

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

**Evaluación de la actividad tricomonocida
de 3 compuestos orgánicos**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

P R E S E N T A:

YUSSEL FERNANDO PÉREZ NAVARRO

DIRECTORA

DRA. MARÍA ELIZBETH ÁLVAREZ SÁNCHEZ

**POSGRADO
EN CIENCIAS
GENÓMICAS**

Ciudad de México, septiembre de 2018.

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

INTEGRACIÓN DEL JURADO:

Presidente: Dr, Mauricio Castañón Arreola UACM
Secretario: Dra, María Elizabeth Álvarez Sánchez UACM.
Vocal: Dra, Lilia López Cánovas UACM

Lugar donde se realizó el posgrado:

PLANTEL DEL VALLE, UACM.

DIRECTOR DE TESIS:

Dra, María Elizabeth Álvarez Sánchez.
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

AGRADECIMIENTOS

A través de estas líneas quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que con su soporte científico y humano han colaborado en la elaboración de este trabajo de investigación.

Quiero agradecer en primer lugar a la Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM) por el apoyo académico y económico para la impresión de esta tesis.

Debo agradecer de manera especial y sincera a la Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez por aceptarme en su laboratorio para realizar esta tesis bajo su dirección. Su apoyo y confianza en mi trabajo ha sido un aporte invaluable.

Quiero extender un sincero agradecimiento a la Dra. Lilia López Cánovas, al Dr. Cesar López Camarillo y al Dr. Mauricio Castañón Arreola, por su paciencia y disponibilidad en la revisión de esta tesis.

Agradezco al Dr. Gumersindo Mirón López y a la Facultad de química de la Universidad Autónoma de Yucatán por permitirme el uso de los compuestos para la realización de este trabajo.

Quiero agradecer en particular a la Mtra. en Ciencias. Laura Isabel Vázquez Carrillo por haberme instruido en el laboratorio y todo su apoyo.

Para mis compañeros de generación, tengo sólo palabras de agradecimiento, ha sido un largo camino. Especialmente a Víctor, Bryan, Alejandra, Maribel y Gabriel.

Mi más profundo agradecimiento y sentido a mi familia. Sin su apoyo, compañía e inspiración habría sido imposible llevar a cabo esta dura investigación.

Gracias a mis padres por ser mis principales instructores, gracias a ellos por cada día confiar y creer en mí, gracias a mi madre por estar dispuesta a acompañarme cada día y noche, por sembrar en mi la educación y ganas de seguir adelante; gracias a mi padre por siempre desear y anhelar lo mejor para mi vida, gracias por cada consejo y por cada una de sus palabras.

Gracias a mi esposa Yarely, porque en todo momento fue un apoyo incondicional, la amo demasiado, y por la cual estoy dispuesto a enfrentar todo y en todo momento.

Gracias a mi bebe por ser la fuente de mi esfuerzo y todas las energías requeridas en este, gracias por ser el pequeño motor de mi vida, el motor que siempre esta encendido y dispuesto a darme fuerza cada día.

DEDICATORIAS

Dedico esta tesis a todos aquellos que creyeron en mí.

A Dios por la vida de mis padres, también porque cada día bendice mi vida con la hermosa oportunidad de estar y disfrutar al lado de las personas que me aman, y a las que yo amo.

Al amor recibido, la dedicación y la paciencia con la que cada día se preocupaban mis padres por mi avance y desarrollo de esta tesis, es simplemente único y se refleja en la vida de un hijo.

A mis tios, Juan Manuel y Gloria Isela, por su apoyo en todo sentido y su confianza puesta en mí.

A mi bebe por los momentos sacrificados en nuestra vida como familia, que requirió el cumplimiento de esta tesis, gracias por que algún día entenderás el significado del sacrificio, gracias por estar presente a mi lado.

A mi esposa, siendo la motivación en mi vida, fue el ingrediente perfecto para poder lograr este dichoso y muy merecido logro en la vida, el poder haber culminado esta tesis con éxito, y poder disfrutar del privilegio de ser agradecido, ser grato con esa persona que se preocupó por mí en cada momento.

Abreviaturas

A	Adenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADN c	Ácido desoxirribonucleico codificante
AP33	Adhesina de parasito 33
AP51	Adhesina de parasito 51
AP65	Adhesina de parasito 65
ARN	Ácido ribonucleico
CML	Concentración mínima letal
CP	Cisteín proteasa
DIF	Sistema Nacional para el Desarrollo Integral de la Familia
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Médium
DOC	Deoxicolato de sodio
EIA	Enzimo-inmunoanálisis
Fe	Hierro
GAPDH	Gliceraldehído- 3-fosfato deshidrogenasa
IFD	Inmunofluorescencia directa
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
ITS	Infección de Transmisión Sexual
KDa	Kilodaltones
LPG	Lipofosfoglicanos
Mtz	Metronidazol
NAAT	Amplificación de ácidos nucleicos
OMS	Organización Mundial de la Salud
Pb	Pares de bases
PBS	Solución salina tampón con fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFOR	Ferredoxina oxidorreductasa
r.p.m	revoluciones por minuto
SC	Suero de caballo
<i>T. hominis</i>	<i>Trichonomas hominis</i>
<i>T. tenax</i>	<i>Trichonomas tenax</i>
<i>T. vaginalis</i>	<i>Trichonomas vaginalis</i>
TvCP39	Cisteín proteasa de 39 Kda
TvCP65	Cisteín proteasa de 65 Kda
TYM	Tripticaseina extracto de levadura-maltosa
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
Zn⁺⁺	Zinc

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Epidemiología.....	1
1.2 Epidemiología en México	3
1.3 Biología de <i>Trichomonas vaginalis</i>	6
1.4 Ciclo biológico de <i>Trichomonas vaginalis</i>	7
1.5 Patogénesis de <i>Trichomonas vaginalis</i>	10
1.5.1 Citoadherencia	10
1.5.2 Citotoxicidad.....	12
1.5.2.1 TvCP39 y su implicación en la citotoxicidad de <i>Trichomonas vaginalis</i>	12
1.5.2.2 TvCP65 y su implicación en la citotoxicidad de <i>Trichomonas vaginalis</i>	13
1.5.2.3 Las metaloproteasas y su implicación en la citotoxicidad de <i>Trichomonas vaginalis</i>	13
1.5.3 Evasión de la respuesta inmune	15
1.6 Diagnóstico de <i>Trichomonas vaginalis</i>	16
1.7 Presentación clínica de la tricomoniasis.....	17
1.7.1 Tricomoniasis en mujeres	18
1.7.1.1 Tricomoniasis durante el embarazo	18
1.7.2 Tricomoniasis en hombres	18
1.8 Tratamiento contra <i>Trichomonas vaginalis</i>	19
1.9 El metronidazol contra la tricomoniasis.....	19
1.9.1 Efectos secundarios del metronidazol.....	21
1.9.1.1 Resistencia al metronidazol.	21

1.9.1.2 Resistencia aeróbica al metronidazol.....	22
1.9.1.3 Resistencia anaeróbica al metronidazol.....	22
1.10 Las antraquinonas: una nueva alternativa contra la infección por <i>Trichomonas vaginalis</i>	22
1.11 Prevención de la infección por <i>Trichomonas vaginalis</i>	23
II. JUSTIFICACIÓN	25
III. HIPÓTESIS	26
IV. OBJETIVOS	27
V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	28
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	29
6.1 Cultivo de <i>Trichomonas vaginalis</i> MICH01.....	29
6.1.1 Tratamiento con los compuestos orgánicos en <i>T. vaginalis</i> MICH01	29
6.2 Cultivo de la línea celular HeLa de cáncer de cervix.....	30
6.2.1 Condiciones de cultivo de la línea celular HeLa	30
6.2.2 Descongelamiento de las líneas celulares	30
6.3 Ensayos de actividad proteolítica	31
6.3.1 Lisis de parásitos.....	31
6.3.2 Ensayo de proteasas.....	31
6.4 Ensayo de unión celular para proteasas	31
6.4.1 Fijación de células HeLa	31
6.4.2 Ensayo de ligandos	32
6.5 Ensayo de Citotoxicidad.....	33
6.6 Análisis de la expresión de los transcritos de tvcp65, tvcp39 y tvMP50 de <i>Trichomonas vaginalis</i>	34
6.6.1 Extracción de ARN total mediante la técnica de Trizol	34

6.6.2 Síntesis de cDNA	34
6.6.3 Amplificación por PCR de <i>tvcp65</i> , <i>tvcp39</i> y <i>mp50</i> de <i>Trichomonas vaginalis</i> ..	35
6.6.3.1 Amplificación por PCR de <i>tvcp65</i> de <i>Trichomonas vaginalis</i>	35
6.6.3.2 Amplificación por PCR de <i>tvcp39</i> de <i>Trichomonas vaginalis</i>	36
6.6.3.3 Amplificación por PCR de <i>mp50</i> de <i>Trichomonas vaginalis</i>	36
6.6.3.4 Amplificación por PCR de β - <i>tubulina</i> de <i>Trichomonas vaginalis</i>	37
6.7 Análisis estadísticos	38
VII. RESULTADOS	39
Los compuestos orgánicos utilizados fueron A7.11.11, A7.11.9 y A7.4.5+SPE-2 derivados de las antraquinonas.	39
7.1 El tratamiento con los compuestos A7.11.11, A7.11.9 y A7.4.5+SPE-2 reducen la tasas de crecimiento de <i>Trichomonas vaginalis</i>	39
7.2 El tratamiento con los compuestos A7.11.11, A7.11.9 y A7.4.5+SPE-2 afectan la actividad proteolítica de CP65, CP39 y mp50.	39
7.3 Influencia de las concentraciones de tratamiento con los compuestos A7.11.11, A7.11.9 y A4.4.5+SPE-2 en la citotoxicidad de <i>Trichomonas vaginalis</i> sobre monocapas de células HeLa	60
7.4 Las concentraciones 5 y 10 μ g/mL de los tratamientos con los compuestos A7.11.11, A7.11.9 y A4.4.5+SPE-2 reducen la expresión de <i>tvcp39</i> , <i>tvcp65</i> y <i>mp50</i>	63
VIII. DISCUSIÓN	66
IX. CONCLUSIONES	70
X. REFERENCIAS	71
XI. ANEXOS	77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Incidencia y prevalencia de la infección por <i>Trichomonas vaginalis</i> en mujeres y hombres entre 15 y 49 años en diferentes regiones del mundo en 2008. ...	2
Tabla 2. Casos nuevos de Tricomoniasis en México en el 2003.....	4
Tabla 3. Casos nuevos de Tricomoniasis en México en el 2017.....	5
Tabla 4. Proteínas involucradas en la patogenicidad de T. vaginalis.....	14
Tabla 5. Porcentaje de viabilidad de T. vaginalis después del tratamiento con los tres diferentes compuestos orgánicos.....	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Dibujo esquemático de <i>Trichomonas vaginalis</i>	8
Figura 2. Ciclo biológico de <i>T. vaginalis</i>	9
Figura 3. Cambio morfológico de <i>T. vaginalis</i>	11
Figura 4. Mecanismos de acción de los nitroimidazoles.	20
Figura 5. Estrategia Experimental.....	28
Figura 6. Efecto del tratamiento con el compuesto A7.11.11 sobre la actividad proteolítica de CP65 y CP39.....	44
Figura 7. Efecto del tratamiento con el compuesto A7.11.9 sobre la actividad proteolítica de CP65 y CP39.....	46
Figura 8. Efecto del tratamiento con el compuesto A7.4.5+SPE-2 sobre la actividad proteolítica de CP65 y CP39.....	48
Figura 9. Efecto del tratamiento con los tres compuestos sobre la actividad proteolítica de mp50.....	50
Figura 10. Efecto del tratamiento con el compuesto A7.11.11 sobre la actividad proteolítica de CP65 y CP39.....	53
Figura 11. Efecto del tratamiento con el compuesto A7.11.9 sobre la actividad proteolítica de CP65 y CP39.....	55
Figura 12. Efecto del tratamiento con el compuesto A7.11.11 A7.4.5+SPE-2 sobre la actividad proteolítica de CP65 y CP39.....	57
Figura 13. Efecto del tratamiento con los tres compuestos sobre la actividad proteolítica de mp50.....	59
Figura 14. Efecto del tratamiento con los compuestos A7.11.11, A7.11.9 y A4.4.5+SPE-2 en las células HeLa.	61
Figura 15. Efecto del tratamiento con los compuestos A7.11.11, A7.11.9 y A4.4.5+SPE-2 en los niveles de citotoxicidad de <i>T. vaginalis</i> aislado MICH01.....	62
Figura 16. Cambios en la expresión de tvcp39, tvcp65 y mp50 después del tratamiento con los compuestos A7.11.11, A7.11.9 y A7.4.5+SPE-2.....	65

