observó un incremento en la expresión del gen *tvmt-1*, de 3000 veces mayor en presencia  $Cd^{2+}$  y 6 veces mayor en presencia de  $Zn^{2+}$  respecto del control al cual no se le adicionó ningún catión. Las diferencias estadísticamente significativas entre las medias se determinaron mediante análisis de varianza (ANOVA) con una  $p=0.05$ , utilizando GraphPad Prism 7.0. La medición se realizó considerando como 100% la expresión de *tvmt-1* en condiciones normales.



**Figura 14. RNA total de *T. vaginalis*.** En la imagen se observa el RNA total obtenido de las 3 condiciones de cultivo de *T. vaginalis*, se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1% para observar la integridad del RNA. Carriles: 1) Marcador de 1 kb, 2) RNA control, 3) RNA cultivo en presencia de Zn<sup>2+</sup>, 4) RNA cultivo en presencia de Cd<sup>2+</sup>.



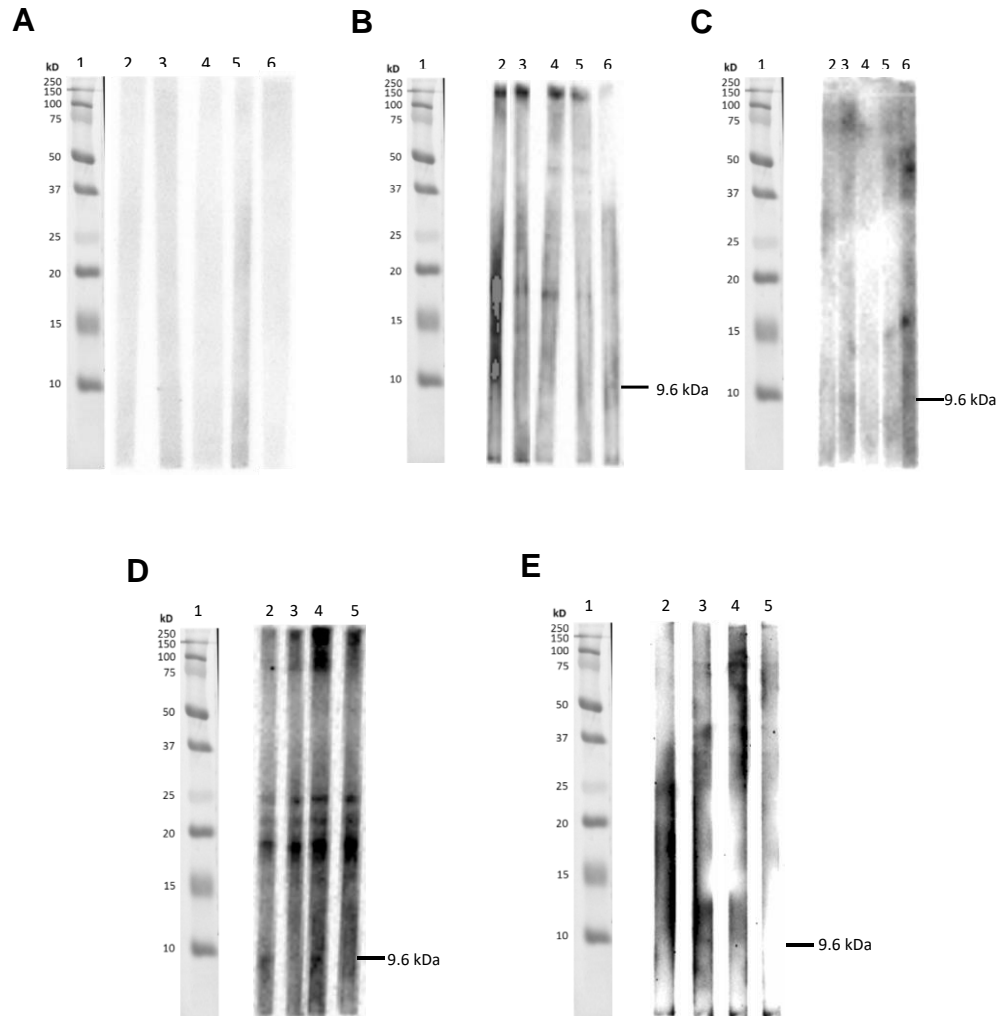
**Figura 15. Expresión relativa del gen *tvmt-1* de *T. vaginalis* en presencia y ausencia de iones divalentes.** Se observa el tamaño del amplicón de 104 pb obtenido por PCR punto final utilizando como templado cDNA, el producto se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 2%. **A.** Carriles: 1) control positivo con DNAg, 2) control negativo, 3) cultivo control, 4) Zn<sup>2+</sup> 1.6 mM, 5) Cd<sup>2+</sup> 0.1 mM, 6) RT (-) cultivo control, 7) RT (-) Zn<sup>2+</sup> 1.6 mM, 8) RT (-) Cd<sup>2+</sup> 0.1 mM. **B** control de carga con el gen *β-tubulina*. Carriles: 1) control positivo con DNAg, 2) control negativo, 3) cultivo control, 4) Zn<sup>2+</sup> 1.6 mM, 5) Cd<sup>2+</sup> 0.1 mM, 6) RT (-) cultivo control, 7) RT (-) Zn<sup>2+</sup> 1.6 mM, 8) RT (-) Cd<sup>2+</sup> 0.1 mM.