RESUMEN

La tricomoniasis es la Infección de transmisión sexual (ITS) no viral más extendida en el mundo. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) se reportaron más de 270 millones de casos en el 2008, más que la combinación de los casos causados por clamidia y gonorrea. Los medicamentos con 5-nitroimidazol son los más usados para combatir esta infección, siendo el metronidazol el medicamento por elección. Sin embargo, la resistencia al metronidazol se ha incrementado. El uso de las plantas medicinales para tratar enfermedades parasitarias ha ido en aumento, existen diversos estudios sobre el uso de plantas medicinales para la eliminación de *T. vaginalis*. Por otro lado, varias cisteín proteasas (CP) participan en la virulencia de *Trichomonas vaginalis*. Unas de ellas son las CP's de CP65 y CP39, involucrada en la citotoxicidad. El objetivo de este trabajo fue investigar el efecto de los compuestos orgánicos sobre la citotoxicidad de *Trichomonas vaginalis* dependiente de CP65 y CP39 usando parásitos cultivados bajo distintas concentraciones de los compuestos orgánicos A7.11.11, A7.11.9 y A7.4.5+SPE-2. Se realizaron zimogramas de proteasas y de unión celular. En las concentraciones de 5, 10 y 20 µg/mL con los compuestos orgánicos A7.11.9 y A7.4.5+SPE-2, los parásitos disminuyeron la actividad proteolítica de CP65 y CP39 en comparación de los parásitos tratados con metronidazol y sin tratar. Los ensayos de citotoxicidad también mostraron que los 40 min hay una disminución de la citotoxicidad con los parásitos tratados los compuestos orgánicos A7.11.9 y A7.4.5+SPE-2 a concentraciones de 5 y 10 µg/mL comparado con los parásitos sin tratar y tratados con metronidazol. Finalmente, los experimentos de RT-PCR también mostraron disminución de la expresión a nivel de transcrito de *tvcp65* y *tvcp39* en tricomonas tratadas con los compuestos orgánicos A7.11.9 y A7.4.5+SPE-2 a concentraciones de 5 y 10 µg/mL, en comparación con parásitos sin tratar y tratados con metronidazol. En conclusión, nuestros datos muestran que los compuestos orgánicos A7.11.9 y A7.4.5+SPE-2 a concentraciones de 5 y 10 µg/mL regulan negativamente la actividad proteolítica y la expresión de CP65 y CP39, afectando la citotoxicidad de *Trichomonas vaginalis*, por lo que, los compuestos A7.11.9 y A7.4.5+SPE-2 podrían sugerirse como un potencial candidato para el desarrollo de fármacos contra *T. vaginalis*.

ABSTRACT

Trichomonas vaginalis infects the urogenital tract of humans causing trichomoniasis, a sexually transmitted infection, 5-nitroimidazole are the most used to combat this infection, actually had reported resistance to metronidazole so that the use of medicinal plants in an alternative. Several cysteine proteinases (CPs) participate in the virulence of *Trichomonas vaginalis*. As the cysteine's proteinases CP65, CP39 and metalloproteinase TvMP50 involved in the cytotoxicity of the parasite to the target cell. The aim of this work was to investigate the effect anti-trichomonal of three different organic compounds (A7.11.11, A7.11.9 y A7.4.5+SPE-2) using parasites grown under distinct concentrations. Cytotoxicity and cell-binding assays, and zymograms were performed. At concentrations of 5, 10 and 20 µg/mL of organic compounds A7.11.9 and A7.4.5+SPE-2, parasites exhibited the lowest levels of cytotoxicity and less CP65, CP39 and MP50 proteolytic activity. RT-PCR experiments also showed reduction in the amount of transcript of *tvcp65*, *tvcp39* and *tvmp50* in trichomonas grown under treatment with the three organic compounds (A7.11.11, A7.11.9 y A7.4.5+SPE-2), as compared with parasites grown in DMSO and metronidazole. In conclusion, our data show that treatment with the organic compounds A7.11.9 and A7.4.5+SPE-2 down-regulates proteolytic activity and transcription of CP65, CP39 and MP50, negatively affecting trichomonal cytotoxicity in vitro. These organic compounds in the future could be used for the treatment of trichomoniasis.

I. INTRODUCCIÓN

El parásito protozoario *Trichomonas vaginalis* es responsable de la tricomoniasis. Fue descrito por primera vez por Alfred Donné en 1836 y su nombre es debido a la similitud con los “Tricodes” y las “Monas”. Sin embargo, hasta 1838, Ehrenberg demostró que la vagina humana es su hábitat normal y por esta razón le da el nombre actual a esta especie parasitaria (Harp y cols., 2011). Tres especies de tricomonas pueden estar presentes en el ser humano: *T. vaginalis*, *T. tenax*, parásito comensal propio de la cavidad bucal, y *T. hominis*, característico del tubo digestivo, sin ser claramente patógena (Field y cols., 2016).

1.1 Epidemiología

La tricomoniasis es la Infección de transmisión sexual (ITS) no viral más extendida en el mundo (Sutcliffe y cols., 2012). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) se reportaron más de 270 millones de casos en el 2008, más que la combinación de los casos causados por clamidia y gonorrea (WHO., 2008; Field y cols., 2016). Sin embargo, este dato puede no corresponder con la incidencia real, ya que la enfermedad no es de reporte obligatorio y sin programas de vigilancia establecidos, la epidemiología de esta infección no se conoce por completo. Sin embargo, se sabe que su frecuencia varía mucho según la población y la geografía (Sutcliffe y cols., 2012; Kissinger., 2015).

La prevalencia e incidencia de la infección vaginal por *T. vaginalis* son más altas en regiones de África y América que en otras partes del mundo (Tabla 1) (Field y cols., 2016; WHO., 2012). Los estudios poblacionales en África muestran tasas claramente mayores. En Zimbabwe la prevalencia es del 9,5% entre ambos sexos utilizando pruebas de anticuerpos (Gregson y cols., 2001). Usando la prueba de amplificación de ácidos nucleicos por PCR, la tasa de positividad entre los hombres en Tanzania fue del 11% (Klinger y cols., 2006). Las mujeres de Papau Nueva Guinea también presentaron una prevalencia alta de *T. vaginalis*, 21% en mujeres embarazadas y 42,6% en la población general (Kissinger., 2015). En general, los africanos o personas

Tabla 1. Incidencia y prevalencia de la infección por *T. vaginalis* en mujeres y hombres entre 15 y 49 años en diferentes regiones del mundo en 2008.

Región	Incidencia		Prevalencia	
	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres
	Por 1,000	Por 1,000	%	%
África	146	164	20	2
América	177	180	22	2.2
Sureste de Asia	40	50	5.6	0.6
Europa	51	48	5.8	0.6
Mediterráneo oriental	64	66	8.0	0.8

Los datos fueron obtenidos a partir de la Organización mundial de la Salud (OMS, 2012).

de ascendencia africana tienen mayores tasas de infección vaginal por *T. vaginalis*, como lo demuestran los estudios en África Subsahariana (Gregson y cols., 2001), en personas de ascendencia africana como Garifunas y los afroamericanos en los Estados Unidos (Kissinger., 2015). En los Estados Unidos, la prevalencia más alta de infección por *T. vaginalis* en mujeres afroamericanas oscilan entre 13-51% (Miller y cols., 2005). Las mujeres afroamericanas tienen tasas que son diez veces más altas que las mujeres blancas.

Diferentes estudios realizados en Dinamarca, Gran Bretaña y Francia muestran que la prevalencia está disminuyendo en las naciones industrializadas (Pereyre y cols., 2016). Los estudios iraníes determinaron que la prevalencia de tricomoniasis es del 2 al 8%. Sin embargo, en función de factores culturales y sociales, esta tasa se subestima y podría ser superior al 30% (Bouchemal y cols., 2017).

1.2 Epidemiología en México

En México de acuerdo con la "Información Epidemiológica de Morbilidad Anuario 2011-Versión Ejecutiva", emitida por la Secretaría de Salud y la Dirección General de Epidemiología en 2012, la tricomoniasis urogenital ocupó el 12o. lugar entre las "Veinte principales causas de enfermedades transmisibles", con 113,843 casos notificados, equivalentes a una incidencia de 104.23 casos por 100,000 habitantes (Ojeda y cols., 2004).

La incidencia poblacional fue de 38.46 por 100,000 habitantes; sin embargo, la incidencia en mujeres fue de 74.34 contra sólo 2.19 en los varones: 34 mujeres por cada hombre. En la República Mexicana la tricomoniasis se ha mantenido endémicamente con tendencia anual de incremento: la tasa de incidencia por 100,000 habitantes varió de 118.08 en 1994 a 183.42 en el 2003. Geográficamente, la tricomoniasis ha sido más prevalente en el Estado de Puebla (98.80), Zacatecas (96.80), Veracruz (85.72), además de Zacatecas, Oaxaca, Durango, Nayarit, Morelos, Tamaulipas; mientras que los estados de Querétaro y el Distrito Federal; resultaron ser los menos frecuentes (Tabla 2) (Carrada, 2006; Uribarren, 2017).

Tabla 2. Casos nuevos de Tricomoniasis en México en el 2003

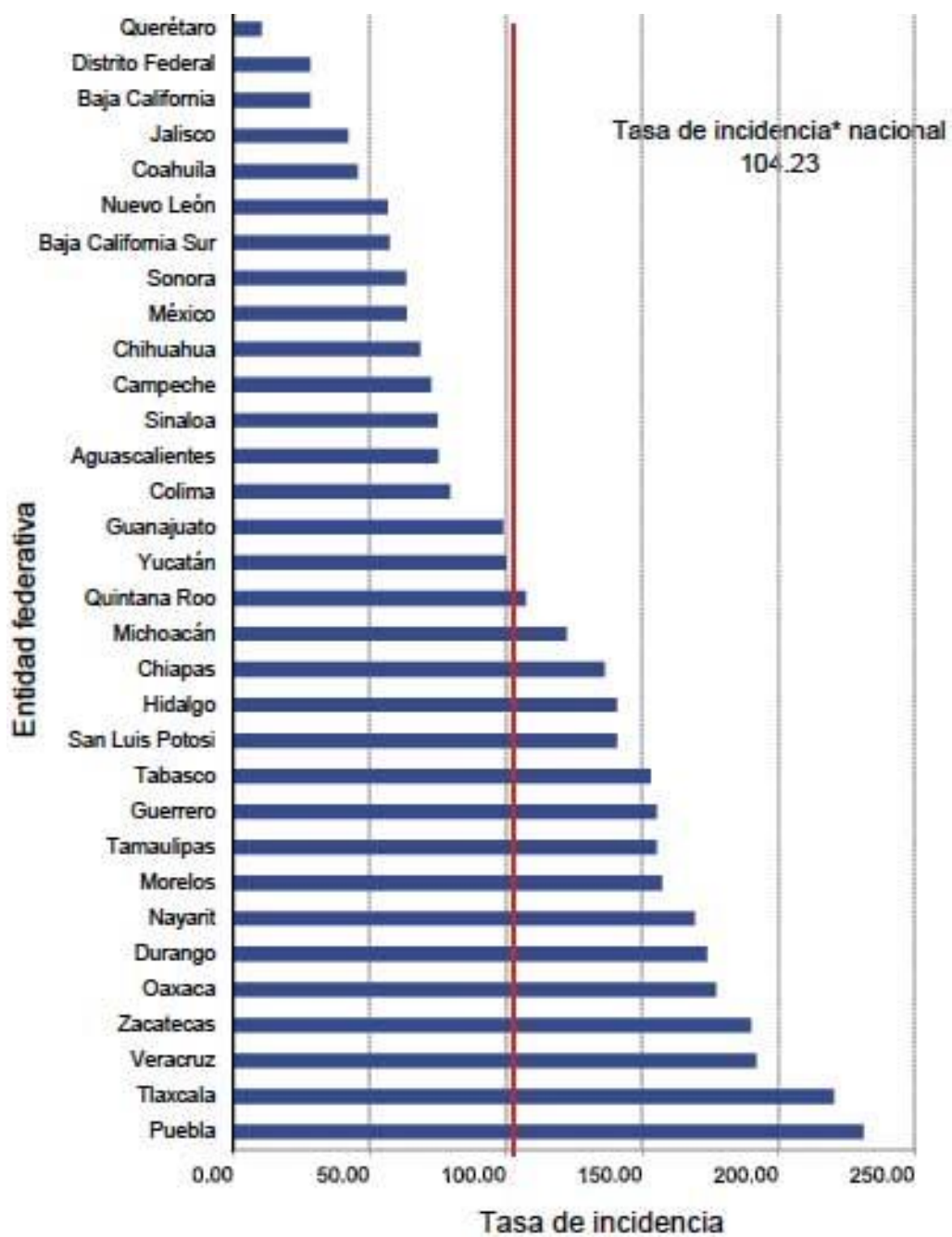


Tabla 3. Casos nuevos de Tricomoniasis en México en el 2017

Estado	M	F	TOTAL
Aguascalientes	1	161	162
Baja California Sur	11	119	130
Campeche	9	192	201
Chiapas	118	3140	3258
Ciudad de México	27	354	381
México	106	3428	3534
Oaxaca	73	2149	2222
Puebla	314	5139	5453
Querétaro	3	45	48
Veracruz	189	7051	7240
Zacatecas	67	1291	1358

FUENTE: SUIVE/DGE/Secretaría de Salud/Estados Unidos Mexicanos 2017

En el año 2017 se reportaron 47, 004 casos, de los cuales los estados de la república más afectados fueron Veracruz con 7240 y Puebla con 5453 casos (Tabla 3) (SUIVE/DGE/Secretaría de Salud/Estados Unidos Mexicanos 2017). El análisis por grupos de edad en el Estado de Puebla demostró la siguiente incidencia: mujeres de 20 a 24 años 681.0, de 25 a 44 años 622.0 y de 45 a 49 años 615.0, es decir, la enfermedad fue la más prevalente en el grupo de mayor actividad sexual, aunque se han descrito casos en neonatos y adolescentes, ya que la tricomoniasis también puede ser transmitida a neonatos por el canal vaginal a la hora del parto. Alrededor de un 2-5% de los productos femeninos nacidos de madres infectadas desarrollan vaginitis, también pueden presentarse manifestaciones respiratorias. Cabe señalar que, en el año de 2011, se reportaron en la República Mexicana 94 casos de tricomoniasis en menores de un año de edad (Figuroa y cols., 2012; Glehn y cols., 2017; Ondrak, 2016).

1.3 Biología de *Trichomonas vaginalis*

Dentro del género *Trichomonas*, la especie *vaginalis* ha sido la más estudiada. Este patógeno urogenital que varía en talla y en forma, mide alrededor de 10 micras de largo por 7 de ancho. Su apariencia varía de acuerdo a las condiciones físico-químicas del medio donde se encuentre. En cultivos axénicos adopta una forma ovalada, y tiende a ser más uniforme que cuando se adhiere a las células epiteliales vaginales, donde adquiere una forma ameboide (Figuroa-Angulo y cols., 2012; Pereira y cols., 2003). *T. vaginalis* posee 5 flagelos; cuatro de ellos libres de aproximadamente 7 a 18 μm ubicados en su extremo anterior derivados, de un complejo cinetosomal, nacen en el blefaroplasto, encima del núcleo, y recorren el canal periflagelar que está rodeado por la pelta, una red de microtúbulos que recubre parcialmente las estructuras basales de los cuatro flagelos; y un quinto flagelo que recorre todo el borde externo de una expansión protoplasmática llamada membrana ondulante que ocupa los dos tercios anteriores del parásito y se asocia a una estructura denominada costa, cuya función es dar resistencia a la estructura del parásito. La principal función de estos flagelos es el desplazamiento del parásito mediante movimientos de rotación y traslación (Figura 1). En condiciones ambientales desfavorables el parásito puede internalizar los

flagelos adoptando una forma semirredondeada a la cual algunos han denominado pseudoquistes (Bouchemal y cols., 2017).

El citoesqueleto está compuesto por tubulinas y fibras de actina. Posee un núcleo redondeado u ovalado, con 6 cromosomas, localizado en la porción anterior del trofozoito, con cromatina granular uniformemente distribuida y cariosoma subcentral. A partir del núcleo sale una estructura análoga a una columna vertebral llamada axóstilo, que se extiende en forma longitudinal por todo el parásito y que le proporciona rigidez anatómica al protozoario. El citoplasma incluye gránulos que tienen importantes funciones metabólicas como son las vacuolas digestivas y los hidrogenosomas (análogos de las mitocondrias), denominados así por su relación con la producción de hidrógeno molecular mediante la fermentación de carbohidratos (Figura 1) (Hrdy y cols., 2004).

1.4 Ciclo biológico de *Trichomonas vaginalis*

T. vaginalis carece de muchas vías metabólicas, por lo que es un parásito obligado y es el agente causante de la infección en la vagina humana, próstata y uretra. El ser humano es el único hospero natural conocido (Harp y cols., 2011). *T. vaginalis* es un parásito obligado que fagocita bacterias, células epiteliales vaginales, virus y eritrocitos. *T. vaginalis* usa carbohidratos como fuente principal de energía a través del metabolismo fermentativo en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. El tiempo de incubación es generalmente entre 4 y 28 días (Kissinger y cols., 2015)

T. vaginalis sólo existe en forma de trofozoito. En condiciones óptimas se multiplica de forma asexual por fisión binaria longitudinal dando lugar a dos nuevos trofozoitos (Figura 2). La forma más común de transmisión es de persona a persona, a través del contacto sexual. Fuera del huésped, el parásito puede sobrevivir durante 6-24 h en la orina, el semen y el agua de la piscina, pero solo hasta 30 minutos cuando se expone al aire. *T. vaginalis* puede crecer en un amplio rango de pH con un nivel óptimo entre pH 6 y 6.3 (Mielczarek y cols., 2016).

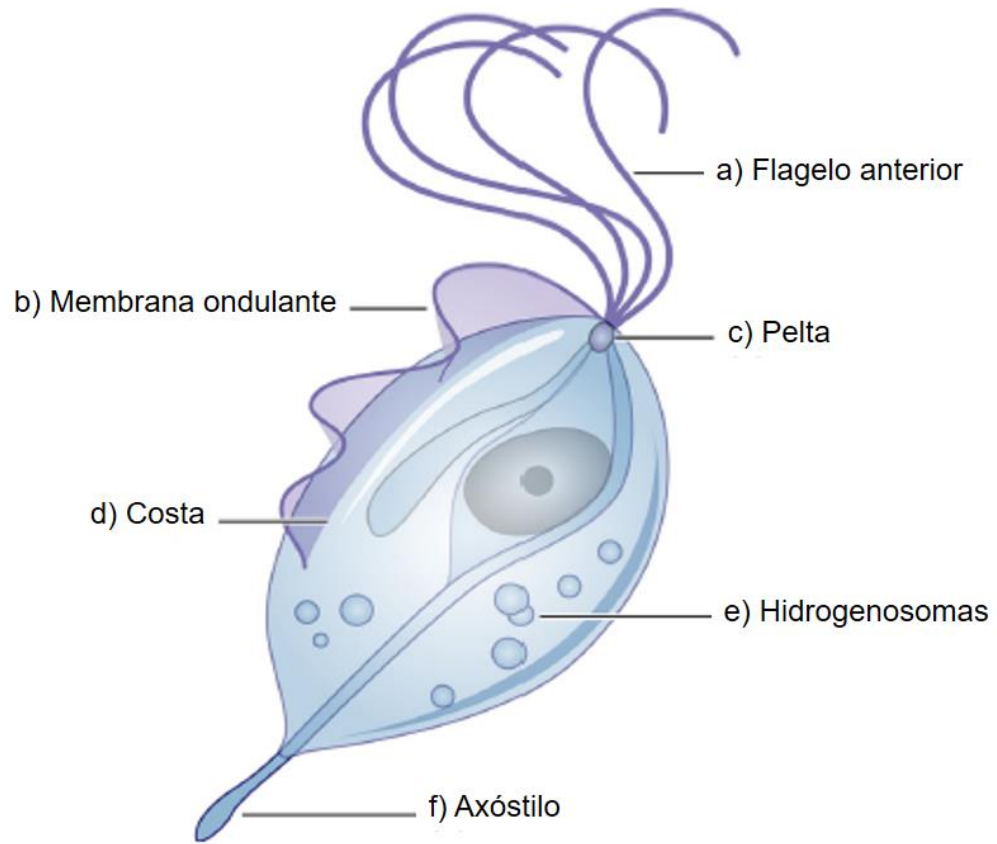


Figura 1. Dibujo esquemático de *Trichomonas vaginalis*. Tomado y modificado de Bouchemal y cols., 2017.

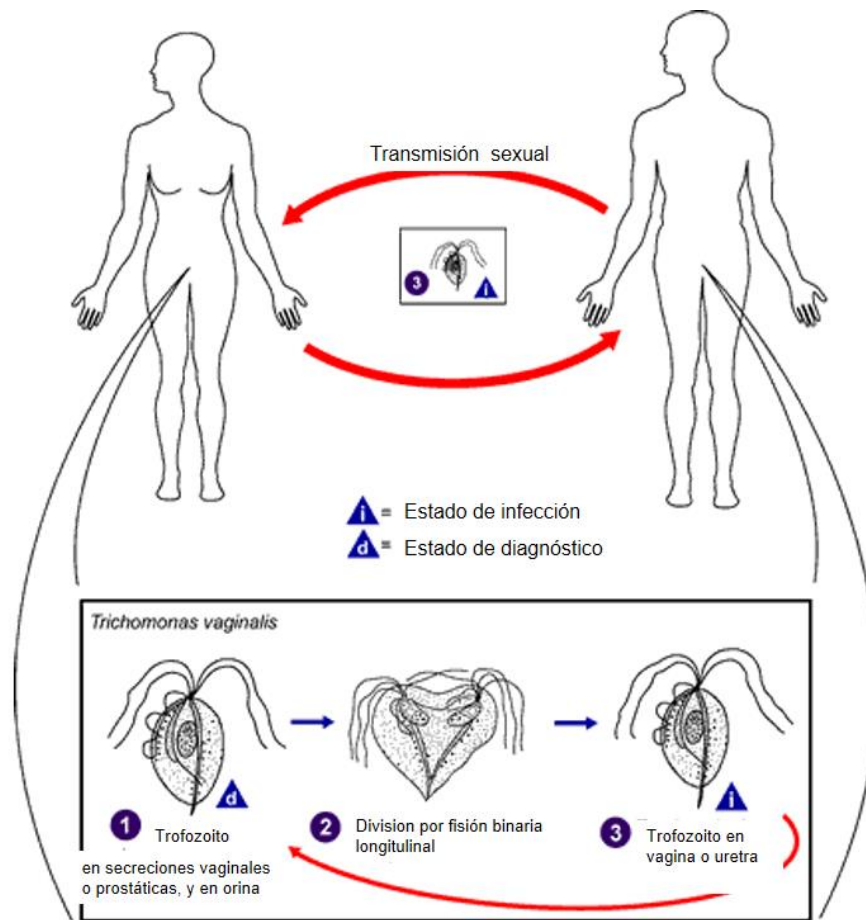


Figura 2. Ciclo biológico de *T. vaginalis*. La transmisión es de persona a persona, a través del contacto sexual. En condiciones óptimas se multiplica de forma asexual por fisión binaria longitudinal dando lugar a dos nuevos trofozoitos. Tomado de CDC (Centers for Disease Control and Prevention)

1.5 Patogénesis de *Trichomonas vaginalis*

T. vaginalis (cepa G3) tiene un genoma de 176,441,227 pb ó 170 Mb, posee alrededor de 60,000 genes organizados en seis cromosomas (Carlton y cols., 2007). Hasta ahora se han identificado 411 proteínas, muchas de las cuales se sabe que son proteínas de membrana con posibles funciones en la patogénesis de *T. vaginalis* o que pueden ayudar a que el parásito se adapte y sobreviva en diversos ambientes (Mielczarek y cols., 2016).

La infección por *T. vaginalis* es muy compleja, posee diferentes propiedades de virulencia como son: la citoadherencia, actividad hemolítica, citotoxicidad, fagocitosis, inducción de apoptosis y evasión del sistema inmune del huésped (Mielczarek y cols., 2016; Menezes y cols., 2016; Figueroa-Angulo y cols., 2012).