**A****B**

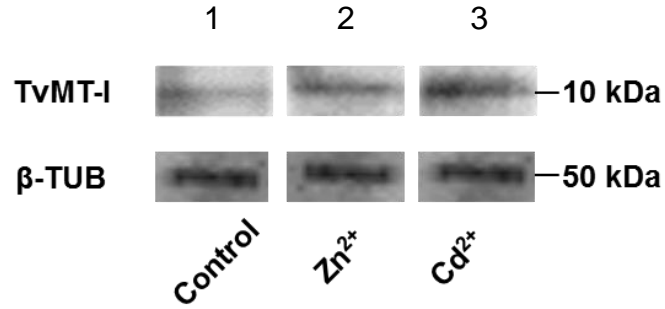
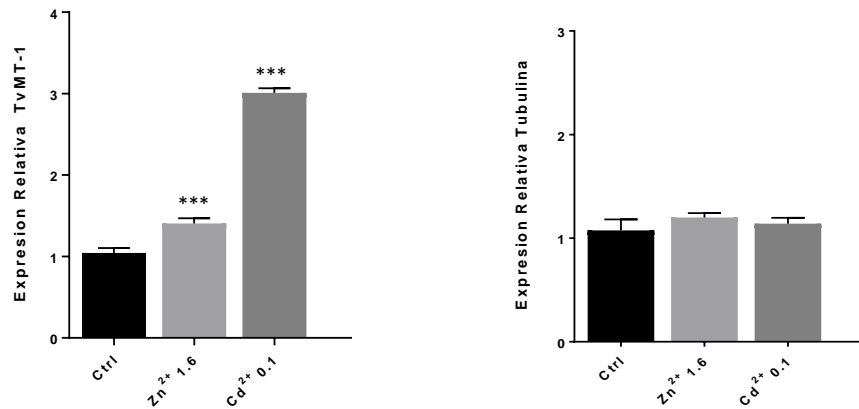
**Figura 16. Expresión relativa del gen *tvmt-1* en presencia y ausencia de cationes divalentes. A.** Expresión relativa obtenida mediante densitometría del ensayo de PCR semicuantitativa del gen *tvmt-1* y su control de carga *β-tubulina* del lado derecho. **B** Expresión relativa obtenida mediante los resultados de PCR cuantitativa, gen *tvmt-1* del lado derecho y control de carga *β-tubulina* del lado derecho. La barra oscura representa la condición de cultivo sin iones, la barra de en medio representa la condición de cultivo en presencia de Zn<sup>2+</sup> y la última barra representa la condición de cultivo en presencia de Cd<sup>2+</sup>. Las puntuaciones que muestran significación estadística se indican con asteriscos, con un valor de p=0,05.

### **8.6. Inmunodetección de TvMT-1 en *T. vaginalis***

Para identificar a TvMT-1 se realizó una titulación de los sueros de cada ratón inmunizado, se obtuvo el suero preinmune y cada sangrado para cada ratón. Para cada suero se preparó una dilución de 1:1000. Se obtuvo reactividad en el peso correspondiente a TvMT-1 de 9.6 kDa. Para el sangrado 1 en los ratones 2, 3, 4 y 5, sangrado 2 en los ratones 1, 2 y 5, sangrado 3 en los ratones 2 y 4, y finalmente en el sangrado 4 en el ratón 3. Posteriormente para determinar la abundancia de la proteína TvMT-1, se cultivaron parásitos en medio con suplementado con  $Zn^{2+}$  1.6 mM y  $Cd^{2+}$  0.1 mM. Se observó un incremento en la expresión de la proteína en las muestras obtenidas de los cultivos suplementados con los iones metálicos en comparación con el control siendo significativamente mayor para el cultivo suplementado con  $Cd^{2+}$ . Las diferencias estadísticamente significativas entre las medias se determinaron mediante análisis de varianza (ANOVA) con una  $p=0.05$ , utilizando GraphPad Prism 7.0. La medición se realizó considerando como 100% la expresión de TvMT-1 en condiciones normales