1.5.1 Citoadherencia

La citoadherencia es el primer paso para establecer la infección, consiste en degradar la mucosa vaginal para posteriormente adherirse a las células epiteliales cervicales y vaginales (Oliveira y cols., 2016). Al contacto con las células epiteliales cervicales y vaginales el parásito sufre un cambio morfológico adquiriendo una forma ameboide (Figura 3) (Figueroa-Angulo y cols., 2012). Se han identificado varias adhesinas de superficie como mediadoras de la citoadherencia (Oliveira y cols., 2016). Particularmente se han descrito cinco adhesinas: AP120, AP65, AP51, AP33, AP23 (Tabla 4). Los genes que codifican estas proteínas, excepto AP51, se encuentran sobre-expresados en presencia de hierro, que es un mediador esencial para el crecimiento de *T. vaginalis*, y un factor clave en la patogenicidad (Edwards y cols., 2016). Otro grupo importante de proteínas altamente presentes en *T. vaginalis* son las cisteín proteasas (CP's). Se han identificado alrededor de 23 CP's con un peso molecular que varía de 23 a 110 kDa, algunas de ellas localizadas en la superficie de *T. vaginalis*, como TvCP30 y TvCP62 que participan en la citoadherencia del parásito (Tabla 4), uniéndose a la superficie de las células de adenocarcinoma cervical (HeLa) (Menezes y cols., 2016; Arroyo y cols., 2015; Hernández y cols., 2014; Moreno-Brito y cols. 2005).

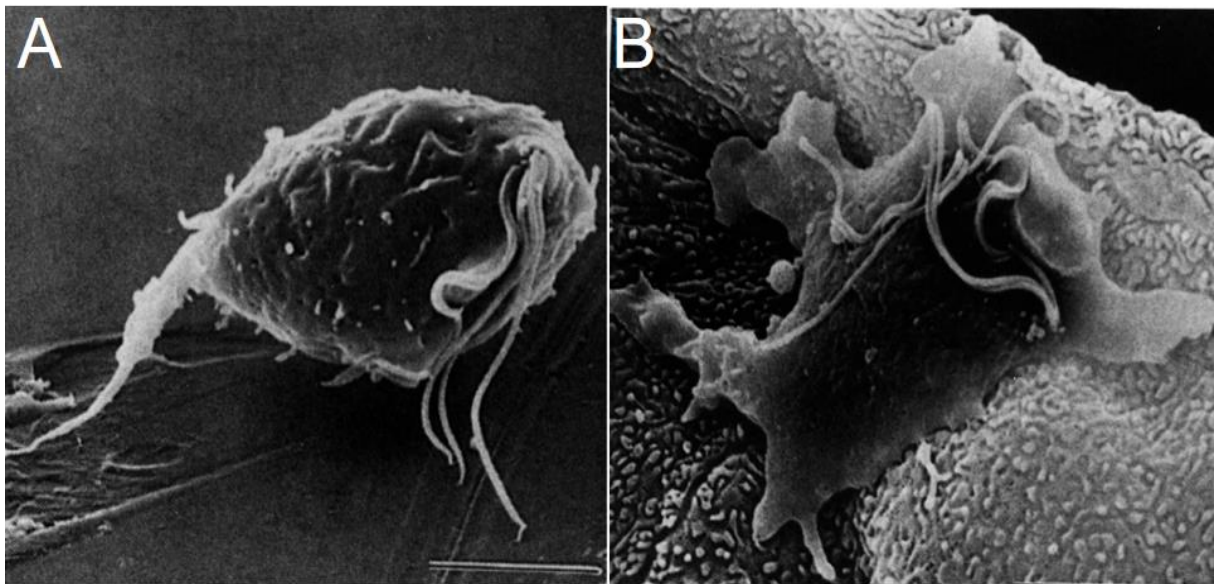


Figura 3. Cambio morfológico de *T. vaginalis*. (A) *T. vaginalis* en cultivo. El axóstilo, la membrana ondulante y los flagelos son claramente visibles. (B) Morfología ameboide de *T. vaginalis* al adherirse a las células epiteliales vaginales. Tomado y modificado de Petrin y cols., 1998

Se ha reportado que TvCP30 también se encuentra en las secreciones vaginales de pacientes con tricomoniasis (Menezes y cols., 2016). Además de las CP's, los lipofosfoglicanos (LPG) también son responsables de la citoadherencia del parásito, estos lípidos se encuentran altamente expresada en la superficie de *T. vaginalis* uniéndose a la proteína galectin-1 ubicada en la superficie de las células epiteliales humanas (Edwards y cols., 2016; Ryan y cols., 2011). Estudios recientes han demostrado que mutantes de lipofosfoglicanos en *T. vaginalis* reducen la citoadherencia en líneas celulares de células epiteliales vaginales, subrayando la importancia de esta molécula para la unión del parásito y su patogenicidad (Edwards y cols., 2016). El gliceraldehído- 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), es otra proteína expresado en la superficie de *T. vaginalis* que participa en la citoadherencia (Lama y cols., 2009).

1.5.2 Citotoxicidad

Una vez adherido el parasito a las células epiteliales vaginales, se genera un efecto citotóxico, desencadenando múltiples procesos dependientes del contacto. *T. vaginalis* produce varias moléculas citotóxicas y media la citotoxicidad al dañar la membrana plasmática de las células epiteliales vaginales. Este mecanismo requiere múltiples moléculas implicadas en el daño celular, como las CP's (CP39 y CP65) ubicadas en la superficie de *T. vaginalis* (Tabla 4) (Figuroa-Angulo y cols., 2012).

1.5.2.1 TvCP39 y su implicación en la citotoxicidad de *Trichomonas vaginalis*

TvCP39 es una cisteín proteasa de tipo-papaína, de ~39 kDa (Arroyo y cols., 2015). TvCP39 se localizada en la superficie de *T. vaginalis* uniéndose a las células epiteliales vaginales y células HeLa, tiene actividad proteolítica a 37 °C en un amplio rango de pH, similar a las condiciones encontradas durante la infección en mujeres y hombres (Ramón-Luing y cols., 2011). TvCP39 degrada varias proteínas de la matriz extracelular como fibronectina, distintos tipos de colágeno, la inmunoglobulina G (IgG) y A (IgA) y la hemoglobina. TvCP39 es inmunogénica y se puede encontrar en

secreciones de pacientes con tricomoniasis (Ramón-Luing y cols., 2011). Requiere de poliaminas para su expresión, y su expresión se encuentra regulada negativamente por la presencia de hierro (Fe^{++}) y zinc (Zn^{++}) (Figueroa-Angulo y cols., 2012; Hernández-Gutiérrez y cols., 2003). Estudios sugieren que TvCP39 se expresa, es secreta e interviene en el daño tisular durante la infección (Ramón-Luing y cols., 2011; Hernández-Gutiérrez y cols., 2004).

1.5.2.2 TvCP65 y su implicación en la citotoxicidad de *Trichomonas vaginalis*

TvCP65 es una cisteín proteasa de 65 kDa, perteneciente a familia C1 (tipo L-catepsina), localizada en la superficie de *T.vaginalis*, se une a las células epiteliales vaginales y células HeLa, se activa en los rangos de pH y temperatura detectados en la vagina infectada (Arroyo y cols., 2015; Alvarez-Sánchez y cols., 2000). Estudios *in-vitro* han demostrado que TvCP65 degrada proteínas de la matriz extracelular que se encuentran en la vagina tales como colágeno IV y fibronectina (Alvarez-Sánchez y cols., 2007; Alvarez-Sánchez y cols., 2000). Requieren de poliaminas para su expresión, la cual es regulada negativamente por la presencia de hierro y zinc, reduciendo en gran medida la citotoxicidad (Figueroa-Angulo y cols., 2012, Alvarez-Sánchez y cols., 2008, Alvarez-Sánchez y cols., 2007). Además, TvCP65 estimula la respuesta inmune humoral en pacientes con tricomoniasis (Alvarez-Sánchez y cols., 2007).

1.5.2.3 Las metaloproteasas y su implicación en la citotoxicidad de *Trichomonas vaginalis*

Recientemente se ha demostrado que las metaloproteasas (MP) también están implicadas en la citotoxicidad de *T. vaginalis*. Las MP's pertenecen a la familia M24 de la subfamilia B, tienen tres residuos de histidina que se requieren para coordinar al Zn^{2+} dentro del sitio catalítico para la proteólisis del sustrato (Quintas-Granados y cols, 2013). Este parásito también expresa una metaloproteinasa de tipo GP63, TvGP63, que se localiza en la membrana del parásito y participa en la citotoxicidad de

Tabla 4. Proteínas involucradas en la patogenicidad de *Trichomonas vaginalis*.

Proteína	Propiedades	Patogénesis	Regulación ^a				Nivel de regulación
			Hierro	Contacto	PA	Zinc	
AP23	Adhesina	Citoadherencia	+	ND	ND	+	Transcripcional
AP33	Adhesina sub- α de succinil Co A sintetasa	Citoadherencia	+	+	ND	+	Transcripcional Traduccional
AP51	Adhesina sub- β de succinil Co A sintetasa	Citoadherencia	+	+	ND	+	Transcripcional Traduccional
AP65	Adhesina Enzima málica	Citoadherencia	+	+	ND	+	Transcripcional ^{a, b} Traduccional
AP120	Adhesina piruvato: ferredoxina oxidorreductasa	Citoadherencia	+	ND	ND	ND	Transcripcional Post-traduccional ^c
TvCP30	CP superficie	Citoadherencia	-	ND	ND	ND	ND
TvCP39	CP superficie	Citotoxicidad Degradación Igs	-	ND	+	-	Post-transcripcional ^{a, d} Post-traduccional ^c
TvCP62	CP secretada	Citoadherencia	ND	ND	ND	ND	ND
TvCP65	CP superficie	Citotoxicidad	-	ND	+	-	Post-transcripcional ^d
TvGAPDH	Gliceraldehído- 3- fosfato deshidrogenasa	Citoadherencia	+	ND	ND	ND	Transcripcional
TvLPG	Lipofosfoglicanos	Citoadherencia Citotoxicidad	ND	ND	ND	ND	Post-traduccional ^c

^a Regulación por factores ambientales tales como hierro, contacto celular (contacto), poliaminas (PA) y zinc.

^b Promotor sensible al hierro.

^c Glicosilación

^d Regulación mediada por la interacción loop del RNA – proteína eIF5A.

ND: No determinado, (+) sobre-expresión, (-) represión.

T. vaginalis sobre las monocapas de células HeLa (Quan y cols, 2014). Recientemente, se ha encontrado que TvMP50 es una MP inmunogénica que podría estar presente y activa en presencia de Zn⁺⁺ (Puente-Rivera y cols, 2017).

1.5.2 Fagocitosis

Se ha demostrado que *T. vaginalis* es capaz de ingerir y degradar eficazmente lactobacilos, levaduras, células epiteliales vaginales y cervicales, leucocitos, eritrocitos, células prostáticas y espermatozoides (Mielczarek y cols., 2016) Aunque el mecanismo de la fagocitosis no está completamente claro, se han observado al menos dos vías diferentes: a) la vía utilizada por los fagocitos profesionales en la que los pseudópodos se extienden hacia la célula blanco; y b) un proceso tipo “hundimiento”, sin ninguna participación aparente de las extensiones de la membrana plasmática. Se ha sugerido que diferentes proteínas están involucradas en estos procesos (Mielczarek y cols., 2016; Figueroa-Angulo y cols., 2012)

1.5.3 Evasión de la respuesta inmune

La capacidad del parásito para evadir el sistema inmune del huésped es un aspecto importante de la patogénesis (Hernández y cols., 2014). Numerosas CP's de superficie contribuyen a la evasión del sistema inmune por *T. vaginalis*. Por ejemplo, la CP de 60 kDa de *T. vaginalis* desempeña un papel doble para la supervivencia del parásito mediante la degradación de inmunoglobulinas y el suministro de nutrientes por la degradación de la hemoglobina (Figueroa-Angulo y cols., 2012). Además, TvCP39 también degrada las inmunoglobulinas IgA, IgG e IgM (Ramón-Luing y cols., 2011). En ausencia de anticuerpos específicos, el sistema del complemento en la sangre menstrual humana mata al parásito. La resistencia al complemento en condiciones ricas en hierro contribuye a la patogénesis microbiana. Una CP sobre-expresada por la presencia de hierro degrada a C3b, responsable de este mecanismo (Figueroa-Angulo y cols., 2012).

Otro mecanismo que adquiere *T. vaginalis* para evadir el sistema inmune del huésped, es a través del mimetismo molecular. *T. vaginalis* posee en su membrana moléculas

homólogas a las proteínas del huésped, como varias de las adhesinas del parásito (AP65, AP51 y AP33) que son homólogas a las enzimas metabólicas del huésped (enzima málica y succinil-CoA sintetasa subunidades α y β , respectivamente) (Alderete y cols., 2001).

1.6 Diagnóstico de *Trichomonas vaginalis*

T. vaginalis fue identificado hace más de 150 años (en 1836), por Donné, cuando observó microorganismos móviles en el fluido vaginal de mujeres con síntomas de infección. Sin embargo, la sensibilidad de esta técnica por visualización microscópica, también llamada prueba de montaje húmedo, es variable, con sensibilidades de 38% a 82% entre las mujeres sintomáticas (Bhesania and Narayankhedkar., 2016). A pesar de esto, esta técnica se sigue utilizando en diversas clínicas. Otra técnica utilizada para la detección de *T. vaginalis*, se basa en el cultivo del fluido vaginal. Sin embargo, esta prueba también posee diferentes inconvenientes como son: el acceso limitado al medio de cultivo Diamond o Trichosel y un retraso de hasta 7 días para la identificación de *T. vaginalis* (Van Der Pol., 2016).

Las pruebas basadas en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) presentan grandes ventajas ya que puede detectar muy pocos parásitos presentes en la muestra, así como también parásitos no viables. La prueba Affirm VPIII (Becton Dickinson, Sparks, MD) es una técnica de amplificación del ácido ribonucleico (ARN) que permite la detección de *T. vaginalis* en 30 a 60 minutos. La especificidad y la sensibilidad de tales pruebas son del 99 % y 90 %, respectivamente (Bouchemal y cols., 2017).

Las técnicas inmunológicas clásicas de enzimo-inmunoanálisis (EIA) e inmunofluorescencia directa (IFD) tienen menor sensibilidad que el cultivo o que las técnicas moleculares como la PCR, por lo que son poco usadas, pero son una opción más para el diagnóstico de la infección (Mason y cols., 2001). La prueba de ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) basada en la búsqueda de IgA, IgM e IgG específicas para tricomonas no ha sido eficaz. En un estudio comparativo de hombres sanos con otros infectados por el parásito, se observó que en los casos sintomáticos hubo una elevación significativa en los niveles de IgM e IgG en muestras

uretrales en comparación con los individuos sanos. Las inmunoglobulinas aumentan o disminuyen según la intensidad de la sintomatología (Imam y cols., 2007).

La prueba de antígeno rápido Trich (OSOM), se basa en una inmunocromatografía de flujo capilar que detecta una proteína que se encuentra en la membrana de *T. vaginalis*. A diferencia de otras técnicas, esta es mucho más rápida, ya que el resultado está disponible en 10 min. Además, de que se puede realizar en muestras congeladas sin alterar el resultado (Huppert y cols., 2005).

Hoy en día, existen pruebas de diagnóstico más específicas y sensibles. Las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT) han sido validadas para su uso en mujeres asintomáticas y sintomáticas, siendo una prueba muy sensible que se puede utilizar en múltiples tipos de muestras tales como: urinarias, uretrales, vaginales y endocervicales (Bouchemal y cols., 2017; Muzny y cols., 2014). En un estudio realizado durante el 2012 y 2013 en el condado de Jefferson, se recolectaron muestras endocervicales, uretrales o urinarias de 3,821 mujeres y 2,514 hombres para la detección de *T. vaginalis* mediante el uso de la prueba de montaje húmedo y de NAAT. Los resultados mostraron que la prueba de amplificación de ácidos nucleicos de *T. vaginalis* (NAAT) detectó infecciones en mujeres 1.3 veces más que la prueba de montaje húmedo (Muzny y cols., 2014). En resumen, la detección de *T. vaginalis* por NAATs, incluso en pacientes asintomáticos, es la prueba más eficaz y por ende, la mejor opción en el diagnóstico de la tricomoniasis.

1.7 Presentación clínica de la tricomoniasis

Previamente se consideraba que la tricomoniasis solo afectaba a las mujeres, hoy en día se conoce que *T. vaginalis* afecta a ambos sexos, es un factor de riesgo para la transmisión y adquisición del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y se asocia con eventos adversos durante el embarazo (Hirt RP and Sherrard J, 2015).

1.7.1 Tricomoniasis en mujeres

T. vaginalis infecta el epitelio escamoso del tracto genital, incluyendo la uretra femenina. Los síntomas habituales de *T. vaginalis* son un flujo vaginal asociado con vaginitis, cervicitis y uretritis, aunque se reconoce que hasta un tercio de las mujeres no presentan síntomas (Hirt RP and Sherrard J, 2015). Estudios recientes han sugerido un mayor riesgo de endometritis aguda asociado con la tricomoniasis (Cherpes y cols., 2006). Por otro lado, el pH vaginal es alrededor de 4 en mujeres sanas. Durante la tricomoniasis el pH vaginal se aumenta a más de 7, siendo favorable para la multiplicación de *T. vaginalis*. El hecho de que los síntomas de la tricomoniasis empeoren durante la menstruación se puede explicar por los cambios en el pH y las hormonas (Bachmann y cols., 2011). Además, la sangre menstrual crea un medio rico con una alta concentración de hierro. En consecuencia, se promueve la reproducción de *T. vaginalis* y su adhesión a las células vaginales, lo que provoca un empeoramiento de los síntomas (Bouchemal y cols., 2017).

1.7.1.1 Tricomoniasis durante el embarazo

La infección por *T. vaginalis* en el embarazo se ha asociado con bajo peso al nacer y parto prematuro (Hirt RP and Sherrard J, 2015). Sin embargo, no se ha podido demostrar que el tratamiento contra la tricomoniasis mejore el pronóstico del embarazo; de hecho, algunos estudios han indicado que el tratamiento puede tener un impacto negativo en el embarazo. La infección neonatal por transmisión vertical de *T. vaginalis* es rara. Los recién nacidos pueden infectarse con *T. vaginalis* durante el paso por el canal de parto infectado y algunas veces desarrollar infecciones del tracto urinario o vaginal. La *T. vaginalis* rara vez se encuentra en el tracto respiratorio de los recién nacidos, aunque existen reportes de enfermedades respiratorias con presencia de *T. vaginalis* (Bruins y cols., 2013).

1.7.2 Tricomoniasis en hombres

En los hombres la tricomoniasis generalmente es una infección transitoria y el 75 % de los hombres son asintomáticos (Hirt RP and Sherrard J, 2015). La infección por *T.*

vaginalis puede causar uretritis, prostatitis e infertilidad (Seo y cols., 2014). También, algunos estudios sugieren que la tricomoniasis puede contribuir al desarrollo de cáncer de próstata (Hirt RP and Sherrard J, 2015).

1.8 Tratamiento contra *Trichomonas vaginalis*

Antes de la aparición de los 5-nitroimidazoles el tratamiento de la tricomoniasis se realizaba con compuestos como la solución de oxicianida de mercurio en irrigaciones, fosfato ácido sódico por vía oral. Estos compuestos actuaban mediante la disminución de pH vaginal y como consecuencia el número de parásitos, logrando tasas de curación del 22% - 40% (Fakhrieh y cols., 2017). Auralmente el tratamiento apropiado contra la tricomoniasis incluye los derivados de 5-nitroimidazoles, de los cuales el metronidazol y el tinidazol son los únicos medicamentos aprobados por la Administración de alimentos y medicamentos o por sus siglas en inglés "FDA".

1.9 El metronidazol contra la tricomoniasis.

El metronidazol, que tiene una amplia actividad antimicrobiana, es el medicamento de elección. El metronidazol (α , β -hydroxyethyl-2-methyl-5-nitroimidazole) fue desarrollado en 1959 y aprobado en la década de 1960 para el tratamiento de la tricomoniasis. Este medicamento es un miembro de la familia de los nitroimidazoles que previene la síntesis del material genético al alterar el ácido desoxirribonucleico (ADN) de las células del microorganismo. Es muy activo contra bacterias anaeróbicas y parásitos anaeróbicos, incluido *T. vaginalis* (Tabla 5) (Fakhrieh y cols., 2017).

Para tratar la infección el mecanismo de acción de este compuesto se realiza en 4 fases (Fig. 4): 1) Penetración del fármaco por difusión pasiva a través de la pared celular de *T. vaginalis* y se incrementa por el nivel de reducción intracelular. 2) Activación del mtz por: la ferredoxina oxidoreductasa (PFOR) y la flavodoxina que produce dos compuestos tóxicos llamados N-2-hidroxietil del ácido oxámico y acetamida. 3) Acción sobre el ácido desoxirribonucleico (ADN) de *T. vaginalis*. Inhiben la síntesis y degradan el ADN, siendo mayor cuanto más contenido de adenina (A)+

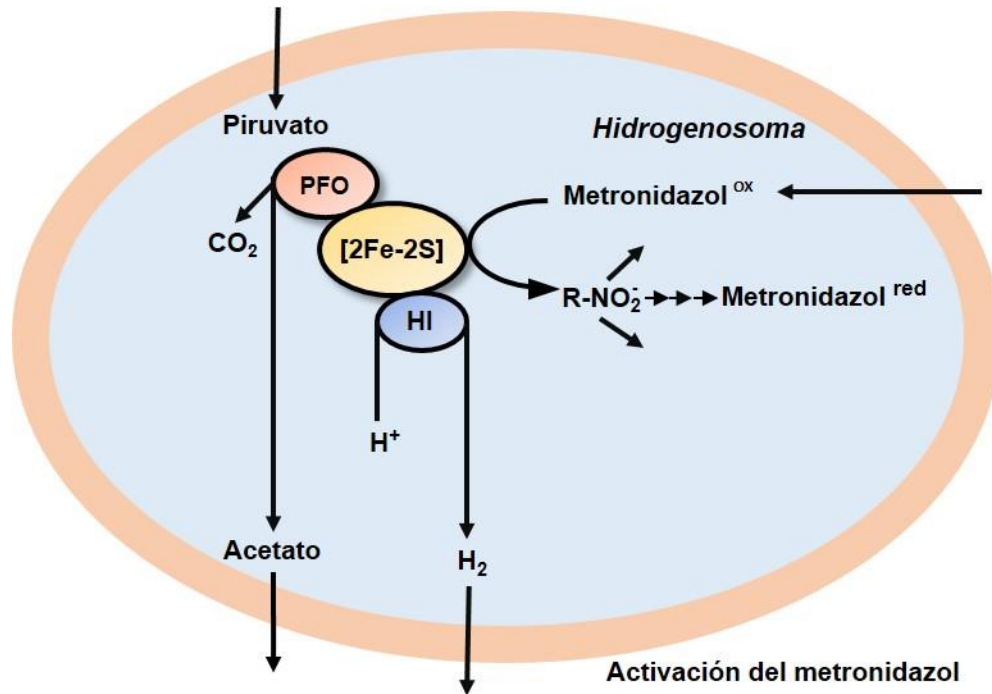


Figura 4. Mecanismos de acción de los nitroimidazoles. 1) Penetración del fármaco por difusión pasiva a través de la pared celular de *T. vaginalis* y se incrementa por el nivel de reducción intracelular. 2) Activación del mtz por: la ferredoxina oxidorreductasa (PFOR) y la flavodoxina que produce dos compuestos tóxicos llamados N-2-hidroxietyl del ácido oxámico y acetamida. 3) Acción sobre el ácido desoxirribonucleico (ADN) de *T. vaginalis*. *Tomada y modificada de Kulda, 1999*

PFO: piruvato: Ferredoxin oxidorreductasa; [2 Fe -2S]: Ferredoxina; HI: hidrogenasa; R-NO₂: radicales libres.

timina (T) tiene el ADN, por eso las roturas se producen entre estas bases. Cabe resaltar que la secuencia génica de *T. vaginalis* contiene más del 70% de A:T por eso, la concentración mínima letal (CML) está entre 1-1 µg/ml. 4) Liberación de productos finales inactivos (Fakhrieh y cols., 2017).

Las propiedades farmacológicas de este medicamento son adecuadas, y es accesible en forma oral, intravenosa, vaginal y tópica. Después de la administración oral, se absorbe bien y alcanza el nivel más alto en 1 a 2 horas después de la ingestión. Su excreción es, en orden descendente, renal (77 %), fecal (14 %) y pulmonar (5 %). El 4% restante se excreta en la leche materna, el semen, el fluido vaginal, la saliva y la bilis (Fakhrieh y cols., 2017; Narcisi y cols., 1996).