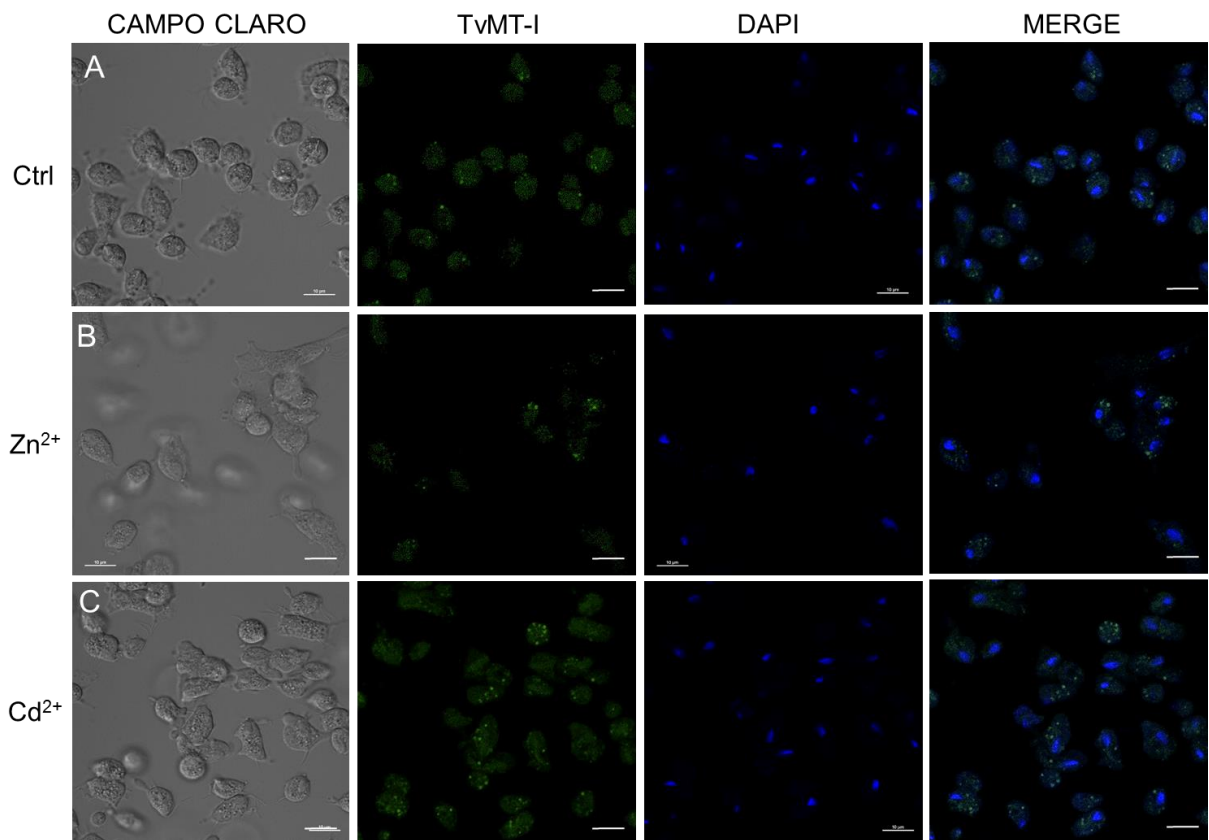
**Figura 17. Titulación de sueros anti-TvMT-1.** En la imagen se observan las membranas que presentan reactividad con anti-TvMT-1 en el peso de 9.6 kDa correspondiente a la proteína. **A** Titulación de los sueros preinmunes. **B** Sangrado 1 correspondiente a la semana 1 después de la inmunización. **C** Sangrado 2 correspondiente a la semana 2 después de la inmunización. Para **A**, **B** y **C** carril 1) marcador de peso molecular 2) suero ratón 1 3) suero ratón 2 4) suero ratón 3 5) suero ratón 4 6) suero ratón 5. **D** Sangrado 3 correspondiente a la semana 3 después de la inmunización. **E** Sangrado 4 correspondiente a la semana 4 después de la inmunización. Para **C** y **D** carril 1) marcador de peso molecular 2) suero ratón 2 3) suero ratón 3 4) suero ratón 4 5) suero ratón 5.

**A****B**

**Figura 18. Expresión relativa de la proteína TvMT-1.** Western Blot de TvMT-1. **A.** Carriles: 1) muestra control, 2) parásitos cultivados con  $Zn^{2+}$  1.6 mM, 3) parásitos cultivados con  $Cd^{2+}$  0.1 mM. En la segunda fila se muestra el control de carga con  $\beta$ -tubulina. Carriles: 1) muestra control, 2) parásitos cultivados con  $Zn^{2+}$  1.6 mM, 3) parásitos cultivados con  $Cd^{2+}$  0.1 mM, 6). **B.** Análisis densitométrico de las bandas correspondiente a TvMT-1 (izquierda) y  $\beta$ -Tubulina (derecha). Las puntuaciones que muestran significación estadística se indican con asteriscos, con un valor de  $p=0,05$ .

### **8.7. Inmunolocalización de TvMT-1 en *T. vaginalis***

Para localizar a la proteína y su abundancia en los parásitos crecidos en ausencia y presencia de  $Zn^{2+}$  1.6 mM y  $Cd^{2+}$  0.1 mM, se realizó una Inmunofluorescencia indirecta en laminillas con parásitos *T. vaginalis* permeabilizados, utilizando suero anti-TvMT-1 y anti-ratón conjugado con HRP. Se observó que la TvMT-1 está localizada en el citoplasma del parásito y también se observó un incremento en la fluorescencia (abundancia de la proteína).



**Figura 19. Inmunolocalización de TvMT-1 en *T. vaginalis*.** Microscopia Confocal 60X. **A.** Parásitos crecidos en condiciones normales (sin iones metálicos), **B.** Parásitos crecidos en presencia de Zn<sup>2+</sup> 1.6 mM, **C.** Parásitos crecidos en presencia de Cd<sup>2+</sup> 0.1 mM. En las 3 condiciones se observan imágenes de campo claro en la primera columna, en la segunda columna se observa la detección de la proteína con el anti-TvMT-1 (verde), la tercera columna se observa el núcleo de los parásitos teñido con DAPI y en la cuarta columna se observa el MERGE.

## 9. DISCUSION

Para que el parásito *T. vaginalis* colonice el tracto genitourinario, es necesario que este se adapte al microambiente que allí se encuentra, sin embargo, la presencia de iones metálicos hace más difícil este proceso. Por eso el parásito cuenta con proteínas llamadas MTs encargadas de quelar los iones metálicos que se encuentran en el medio del tracto genitourinario y que a su vez son tóxicos para el parásito, permitiendo su supervivencia dentro del hospedero (De Francisco y cols., 2017).

Mediante el análisis bioinformático, en este trabajo se usó la secuencia del gen *tvmt-1*, obtenido de la base de datos TrichDB.org (número de acceso TVAG\_220940). El alineamiento con la secuencia en NCBI, arrojó MTs tanto del parásito como de otros organismos. Se encontró que entre dichas secuencias presentan homología entre sí. Sin embargo, se encontró que están formadas por dominios repetidos y que éstos a si presentan identidad en las 4 secuencias. Los dominios identificados están organizados en 11 Cys x 4 iones, 9 Cys x 3 iones, 6 Cys x 2 iones y 4 Cys x 1 ion similar a los dominios que están reportados en: *RnorMT-2*: MT-2 de *Rattus norvegicus*. *ScerCUP1*: CUP1 de *Saccharomyces cerevisiae*. *SynSmtA*: *SmtA* de *Synechococcus sp.* También se observó que estas MTs no se encuentran agrupadas en ninguna de las 15 familias propuestas por Cobbet y Goldsbrough en 2002, esto después de que fueron alineadas con secuencias de MTs de otros organismos. Sin embargo, la organización de los dominios es similar a la que reporta Kägi en 1991, incluyendo la presencia de motivos en la secuencia organizados como: CysX-Cys, CysXX-CYS y Cys-Cys (donde X es un aminoácido distinto a Cys), tanto en las 4 secuencias del parásito como en las secuencias de organismos distintos.

Se ha reportado que las MTs por ser proteínas que quelan iones metálicos, aumentan su expresión en presencia de iones metálicos; en hongos las MTs, se clasifican principalmente como proteínas de unión al cobre, como el *Cup1* MT de *S. cerevisiae*. CUP1 se expresa en respuesta a iones de cobre y protege a la levadura de la toxicidad del cobre. Como consecuencia, los mutantes *Dcup1* son extremadamente sensibles a las sales de cobre. MTs similares se han descrito en

*Nourospora crassa*, *Agaricus bisporus*, y más recientemente en un hongo micorrízico (Tucker y cols., 2004). Por otro lado, en el erizo de mar Mediterráneo *Paracentrotus lividus*. Dos miembros, PIMT7 y PIMT8, se expresan constitutivamente y se observa que son regulados positivamente en respuesta al tratamiento con cadmio, mientras que PIMT4, PIMT5 y PIMT6 se activan después de la exposición a cadmio (Ragusa y cols., 2017). Como ya sabemos, la regulación de las MTs se da por la presencia del factor de transcripción MTF-1, que se encarga de captar los iones metálicos como es el caso del cadmio y una vez unidos, este se posiciona en la región localizada antes del Inr que da inicio a la transcripción del gen denominada MRE, esto sugiere que, cuanto mayor sea la presencia de iones metálicos la expresión se verá aumentada en el parásito para evitar la toxicidad del ion metálico. Continuando con el análisis de los niveles de expresión se llevó a cabo un ensayo de inmunodetección, logramos observar que el aumento en la expresión del transcrito del gen *tvmt-1* se correlaciona con el aumento en la expresión de la proteína, observando una diferencia en los parásitos que fueron cultivados en presencia de cadmio y zinc con respecto a el control con parásitos crecidos en ausencia de iones metálicos.

Para la localización de la MT se cultivaron parásitos en presencia y ausencia de iones metálicos que después fueron fijados en laminillas e incubados con el anti-TvMT-1, observándose que la MT se encuentra con mayor expresión en los parásitos cultivados en presencia de cadmio, además se observa la formación de aglomerados del complejo proteína-metal diferentes en las tres condiciones, siendo menor en condición normal, mayor en zinc y aún mayor en cadmio. Este resultado correlaciona con lo reportado por Gutiérrez y colaboradores en 2008, que nos indica que los organismos cuentan con distintos métodos de detoxificación de metales tóxicos para la célula, uno de ellos es la bioacumulación la cual consiste en la inmovilización citoplasmática de los cationes metálicos uniéndolos a una molécula ligando y, en algunos organismos, la posterior compartimentalización del complejo molécula ligando-metal que se genera cuando un ion metálico está en concentraciones muy altas. Este resultado se correlaciona con el aumento en la expresión del transcrito de *tvmt-1* que se observó en la PCR tiempo real después de haber crecido al parásito en cultivos ricos en iones metálicos. Estos resultados se

relacionan con el aumento en los niveles de expresión a nivel de proteína que se observaron en los resultados del ensayo de inmunodetección. Sin embargo, cabe destacar que el aumento de la expresión en presencia de cadmio es aún mayor que en el de zinc ya que las MTs tienen mayor afinidad por cadmio, incluso desplazan al zinc, incrementando los niveles basales de zinc en la célula promoviendo la inducción de la MT para evitar la toxicidad por el aumento en la concentración.

Los resultados obtenidos en cultivos de *T. vaginalis* crecidos en presencia de iones metálicos como  $Zn^{2+}$  y  $Cd^{2+}$  revelan que la TvMT-1 se encuentra regulada a nivel de transcrito y a nivel de proteína en el parásito.

## 10. CONCLUSIONES

-*Trichomonas vaginalis* posee 4 o 5 genes que codifican para MTs hipotéticas. Las MTs identificadas en *T. vaginalis* tienen una identidad entre los dominios que presentan. Pero no se agrupan en ninguna de las 15 familias descritas.

-La presencia de iones metálicos en cultivos de *T. vaginalis* induce una sobreexpresión de TvMT-1 a nivel de transcrito y a nivel de proteína.

-Existe un aumento en la fluorescencia y abundancia de la proteína TvMT.1 en presencia de iones metálicos. La TvMT-1 se localiza en el citoplasma del parásito.

## **ANEXOS**

### **Amortiguador TAE 50X**

242 g Trizma base

57.1 ml Ácido acético glacial

37.2 g EDTA

### **Acrilamida/Bisacrilamida**

29.2 g Acrilamida

0.8 g Bisacrilamida

Disolver en 40 ml de agua destilada. Una vez disuelto aforar a 100 ml y filtrar a través de papel Whatman. Guardar a 4°C protegido de la luz.

### **Tris-HCl 4X, pH 8.8**

9.08 g Tris base

0.2 g SDS

Disolver en 20 ml de agua destilada y ajustar pH a 8.8 con HCl. Aforar a 50 ml y filtrar.