1.9.1 Efectos secundarios del metronidazol.

Los efectos secundarios en la terapia sistémica con metronidazol presentes en menos del 1% de los pacientes incluyen vómitos, diarrea, calambres abdominales, dolor de cabeza, somnolencia y fiebre. La administración intravenosa se asocia típicamente con tromboflebitis. Los efectos secundarios, poco frecuentes, consisten en úlceras bucales, dolor de cabeza, glositis, mareos, inflamación de la boca y los labios y orina de color oscuro (Ali y cols., 2007).

1.9.1.1 Resistencia al metronidazol.

El mecanismo de resistencia al metronidazol de *T. vaginalis* no está totalmente elucidado, pero puede ser debido a varias mutaciones (Schwebke y cols., 2006). El uso irregular y prolongado del metronidazol ha llevado a la resistencia a los medicamentos, que es la causa más importante del fracaso del tratamiento (Schwebke y cols., 2006). Si hay sospecha de resistencia al metronidazol, se requiere un ensayo de susceptibilidad al metronidazol, ya que puede ayudar a determinar el curso del tratamiento posterior. El aumento en la prevalencia de cepas de *T. vaginalis* resistentes a metronidazol muestra la necesidad de desarrollar nuevos fármacos que no sean nitroimidazol para combatir la tricomoniasis resistente (Fakhrieh y cols., 2017). Por otro lado, se conocen dos tipos distintos de resistencia al metronidazol denominadas

aeróbica y anaeróbica de acuerdo a las condiciones requeridas en los ensayos de sensibilidad.

1.9.1.2 Resistencia aeróbica al metronidazol.

Este tipo de resistencia sólo se manifiesta en presencia de oxígeno, se cree que aparece por un incremento de la concentración de oxígeno intracelular y re-oxidación de radicales libres o eliminación competitiva de electrones por el oxígeno. *T. vaginalis* es susceptible al metronidazol en condiciones anaeróbicas, puesto que retienen la ruta hidrogenosomal responsable de la activación del fármaco. En este tipo de resistencia, la transcripción del gen de ferredoxina disminuye en cepas resistentes de *T. vaginalis* (Fakhrieh y cols., 2017; Krajden y cols., 1986).

1.9.1.3 Resistencia anaeróbica al metronidazol.

Resulta de la eliminación de las rutas de activación del fármaco excluyendo completamente su acción contra *T. vaginalis*. Estas cepas toleran concentraciones extremadamente altas en estas condiciones. Este tipo de resistencia ha sido inducida *in vitro* en 1-2 años a partir de medios con concentraciones crecientes del fármaco, pero no se ha observado en aislados clínicos. En este tipo de resistencia, la actividad de la enzima piruvato: la ferredoxina oxidoreductasa (PFOR) disminuye o desaparece en *T. vaginalis* y se altera el metabolismo del medicamento. (Fakhrieh y cols., 2017; Kulda, 1999).

1.10 Las antraquinonas: una nueva alternativa contra la infección por *Trichomonas vaginalis*

A pesar de que el tratamiento contra la tricomoniasis incluye 5-nitroimidazoles, como metronidazol y tinidazol, existen cepas de *Trichomonas* que se han vuelto resistentes a estos medicamentos. Es por ello, que se necesitan nuevas alternativas contra la tricomoniasis. Una nueva alternativa son los extractos de productos naturales como las quinonas (Gehrig S y cols., 2009). Las quinonas son compuestos presentes en la

naturaleza, se forman de la oxidación de compuestos aromáticos. De acuerdo a su grado de complejidad química se clasifican en benzoquinonas (monocíclicas); naftoquinonas (bicíclicas) y antraquinonas (tricíclicas) (Wink M y cols., 2012). Las antraquinonas tienen una amplia gama de efectos farmacológicos, como son antitumoral, antimicrobiano y anti-parasitario (Gehrig and Efferth., 2009).

El mecanismo de acción de las antraquinonas no ha sido elucidado. Sin embargo, Wang y colaboradores demostraron que la antraquinona (emodina), posee una actividad tricomonocida y esta se revirtió al suministrar catalasa, ya que retiene peróxido de hidrógeno. Por lo tanto, se sugiere que la actividad tricomonocida de la emodina esta mediada por la producción de peróxido de hidrógeno como metabolito de oxígeno tóxico (Wang y cols., 1993). Por otro lado, se ha observado que las antraquinonas dañan el ADN al intercalarse en él, especialmente entre las bases G:C. Además, algunos de los compuestos intercalantes inhiben la enzima ADN topoisomerasa I o II que son esenciales para el proceso de replicación. Si las topoisomerasas de ADN están bloqueadas, las células no pueden dividirse. (Gehrig and Efferth., 2009).

1.11 Prevención de la infección por *Trichomonas vaginalis*

El uso del condón sigue siendo la mejor protección contra las ETS. Sin embargo, debido a razones religiosas o culturales, el uso del condón puede ser limitado, particularmente en algunos países en desarrollo. Por otro lado, se recomienda el tratamiento simultáneo de parejas sexuales para prevenir la reinfección. Sin embargo, la administración sistémica de agentes quimioterapéuticos para prevenir la infección da como resultado una mayor incidencia de cepas resistentes a nitroimidazol. Por lo tanto, se necesitan métodos de prevención que utilicen medicamentos o vacunas locales (Bouchemal y cols., 2017). Para la tricomoniasis bovina, existe una vacuna disponible comercialmente contra la *Tritrichomonas foetus* (TrichGuard, Boehringer Ingelheim Vetmedica). Este parásito es un protozoo flagelado similar a *T. vaginalis* que infecta al ganado (Edmondson y cols., 2017). Sin embargo, hoy en día no existe una vacuna contra *T. vaginalis*.

La circuncisión masculina representa otro método para prevenir la transmisión de *T. vaginalis*. Diversos estudios han demostrado que los hombres circuncidados tienen menor riesgo de presentar infecciones virales y bacterianas que los hombres no circuncidados (Weiss y cols., 2006). En un estudio clínico se demostró que la circuncisión masculina reduce la transmisión de la infección por *T. vaginalis* de hombres a mujeres (Sobngwi-Tambekou y cols., 2009).

Otra alternativa para prevenir la adquisición de infecciones por *T. vaginalis* es la administración vaginal de microbicidas. Los microbicidas son auto-administrados por las mujeres antes del coito, lo que permite un mayor control sobre la adquisición de infecciones microbianas. La administración de microbicidas antes del coito puede limitar la interacción de *T. vaginalis* con las células del huésped, previniendo así la infección (Bouchemal y cols., 2017).

II. JUSTIFICACIÓN

La tricomoniasis es una de las infecciones de transmisión sexual de mayor prevalencia en nuestro país. La resistencia del parásito al metronidazol, que es considerado el fármaco de elección para la cura de personas infectadas con este parásito ha ido en aumento.

Debido a esto es importante estudiar alternativas para el tratamiento de la infección por *T. vaginalis*, es importante la búsqueda de fármacos alternativos que sean eficaces para el tratamiento de la tricomoniasis.

III. HIPÓTESIS

T. vaginalis tratadas con compuestos orgánicos presentarán una expresión diferencial de moléculas involucradas en la citotoxicidad hacia la célula blanco con respecto a *T. vaginalis* sin tratar.

IV. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la actividad tricomonocida de 3 compuestos orgánicos.

Objetivos específicos

1. Determinar la actividad proteolítica del aislado MICH01 de *T. vaginalis* tratado con 3 diferentes compuestos orgánicos con respecto al aislado sin tratar.
2. Determinar la citotoxicidad del aislado MICH01 de *T. vaginalis* tratado con 3 diferentes compuestos orgánicos con respecto al aislado sin tratar.
3. Analizar expresión de los transcritos *tvcp65*, *tvcp39* y *mp50* del aislado MICH01 tratado con 3 diferentes compuestos orgánicos con respecto al aislado sin tratar.

V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

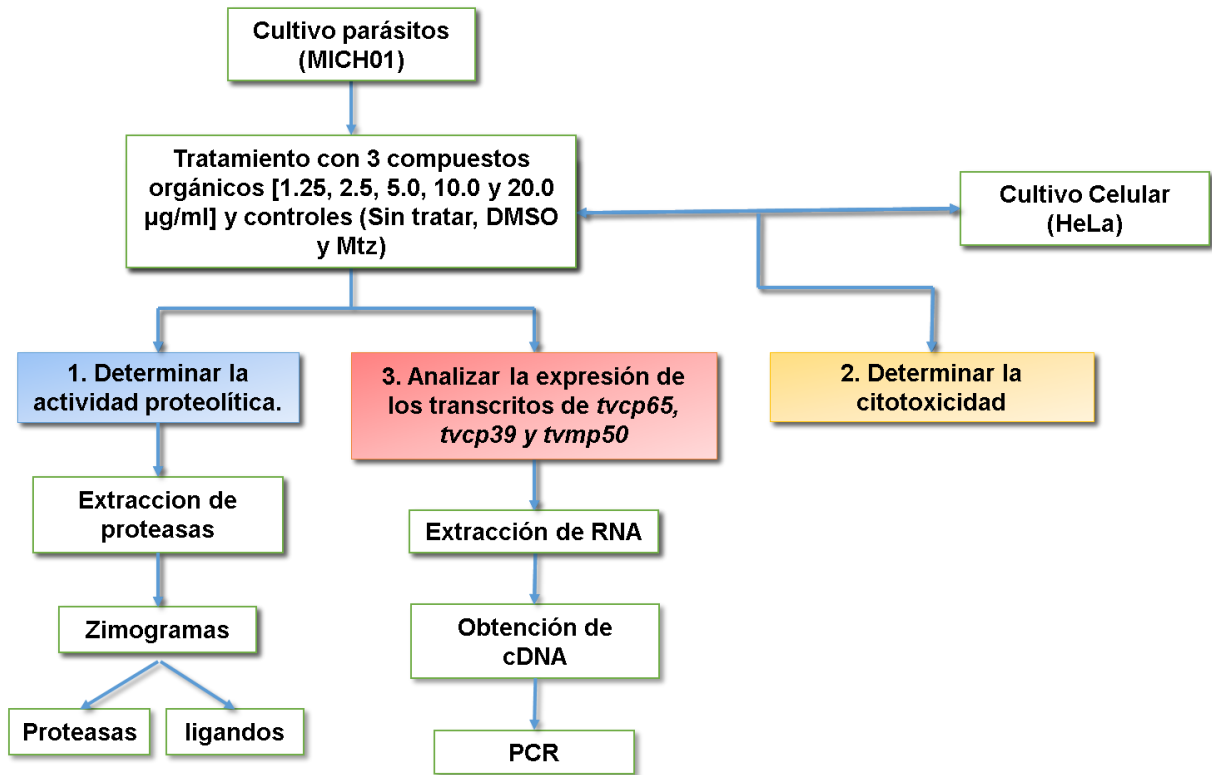


Figura 5. Estrategia Experimental.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Cultivo de *Trichomonas vaginalis* MICH01

El aislado MICH01 de *Trichomonas vaginalis* se cultivó en medio TYM (tripticaseína extracto de lavadura-maltosa) por 24 h a 37 °C adicionado con 10% de suero de caballo (SC) inactivado por calor (30 min a 56 °C) para obtener parásitos en fase logarítmica tardía de crecimiento (Diamond, 1957). 8×10^6 parásitos se cultivaron en tubos de 50 ml con 27 ml de TYM-SC, por 24 h a 37 °C. El suero de caballo previamente se inactivó a 56 °C por 30 min.

6.1.1 Tratamiento con los compuestos orgánicos en *T. vaginalis* MICH01

2×10^7 parásitos se colocaron en tubos de 15 mL con 12 mL de medio TYM (tripticaseína extracto de lavadura-maltosa) suplementado con 1.2 mL de suero de caballo (10%), para cada uno de las muestras tratadas con los diferentes compuestos orgánicos, respectivamente.

Controles	
Condición	μL
Sin tratar	-
DMSO	1.2
Mtz	72

Tratamiento	
Concentración	μL
1.25	1.5
2.5	3
5.0	6
10.0	12
20.0	24

6.2 Cultivo de la línea celular HeLa de cáncer de cervix.

6.2.1 Condiciones de cultivo de la línea celular HeLa

La línea celular de carcinoma de cérvix humano HeLa (ATCC: HTB 26), se cultivó en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Life Technologies), suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10 % (Gibco, Life Technologies), 250 UI Penicilina y 40, 500 UI de estreptomina.