### **Tris-HCl 4X, pH 6.8**

3.025 g Tris base

0.2 g SDS

Disolver en 20 ml de agua destilada y ajustar pH a 8.8 con HCl. Aforar a 50 ml y filtrar.

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

10 mg en 1 ml de agua destilada

### **Geles de poliacrilamida al 15%**

#### **Separador**

3.75 ml Agua destilada

7.5 ml Acrilamida/Bisacrilamida

3.75 ml Tris-HCl 4X, pH 8.8

50  $\mu$ l Persulfato de amonio

10  $\mu$ l TEMED

#### **Concentrador**

3.05 ml Agua destilada

650  $\mu$ l Acrilamida/Bisacrilamida

1.25 ml Tris-HCl 4X, pH 6.8

25  $\mu$ l Persulfato de amonio

5  $\mu$ l TEMED

#### **Amortiguador de carga 2X**

400  $\mu$ l SDS-amortiguador 2X

50  $\mu$ l  $\beta$ -mercaptoetanol 5%

50  $\mu$ l Azul de bromofenol (10mg/ml)

400  $\mu$ l Agua destilada

### **Amortiguador de electroforesis 10X**

144 g Glicina

30.2 g Trizma

5.0 g SDS

### **Solución colorante de proteínas (azul coomassie)**

500 ml Metanol

100 ml Ácido acético glacial

400 ml Agua destilada

0.5 g Azul coomassie

Disolver toda la noche. Filtrar y almacenar a temperatura ambiente

### **Solución decolorante**

165 ml Metanol

50 ml Ácido acético glacial

785 ml Agua destilada

### **Amortiguador de transferencia**

25 mM Trizma-base

192 mM Glicina

20% Metanol

### **PBS 1X**

8 g NaCl

8 g KCl

0.65 g Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

0.2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

**PBS 1X Tween 0.01%**

500 ml PBS 1X

50 µl Tween 20

## 11. BIBLIOGRAFIA

1. Spiegel, C. A. (1990). Microflora associated with *Trichomonas vaginalis* and vaccination against vaginal trichomoniasis. In *Trichomonads Parasitic in Humans* (pp. 213-224). Springer, New York, NY.
2. Wølner-Hanssen, P., Krieger, J. N., Stevens, C. E., Kiviat, N. B., Koutsky, L., Critchlow, C., ... & Holmes, K. K. (1989). Clinical manifestations of vaginal trichomoniasis. *Jama*, 261(4), 571-576.
3. Krieger, J. N., & Rein, M. F. (1982). Canine prostatic secretions kill *Trichomonas vaginalis*. *Infection and immunity*, 37(1), 77-81.
4. Krieger, J. N. (1995). Trichomoniasis in men: old issues and new data. *Sexually transmitted diseases*, 22(2), 83-96.
5. Sutcliffe, S., Alderete, J. F., Till, C., Goodman, P. J., Hsing, A. W., Zenilman, J. M., Platz, E. A. (2009). Trichomonosis and subsequent risk of prostate cancer in the Prostate Cancer Prevention Trial. *International journal of cancer*, 124(9), 2082-2087.
6. Bitencourt, F. G., de Brum Vieira, P., Meirelles, L. C., Rigo, G. V., da Silva, E. F., Gnoatto, S. C. B., & Tasca, T. (2018). Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of ursolic acid derivative: a promising alternative. *Parasitology research*, 1-8.
7. OMS. Tricomoniasis. Disponible en: [http://apps.who.int/rhl/rti\\_sti/gscorm/es/index.html](http://apps.who.int/rhl/rti_sti/gscorm/es/index.html)
8. Vigilancia Epidemiológica Semana 52, 2018. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/direccion-general-de-epidemiologia-boletin-epidemiologico>.
9. Petrin, D., Delgaty, K., Bhatt, R., & Garber, G. (1998). Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clinical microbiology reviews*, 11(2), 300-317.
10. Schwebke, J. R., & Burgess, D. (2004). Trichomoniasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4), 794-803.
11. Carlton, J. M., Hirt, R. P., Silva, J. C., Delcher, A. L., Schatz, M., Zhao, Q., ... & Sicheritz-Ponten, T. (2007). Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science*, 315(5809), 207-212

12. Mack, S. R., & Müller, M. (1980). End products of carbohydrate metabolism in *Trichomonas vaginalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 67(2), 213-216.
13. Alvarez-Sánchez, M. E., Carvajal-Gamez, B. I., Solano-González, E., Martínez-Benítez, M., Garcia, A. F., Alderete, J. F., & Arroyo, R. (2008). Polyamine depletion down-regulates expression of the *Trichomonas vaginalis* cytotoxic CP65, a 65-kDa cysteine proteinase involved in cellular damage. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 40(11), 2442-2451.
14. Vazquez Carrillo, L. I., Quintas Granados, L. I., Arroyo, R., Mendoza Hernández, G., González Robles, A., Carvajal Gamez, B. I., & Alvarez Sánchez, M. E. (2011). The effect of Zn<sup>2+</sup> on prostatic cell cytotoxicity caused by *Trichomonas vaginalis*. *Journal of integrated OMICS*, 1(2), 198-210.
15. Hernández, H. M., Marcet, R., & Sarracent, J. (2014). Biological roles of cysteine proteinases in the pathogenesis of *Trichomonas vaginalis*. *Parasite*, 21
16. Alderete, J. F., & Garza, G. E. (1988). Identification and properties of *Trichomonas vaginalis* proteins involved in cytoadherence. *Infection and immunity*, 56(1), 28-33
17. Vieira, P. D. B., Silva, N. L. F., Kist, L. W., Oliveira, G. M. T. D., Bogo, M. R., Carli, G. A. D., ... & Tasca, T. (2015). Iron from haemoglobin and haemin modulates nucleotide hydrolysis in *Trichomonas vaginalis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(2), 201-208.
18. Garcia, A. F., Chang, T. H., Benchimol, M., Klumpp, D. J., Lehker, M. W., & Alderete, J. F. (2003). Iron and contact with host cells induce expression of adhesins on surface of *Trichomonas vaginalis*. *Molecular microbiology*, 47(5), 1207-1224.
19. Hsu, H. M., Lee, Y., Indra, D., Wei, S. Y., Liu, H. W., Chang, L. C., ... & Tai, J. H. (2012). Iron-inducible nuclear translocation of a Myb3 transcription factor in the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryotic cell*, EC-00190.
20. Hsu, H. M., Ong, S. J., Lee, M. C., & Tai, J. H. (2009). Transcriptional regulation of an iron-inducible gene by differential and alternate promoter entries of multiple Myb proteins in the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryotic Cell*, 8(3), 362-372

21. Quintas-Granados, L. I., Villalpando, J. L., Vázquez-Carrillo, L. I., Arroyo, R., Mendoza-Hernández, G., & Álvarez-Sánchez, M. E. (2013). TvMP50 is an immunogenic metalloproteinase during male trichomoniasis. *Molecular & Cellular Proteomics*, mcp-M112.
22. Alvarez-Sánchez, M. E., Solano-González, E., Yañez-Gómez, C., & Arroyo, R. (2007). Negative iron regulation of the CP65 cysteine proteinase cytotoxicity in *Trichomonas vaginalis*. *Microbes and Infection*, 9(14-15), 1597-1605.
23. Hernández-Gutiérrez, R., Avila-González, L., Ortega-López, J., Cruz-Talonia, F., Gómez-Gutierrez, G., & Arroyo, R. (2004). *Trichomonas vaginalis*: characterization of a 39-kDa cysteine proteinase found in patient vaginal secretions. *Experimental parasitology*, 107(3-4), 125-135.
24. Dailey, D. C., & Alderete, J. F. (1991). The phenotypically variable surface protein of *Trichomonas vaginalis* has a single, tandemly repeated immunodominant epitope. *Infection and immunity*, 59(6), 2083-2088.
25. Preston, S., Coad, N., Townend, J., Killham, K. y Graeme, I. P. 2000. Biosensing the acute toxicity of metal interactions: Are they additive, synergistic, or antagonistic? *Env Tox Chem*, 19:775-780.
26. Bondarenko, O., Rõlova, T., Kahru, A., & Ivask, A. (2008). Bioavailability of Cd, Zn and Hg in soil to nine recombinant luminescent metal sensor bacteria. *Sensors*, 8(11), 6899-6923.
27. Mendiola, J., Moreno, J. M., Roca, M., Vergara-Juárez, N., Martínez-García, M. J., García-Sánchez, A., Bernabeu, R. (2011). Relationships between heavy metal concentrations in three different body fluids and male reproductive parameters: a pilot study. *Environmental Health*, 10(1), 6
28. Abdul-Rasheed, O. F. (2010). Association between seminal plasma copper and magnesium levels with oxidative stress in Iraqi infertile men. *Oman medical journal*, 25(3), 168.
29. Farkas, A., Erratico, C., & Vigano, L. (2007). Assessment of the environmental significance of heavy metal pollution in surficial sediments of the River Po. *Chemosphere*, 68(4), 761-768.

30. Pan, J., Plant, J. A., Voulvoulis, N., Oates, C. J., & Ihlenfeld, C. (2010). Cadmium levels in Europe: implications for human health. *Environmental geochemistry and health*, 32(1), 1-12.
31. Fotakis, G., & Timbrell, J. A. (2006). Role of trace elements in cadmium chloride uptake in hepatoma cell lines. *Toxicology Letters*, 164(2), 97-103.
32. De Francisco, P., Martín-González, A., Turkewitz, A. P., & Gutiérrez, J. C. (2017). Extreme metal adapted, knockout and knockdown strains reveal a coordinated gene expression among different *Tetrahymena thermophila* metallothionein isoforms. *PloS one*, 12(12), e0189076.
33. Satarug, S., Garrett, S. H., Sens, M. A., & Sens, D. A. (2009). Cadmium, environmental exposure, and health outcomes. *Environmental health perspectives*, 118(2), 182-190.
34. Liu, J., Qu, W., & Kadiiska, M. B. (2009). Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicology and applied pharmacology*, 238(3), 209-214.
35. Storelli, M. M. (2009). Intake of essential minerals and metals via consumption of seafood from the Mediterranean Sea. *Journal of food protection*, 72(5), 1116-1120.
36. Ololade, I. A., Lajide, L., Olumekun, V. O., Ololade, O. O., & Ejelonu, B. C. (2011). Influence of diffuse and chronic metal pollution in water and sediments on edible seafoods within Ondo oil-polluted coastal region, Nigeria. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 46(8), 898-908.
37. Luparello, C., Longo, A., & Vetrano, M. (2012). Exposure to cadmium chloride influences astrocyte-elevated gene-1 (AEG-1) expression in MDA-MB231 human breast cancer cells. *Biochimie*, 94(1), 207-213.
38. Mao, W. P., Zhang, N. N., Zhou, F. Y., Li, W. X., Liu, H. Y., Feng, J., ... & He, Z. J. (2011). Cadmium directly induced mitochondrial dysfunction of human embryonic kidney cells. *Human & experimental toxicology*, 30(8), 920-929.
39. Zhang, C., Yuan, X., Mao, W., Yue, L., Kong, X., Gao, Y., ... & Yin, Z. (2010). Inhibition of cadmium-induced apoptosis by glutathione S-transferase P1 via mitogen-activated protein kinases and mitochondrial pathways. *Environmental toxicology and pharmacology*, 30(2), 202-208.