Para el mantenimiento de la línea celular, primero se removió el medio de cultivo de una caja de 25 cm y se lavaron las células con 2 mL del amortiguador de fosfato salino (PBS) a pH 7.0. Posteriormente se retiró el PBS y se agregaron 2 mL de PBS pH 7.0-ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) 0.2%; se distribuyó homogéneamente con movimientos suaves oscilatorios y se incubó durante 10 min a 37 °C. Una vez transcurridos los 10 min de incubación se observaron en un microscopio invertido para ver si se despegaron las células y se disgregaron suavemente por lo menos 10 veces con la pipeta. Consecutivamente, las células despegadas se transfirieron a un tubo falcón de 15 mL y se centrifugaron a 1800 r.p.m por 5 min a 4 °C. Se retiró el sobrenadante, las células se re-suspendieron en 1 mL de medio de cultivo fresco y se distribuyeron en cajas nuevas y estériles con el medio de cultivo DMEM suplementado.

6.2.2 Descongelamiento de las líneas celulares

Los crioviales se colocaron en baño maría a 37 °C hasta que se descongelara el medio. Una vez que el medio se descongeló, se pasó a un tubo falcón de 15 mL y se centrifugó a 1800 r.p.m durante 5 min a 4°C, luego se retiró el medio y se resuspendieron las células en el medio DMEN suplementado, y se colocaron las células en cajas nuevas y estériles.

6.3 Ensayos de actividad proteolítica

6.3.1 Lisis de parásitos

2 X 10⁷ parásitos se lavaron 3 veces con 1 mL de PBS pH 7.0, y se centrifugaron a 14000 rpm por 5 min a 4 °C. Después se decantó el sobrenadante y al precipitado se le adicionaron 500 µL de PBS pH 8.0 y 50 µL de deoxicolato de sodio (DOC) al 10 %, se incubaron a 4 °C durante 20 min. Posteriormente, se adicionaron 450 µL de PBS pH 8.0 y se adicionaron 100 µL de sacarosa (10 % con PBS pH 8.0 con rojo fenol) al criovial de 1.5 mL y se centrifugó a 14000 rpm durante 30 min a 4 °C. Se retiraron los 100 µL de sacarosa.

6.3.2 Ensayo de proteasas

Los extractos se analizaron por electroforesis en gel de sustrato en geles de poliacrilamida al 10% copolimerizados con gelatina al 9%. El gel de sustrato se lavó con Tritón X-100 al 2.5 % por 30 min y se activó con el amortiguador de acetatos 3 M pH 4.5. El gel se incubó a 37 °C durante 3 h. Transcurrido el tiempo, se retiró el amortiguador de activación, y posteriormente se tiñó con azul de Coomassie R-250 toda la noche. Al día siguiente, se destiñó el gel con solución decolorante. Cada gel fue analizado en el equipo ChemiDoc Imaging Systems (Biorad). La actividad proteolítica se observó como bandas claras contra un fondo oscuro. Se realizó un análisis densitométrico de los geles empleando el programa myImageAnalysis software (Thermo scientific).

6.4 Ensayo de unión celular para proteasas

6.4.1 Fijación de células HeLa

Se usaron monocapas confluentes de células HeLa, las cuales se despegaron con 5 mL de PBS-EDTA 0.2 %, posteriormente se lavaron 3 veces con 2 mL de PBS pH 7.0

y se centrifugaron a 1800 r.p.m durante 5 min a 4°C. Se cuantificó el número de células para transferirlas a un matraz previamente siliconizado con sigmacote, Se agregaron 500 uL recubriendo la superficie interna del matraz, se retiró el sobrante y posteriormente se dejó secar. Se agregó glutaraldehido a una concentración de 2.5 % (5×10^6 células / mL) y se dejó en agitación durante 1 h a 4 °C, posteriormente las células se lavaron 5 veces con 2 mL de PBS pH 7.0 frio, se centrifugaron a 1800 r.p.m durante 5 min a 4 °C. Se bloqueó con glicina 0.2 M en PBS pH 7.0 por 1 h a temperatura ambiente en la misma proporción que el glutaraldehido. Se lavaron las células 5 veces con PBS pH 7.0, se centrifugó a 1800 r.p.m por 5 min a 4°C y posteriormente se lavó 3 veces con 1 mL de TDSET para ser fraccionadas 1×10^6 células en 200 µL de TDSET en tubos de 1.5 mL siliconizados.

6.4.2 Ensayo de ligandos

Este ensayo se usó para detectar proteínas con afinidad a la superficie de las células blanco. Se obtuvieron extractos de 2×10^7 parásitos; una vez obtenidos los extractos, se lavaron 3 veces con 1 mL de PBS pH 7.0 se centrifugaron a 14000 rpm a 4 °C por 5 min y posteriormente se decantó el sobrenadante. Al precipitado se le adicionaron 450 µL de PBS pH 8.0 y 50 µL de DOC al 10 %, se incubó a 4 °C durante 20 min y se le adicionaron 450 µL de PBS pH 8.0. En el fondo se agregaron 100 µL de sacarosa y se centrifugó a 14 000 rpm por 30 min a 4 °C. El lisado se adicionó a 2×10^6 células HeLa previamente fijadas, en agitación suave por 18 h a 4 °C. Después del tiempo de interacción los ligandos se centrifugaron a 14 000 rpm por 5 min a 4 °C, se decantó el sobrenadante y las pastillas se lavaron 5 veces con 2 mL de PBS pH 8.0 DOC al 1 %, se decantó la solución de lavado y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionaron 30 µL de amortiguador de carga 5x en cada ligando, se incubaron 20 min a 37 °C para eluir las proteasas que se encuentran unidas en la superficie de las células. Transcurrido el tiempo, se centrifugaron a 14 000 rpm por 5 min a 4 °C. Los ligandos se analizaron por electroforesis en gel de sustrato en geles de poliacrilamida al 10 % copolimerizados con gelatina al 9%. El gel de sustrato se lavó con Triton X-100 al 2.5 % por 30 min, se desechó el tritón y se activó con el amortiguador de acetatos 3 M pH 4.5 por 3 h. a 37 °C. Posteriormente, se retiró el

amortiguador de acetatos y se tiñó el gel con azul de comassie R-250 toda la noche. Al día siguiente, se destiñó con solución decolorante. Cada gel fue analizado en el equipo ChemiDoc Imaging Systems (Biorad). La actividad proteolítica se observó como bandas claras contra un fondo oscuro.

6.5 Ensayo de Citotoxicidad

Las monocapas confluentes de células HeLa se sembraron en placas de 96 pozos, Para eso 4×10^4 células HeLa en 100 μ L del medio DMEM-SC se sembraron por pozo. Las células se incubaron por 24 h a 37 °C en 5 % de CO₂. Enseguida, las monocapas confluentes de células HeLa se pusieron a interactuar con los parásitos a una relación (1:5) en 100 μ L de medio de interacción TYM-DMEM (1:2) sin suplementar.

Se realizó una cinética de citotoxicidad a diferentes tiempos de interacción (20 y 40 min). Después las monocapas se lavaron suavemente 3 veces con 2 mL de PBS pH 7.0, se fijaron con 50 μ L de formaldehído al 2 % durante 10 min a temperatura ambiente, se lavaron 2 veces con 1 mL de PBS pH 7.0, se tiñeron con cristal violeta al 0.13 % en etanol-formaldehído (5:2) e inmediatamente se lavaron con PBS pH 7.0 hasta quitar el excedente de colorante y se dejó secar a temperatura ambiente durante 24 h. El colorante se eluyó con 50 μ L de SDS al 1 % en 50 % de etanol por 15 min a temperatura ambiente. La destrucción de monocapas de células HeLa se evaluó mediante un método colorimétrico y se cuantificó espectrofotométricamente a 570 nm.

Como controles del ensayo se usaron pozos con monocapas confluentes de células HeLa que no interaccionaron con *T. vaginalis*. El porcentaje (%) de citotoxicidad se calculó considerando la densidad óptica del control como el 100 % de monocapa, la absorbancia de la muestra representó la monocapa remanente y la diferencia entre el % de la monocapa remanente y el 100 % de monocapa control correspondió al % de citotoxicidad. Cada experimento se realizó por triplicado y se repitió al menos tres veces.

6.6 Análisis de la expresión de los transcritos de tvcp65, tvcp39 y tvMP50 de *Trichomonas vaginalis*

6.6.1 Extracción de ARN total mediante la técnica de Trizol

A 2×10^6 parásitos se les adicionó 1 mL de trizol, se mezcló por inversión e incubados a temperatura ambiente por 10 min, seguido de 30 min a 4 °C. Se adicionaron 200 µL de cloroformo, se mezcló por 15 seg a temperatura ambiente, y se centrifugó a 10 000 rpm a 4 °C por 15 min. La fase acuosa fue recuperada y se le adicionaron 0.5 mL de isopropanol por cada 1 mL de trizol, se mezclaron e incubaron por 15 min temperatura ambiente y se centrifugaron 10 000 rpm a 4 °C por 15 min. Posteriormente se descartó el sobrenadante y se lavaron las pastillas 2 veces con etanol al 75 % en agua DEPC, se centrifugaron a 10 000 rpm por 3 min a 4 °C, se dejaron secar las pastillas a temperatura ambiente. Al final la pastilla se resuspendió en 20µL de agua DEPC. Finalmente, el ARN obtenido fue cuantificado por espectrofotometría con un equipo nanodrop y visualizado mediante geles de agarosa al 1% y TBE 0.5x.

6.6.2 Síntesis de cDNA

A 1 µg de ARN se le adicionó 1 µL de oligo dT (10 pmol/µL) y agua DEPC cbp 12 µL, se incubo a 70 °C por 15 min. Después se colocó en hielo por 5 min y se adicionaron 4 µL de amortiguador 5x, 2 µL de dNTPs y se incubaron a 42 °C por 2 min. Se colocó rápidamente en hielo y se adicionó 1 µL de la retrotranscriptasa reversa (Thermo Scientific RevertAid Reverse Transcriptase), se incubó a 42 °C por 60 min. Pasado el tiempo se inactivó la enzima retrotranscriptasa reversa a 70 °C por 10 min, Finalmente el cDNA obtenido fue cuantificado por espectrofotometría con un equipo nanodrop.

6.6.3 Amplificación por PCR de *tvcp65*, *tvcp39* y *mp50* de *Trichomonas vaginalis*

6.6.3.1 Amplificación por PCR de *tvcp65* de *Trichomonas vaginalis*

Para la amplificación del gen *tvcp65* se diseñaron los oligonucleótidos basados en la secuencia de nucleótidos del gen *tvcp65* reportado que su amplificado es de 370 pb (Álvarez-Sánchez y coL, 2008). Los iniciadores sentido y antisentido son los siguientes:

Sentido SSY65 5'ATA AGA GGA GCG TGA TGG CAC AT'3

Antisentido S65 5 'ACG CGA TTA CAT CTG GAG AAC TC'3

Para llevar a cabo la reacción de PCR, se utilizó 10 pmol de los iniciadores sentido y antisentido, 6 µL de 2x KAPA 2G Fast Ready Mix, 0.5 µg de cDNA, llevar a un volumen final de 12 µL. Se utilizó el siguiente programa en el termociclador:

94 °C 2 min	1 ciclo
94 °C 30 seg	} 25 ciclos
60 °C 1 min	
72 °C 30 seg	
72 °C 7 min	1 ciclo

Cada una de las reacciones de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1.7%. Se realizó un análisis densitométrico empleando el programa myImageAnalysis software (Thermo scientific).

6.6.3.2 Amplificación por PCR de *tvcp39* de *Trichomonas vaginalis*

Para la amplificación del gen *tvcp39* se diseñaron los oligonucleótidos. Los iniciadores sentido y antisentido son los siguientes:

Sentido CP39-FRT 5' CAG TAT GCT ATC ACA ACA GG'3

Antisentido CP39-Rev-RT 5' CGC CCT GGT GCT TGA CAA CAT'3

Para llevar a cabo la reacción de PCR, se utilizó 10 pmol de los iniciadores sentido y antisentido, 6 µL de 2x KAPA 2G Fast Ready Mix, 0.5 µg de cDNA, llevar a un volumen final de 12 µL. Se utilizó el siguiente programa en el termociclador:

Se utilizó el siguiente programa en el termociclador:

94 °C 2 min	1 ciclo
94 °C 50 seg	} 20 ciclos
55 °C 45 seg	
72 °C 1:30 min	
72 °C 7 min	1 ciclo

Cada una de las reacciones de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 2%. Se realizó un análisis densitométrico empleando el programa myImageAnalysis software (Thermo scientific).