40. Låg, M., Rodionov, D., Øvrevik, J., Bakke, O., Schwarze, P. E., & Refsnes, M. (2010). Cadmium-induced inflammatory responses in cells relevant for lung toxicity: Expression and release of cytokines in fibroblasts, epithelial cells and macrophages. *Toxicology letters*, 193(3), 252-260.
41. Wang, B., Li, Y., Tan, Y., Miao, X., Liu, X. D., Shao, C., ... & Cai, L. (2012). Low-dose Cd induces hepatic gene hypermethylation, along with the persistent reduction of cell death and increase of cell proliferation in rats and mice. *PLoS One*, 7(3), e33853.
42. Selim, M. E., El Hamidi, A. R., Aleisa, N. A., & Daghestani, M. H. (2012). The protection role of heat shock protein 70 (HSP-70) in the testes of cadmium-exposed rats. *Bioinformation*, 8(1), 58.
43. Wirth, D., Christians, E., Munaut, C., Dessy, C., Foidart, J. M., & Gustin, P. (2002). Differential heat shock gene hsp70-1 response to toxicants revealed by in vivo study of lungs in transgenic mice. *Cell stress & chaperones*, 7(4), 387.
44. Arbon, K. S., Christensen, C. M., Harvey, W. A., & Heggland, S. J. (2012). Cadmium exposure activates the ERK signaling pathway leading to altered osteoblast gene expression and apoptotic death in Saos-2 cells. *Food and chemical toxicology*, 50(2), 198-205.
45. Gadd, G. M. 2000. Heavy metal pollutants: environmental and biotechnological aspects. En: *The Encyclopedia of Microbiology*. Lederberg, J. (ed.). Academic Press, New York. 2:607-617.
46. Silver, S., & Phung, L. T. (2005). A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32(11-12), 587-605.
47. Lovley, D. R. 2000. *Environmental Microbe-Metal Interactions*. ASM Press, Washington
48. Rauser, W. E. (1999). Structure and function of metal chelators produced by plants. *Cell biochemistry and biophysics*, 31(1), 19-48.
49. Díaz, S., Martín-González, A., & Gutiérrez, J. C. (2006). Evaluation of heavy metal acute toxicity and bioaccumulation in soil ciliated protozoa. *Environment international*, 32(6), 711-717.

50. Piccinni, E., Staudenmann, W., Albergoni, V., De Gabrieli, R. y James, P. 1994. Purification and primary structure of metallothioneins induced by cadmium in the protists *Tetrahymena pigmentosa* and *Tetrahymena pyriformis*. Eur J Biochem, 226:853-859
51. Margoshes, M., & Vallee, B. L. (1957). A cadmium protein from equine kidney cortex. Journal of the American Chemical Society, 79(17), 4813-4814.
52. Coyle, P., Philcox, J. C., Carey, L. C., & Rofe, A. M. (2002). Metallothionein: the multipurpose protein. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 59(4), 627-647.
53. Robinson, N. J., Whitehall, S. K., & Cavet, J. S. (2001). Microbial metallothioneins
54. Kägi, J. H. (1991). Overview of metallothionein. In Methods in enzymology. Vol. 205, pp. 613-626.
55. Capasso, C., Carginale, V., Scudiero, R., Crescenzi, O., Spadaccini, R., Temussi, P. A., & Parisi, E. (2003). Phylogenetic divergence of fish and mammalian metallothionein: relationships with structural diversification and organismal temperature. Journal of molecular evolution, 57(1), S250-S257.
56. Klaassen, C. D., Liu, J., & Choudhuri, S. (1999). Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. Annual review of pharmacology and toxicology, 39(1), 267-294
57. Tanguy, A., & Moraga, D. (2001). Cloning and characterization of a gene coding for a novel metallothionein in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (CgMT2): a case of adaptive response to metal-induced stress? Gene, 273(1), 123-130
58. Binz, P. A., & Kägi, J. H. (1999). Metallothionein: molecular evolution and classification. In Metallothionein Iv (pp. 7-13). Birkhäuser, Basel.
59. García-Rico, L., del Refugio Robles-Burgueño, M., Valenzuela-Soto, E. M. (1999). Las metalotioneínas y su relación con la toxicidad del cadmio en los mamíferos. Revista internacional de contaminación ambiental, 15(2), 113-120
60. Brambila, E., Lozano, P., Zaráin, P. (1999). Metalotioneínas bioquímica y funciones propuestas. Boletín de Educación Bioquímica, 18(1), 21-27.
61. Krishna, S. S., Majumdar, I., & Grishin, N. V. (2003). Structural classification of zinc fingers: survey and summary. Nucleic acids research, 31(2), 532-550.

62. Esposito, S., Baglivo, I., Malgieri, G., Russo, L., Zaccaro, L., D'Andrea, L. D., ... & Pedone, P. V. (2006). A novel type of zinc finger DNA binding domain in the *Agrobacterium tumefaciens* transcriptional regulator Ros. *Biochemistry*, 45(34), 10394-10405.
63. Theunissen, O., Rudt, F., Guddat, U., Mentzel, H., & Pieler, T. (1992). RNA and DNA binding zinc fingers in *Xenopus* TFIIIA. *Cell*, 71(4), 679-690.
64. Hardyman, J. E. J., Tyson, J., Jackson, K. A., Aldridge, C., Cockell, S. J., Wakeling, L. A., ... & Ford, D. (2016). Zinc sensing by metal-responsive transcription factor 1 (MTF1) controls metallothionein and ZnT1 expression to buffer the sensitivity of the transcriptome response to zinc. *Metallomics*, 8(3), 337-343.
65. Rutherford, J. C., & Bird, A. J. (2004). Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc, and copper homeostasis in eukaryotic cells. *Eukaryotic cell*, 3(1), 1-13.
66. Hogstrand, C., Zheng, D., Feeney, G., Cunningham, P., & Kille, P. (2008). Zinc-controlled gene expression by metal-regulatory transcription factor 1 (MTF1) in a model vertebrate, the zebrafish.
67. Bird, A. J., Zhao, H., Luo, H., Jensen, L. T., Srinivasan, C., Evans-Galea, M., ... & Eide, D. J. (2000). A dual role for zinc fingers in both DNA binding and zinc sensing by the Zap1 transcriptional activator. *The EMBO Journal*, 19(14), 3704-3713.
68. Zhao, H., Butler, E., Rodgers, J., Spizzo, T., Duesterhoeft, S., & Eide, D. (1998). Regulation of zinc homeostasis in yeast by binding of the ZAP1 transcriptional activator to zinc-responsive promoter elements. *Journal of Biological Chemistry*, 273(44), 28713-28720.
69. Tadepally, H. D., Burger, G., & Aubry, M. (2008). Evolution of C2H2-zinc finger genes and subfamilies in mammals: species-specific duplication and loss of domains, genes and effector domains. *BMC evolutionary biology*, 8(1), 176.
70. Villalpando, J. L., Arreola, R., Puente-Rivera, J., Azuara-Liceaga, E., Valdés, J., López-Canovas, L., ... & Alvarez-Sánchez, M. E. (2017). TvZNF1 is a C 2 H 2 zinc finger protein of *Trichomonas vaginalis*. *Biometals*, 30(6), 861-872.

71. Miles, A. T., Hawksworth, G. M., Beattie, J. H., & Rodilla, V. (2000). Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 35(1), 35-70
72. Westin, G., & Schaffner, W. (1988). A zinc-responsive factor interacts with a metal-regulated enhancer element (MRE) of the mouse metallothionein-I gene. *The EMBO journal*, 7(12), 3763-3770.
73. Andrews, G. K. (2000). Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochemical pharmacology*, 59(1), 95-104.
74. Stohs, S. J., & Bagchi, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free radical biology and medicine*, 18(2), 321-336
75. Bourdineaud, J. P., Baudrimont, M., Gonzalez, P., & Moreau, J. L. (2006). Challenging the model for induction of metallothionein gene expression. *Biochimie*, 88(11), 1787-1792
76. Haq, F., Mahoney, M., & Koropatnick, J. (2003). Signaling events for metallothionein induction. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 533(1-2), 211-226.
77. Nordberg, M., & Kojima, Y. (1979). Metallothionein and other low molecular weight metal-binding proteins. In *Metallothionein* (pp. 41-124). Birkhäuser, Basel.
78. Torra, M., To-Figueras, J., Brunet, M., Rodamilans, M., & Corbella, J. (1994). Total and metallothionein-bound cadmium in the liver and the kidney of a population in Barcelona (Spain). *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 53(4), 509-515.
79. Amaro, F., Turkewitz, A. P., Martín-González, A., & Gutiérrez, J. C. (2014). Functional GFP-metallothionein fusion protein from *Tetrahymena thermophila*: a potential whole-cell biosensor for monitoring heavy metal pollution and a cell model to study metallothionein overproduction effects. *Biometals*, 27(1), 195-205.
80. Williams, C. R., MacDonald, J. W., Bammler, T. K., Paulsen, M. H., Simpson, C. D., & Gallagher, E. P. (2016). From the cover: cadmium exposure differentially

- alters odorant-driven behaviors and expression of olfactory receptors in juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Toxicological Sciences*, 154(2), 267-277.
81. Hertika, A. M. S., Kusriani, K., Indrayani, E., Nurdiani, R., & Putra, R. B. (2018). Relationship between levels of the heavy metals lead, cadmium and mercury, and metallothionein in the gills and stomach of *Crassostrea iredalei* and *Crassostrea glomerata*. *F1000Research*, 7.
82. de Francisco, P., Melgar, L. M., Díaz, S., Martín-González, A., & Gutiérrez, J. C. (2016). The *Tetrahymena* metallothionein gene family: twenty-one new cDNAs, molecular characterization, phylogenetic study and comparative analysis of the gene expression under different abiotic stressors. *BMC genomics*, 17(1), 346.
83. Niederwanger, M., Dvorak, M., Schnegg, R., Pedrini-Martha, V., Bacher, K., Bidoli, M., & Dallinger, R. (2017). Challenging the metallothionein (MT) gene of *Biomphalaria glabrata*: unexpected response patterns due to cadmium exposure and temperature stress. *International journal of molecular sciences*, 18(8), 1747.
84. Tucker, S. L., Thornton, C. R., Tasker, K., Jacob, C., Giles, G., Egan, M., & Talbot, N. J. (2004). A fungal metallothionein is required for pathogenicity of *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell*, 16(6), 1575-1588.
85. Ragusa, M. A., Nicosia, A., Costa, S., Cuttitta, A., & Gianguzza, F. (2017). Metallothionein gene family in the sea urchin *Paracentrotus lividus*: Gene structure, differential expression and phylogenetic analysis. *International journal of molecular sciences*, 18(4), 812.