6.6.3.3 Amplificación por PCR de *mp50* de *Trichomonas vaginalis*

Para la amplificación del gen de *mp50*. Se diseñaron los siguientes iniciadores:

Sentido MP50 5'CGA CTG GGA CTG GGC TTT GAA ACT CG'3

Antisentido MP50 5'TCA AAG TAC TCT TGA AGC'3

Para llevar a cabo la reacción de PCR, se utilizó 10 pmol de los iniciadores sentido y antisentido, 12.5 µL de 2x KAPA 2G Fast Ready Mix, 0.5 µg de cDNA, llevar a un volumen final de 25 µL. Se utilizó el siguiente programa en el termociclador:

94 °C 2 min	1 ciclo
94 °C 1 min	} 25 ciclos
55 °C 1.4 min	
72 °C 2 min	
72 °C 7 min	1 ciclo

Cada una de las reacciones de PCR se corrió en un gel de agarosa al 1%. Se realizó un análisis densitométrico empleando el programa myImageAnalysis software (Thermo scientific).

6.6.3.4 Amplificación por PCR de β -tubulina de *Trichomonas vaginalis*

Para la amplificación del gen de β -tubulina, utilizado como control de carga, para todos los genes que se amplificaron. Se utilizaron los siguientes iniciadores:

Sentido BTUB9 5' CAT TGA TAA CGA AGC TCC TTT ACG AT'3

Antisentido BTUB2 5'GCA TGT TGT GCC GGA CAT AAC CAT'3

Para llevar a cabo la reacción de PCR, se utilizó 10 pmol de los iniciadores sentido y antisentido, 6 µL de 2x KAPA 2G Fast Ready Mix, 0.5 µg de cDNA, llevar a un volumen final de 12 µL. Se utilizó el siguiente programa en el termociclador:

94 °C 2 min	1 ciclo
94 °C 1 min	} 25 ciclos
48 °C 1 min	
72 °C 30 seg	
72 °C 7 min	1 ciclo

Cada una de las reacciones de PCR se corrió en un gel de agarosa al 1%. Se realizó un análisis densitométrico empleando el programa myImageAnalysis software (Thermo Cientific).

6.7 Análisis estadísticos

Todos los datos fueron expresados como promedio \pm la desviación estándar (SEM). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. La diferencia entre los datos fue determinada por las pruebas t de Student y ANOVA a un nivel de significancia de $p < 0.05$, utilizando el programa GraphPad Prism 5.0

VII. RESULTADOS

Los compuestos orgánicos utilizados fueron A7.11.11, A7.11.9 y A7.4.5+SPE-2 derivados de las antraquinonas.

7.1 El tratamiento con los compuestos A7.11.11, A7.11.9 y A7.4.5+SPE-2 reducen las tasas de crecimiento de *Trichomonas vaginalis*

Primero se examinó el efecto del tratamiento con los compuestos A7.11.11, A7.11.9 y A7.4.5+SPE-2 a diferentes concentraciones 1.5, 2.5, 5.0, 10 y 20 µg/mL sobre la viabilidad del aislado de *T. vaginalis* MICH01 fresco. La adición de A7.11.11, A7.11.9 y A7.4.5+SPE-2 a diferentes concentraciones 1.5, 2.5, 5.0, 10 y 20 µg/mL en el medio de cultivo redujo la viabilidad de tricomonas en comparación con los parásitos no tratados y manejados de forma idéntica (Tabla 5).

7.2 El tratamiento con los compuestos A7.11.11, A7.11.9 y A7.4.5+SPE-2 afectan la actividad proteolítica de CP65, CP39 y mp50.

Reportes previos han establecido el papel principal de CP65 y CP39 en la citotoxicidad de *T. vaginalis* (Álvarez-Sánchez y cols., 2000, 2007; Hernández-Gutiérrez y cols., 2003). Primero se determinó si los niveles viabilidad reducidos en los parásitos tratados con los tres diferentes compuestos (Tabla 5), están relacionados con los cambios en la actividad proteolítica de CP65 y CP39.

Para esto, se realizó el ensayo de actividad proteolítica con el fin de determinar los patrones de proteasas totales de los parásitos tratados con los tres diferentes compuestos orgánicos a distintas concentraciones (1.5, 2.5, 5.0, 10 y 20 µg/mL). En la Figura 6 se observan los cambios en los zimogramas de los lisados totales del parásito después del tratamiento con el compuesto orgánico A7.11.11 a diferentes concentraciones. Podemos observar que hay una disminución en la actividad

proteolítica en las regiones de 65 y 39 KDa (señalada con flecha) implicadas en la citotoxicidad. Después del tratamiento con el compuesto A7.11.11 en concentraciones de 1.5, 2.5, 5.0, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (carril 4-8, respectivamente), en comparación con los parásitos control (sin tratamiento, carril 1 y tratados con DMSO, carril 2), se realizó un análisis densitométrico, observándose una disminución del 10 % en la actividad proteolítica en la región de 65 KDa a partir de las concentraciones 5, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 6.B) comparadas con los controles (sin tratar y DMSO). Sin embargo, no se observó diferencia significativa entre ellas. Para la región de 39 KDa se observó una disminución hasta del 20 % en las concentraciones 5, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ comparadas con los controles (sin tratar y DMSO) (Figura 6. C).

También se analizó el patrón de proteasas totales de los parásitos tratados con el compuesto orgánico A7.11.9. En la Figura 7 se observan los cambios en los zimogramas de los lisados totales del parásito después del tratamiento a diferentes concentraciones del compuesto A7.11.9. Podemos observar que hay una disminución en la actividad proteolítica en las regiones de 65 y 39 KDa (señalada con flecha) implicadas con la citotoxicidad después del tratamiento con el compuesto A7.11.9. en las concentraciones de 1.5, 2.5, 5.0, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (carril 4-8, respectivamente), en comparación con los parásitos control sin tratamiento (carril 1) y con DMSO (carril 2). Sin embargo, la disminución más marcada de la actividad proteolítica se observa en las concentraciones 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 7 A. Carril 7 y 8). Se realizó el análisis densitométrico y se observó una disminución del 30 % en la actividad proteolítica en las concentraciones 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en la región de 65 KDa, comparadas con los controles (sin tratar y DMSO). En la concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la disminución de la actividad proteolítica fue del 40 % (Figura 7.B). Para la región de 39 KDa se observó una disminución de la actividad proteolítica del 10 % en la concentración 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y del 30 % en las concentraciones de 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ comparadas con los controles (sin tratar y DMSO) (Figura 7. C). Finalmente se analizaron los patrones de proteasas totales de los parásitos tratados con el compuesto orgánico A7.4.5+SPE-2. En la Figura 8 se observan los cambios en los zimogramas de los lisados totales del parásito después del tratamiento con el compuesto A7.4.5+SPE-2 a diferentes concentraciones. Podemos observar que hay una disminución en la actividad proteolítica en las regiones de 65 y 39 KDa (señalada con flecha) implicadas con la citotoxicidad después del

tratamiento con A7.4.5+SPE-2 en concentraciones de 1.5, 2.5, 5.0, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (carril 4-8, respectivamente), en comparación con los parásitos control sin tratamiento (carril 1) y con DMSO (carril 2). Interesantemente, en las concentraciones de 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la disminución de la actividad proteolítica fue mayor, al grado de casi desaparecer el bandeo en las regiones de 65 y 39 KDa (Figura 8 A carril. 7 y 8). La actividad proteolítica disminuyó hasta en un 40 % en la región de 65 KDa comparada con los controles (Figura 8 B), mientras que en la región de 39 KDa disminuyó más del 70 % (Figura.8 C); teniendo una mayor actividad tricomonida respecto al fármaco de excelencia metronidazol. Por otra parte, la metaloproteasa TvMP50 participa en la patogénesis de *T. vaginalis*. Estudios recientes han demostrado que TvMP50 es una metaloproteasa inmunogénica que podría estar presente y activa durante la tricomoniasis masculina y participa en la citotoxicidad hacia las células DU145; su expresión es regulada por el Zn^{2+} (Puente-Rivera y cols, 2017). Se analizó si el tratamiento con los tres compuestos orgánicos a concentraciones de 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ disminuye la actividad proteolítica de mp50 (Figura 9). Interesantemente, el tratamiento con los compuestos orgánicos A7.11.9 y A7.4.5+SPE-2 a concentraciones de 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ disminuyen la actividad proteolítica en la región de 50 KDa hasta en un 50% comparada con el fármaco de excelencia metronidazol y hasta en un 90% comparada con nuestros controles DMSO y sin tratar (Figura 9B).

Tabla 5. Porcentaje de viabilidad de *T. vaginalis* después del tratamiento con los tres diferentes compuestos orgánicos.

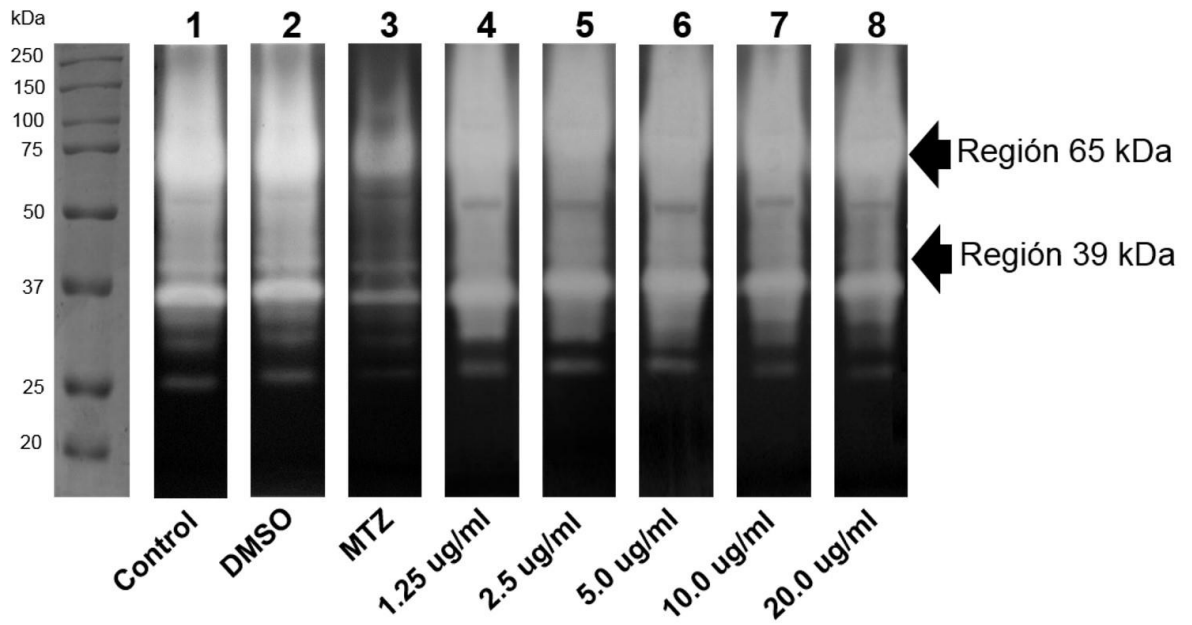
	A7.11.11		A7.11.9		A7.4.5+SPE-2	
	% viabilidad	D.E.	% viabilidad	D.E.	% viabilidad	D.E.
DMSO	100	---	100	---	100	---
Mtz 6 μ M	4.36	1.16	4.3	0.87	5.4	2.4
1.25 μ g/mL	89.1	1.7	75.16	14.8	50.65	7.7
2.5 μ g/mL	83.16	3.2	55.4	4.94	38.2	7.5
5 μ g/mL	79.6	1.15	24.1	3.44	24.7	2.8
10 μ g/mL	79.2	2.5	13.1	3.39	13.5	1.8
20 μ g/mL	77.3	3.5	12	2.15	9.2	0.67

% = Porcentaje de viabilidad de trofozoitos

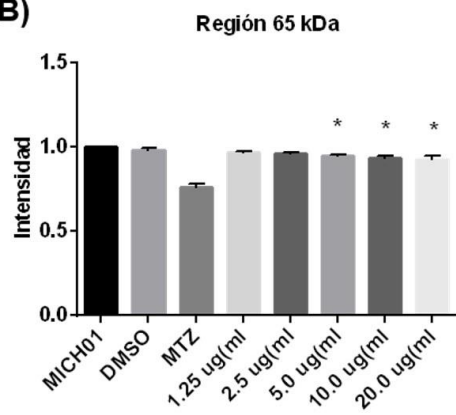
D.E. = Desviación estándar.

MtzI, el fármaco más popular actualmente disponible en el mercado, fue usado como estándar de referencia a la concentración de 6 μ M.

A)



B)



C)

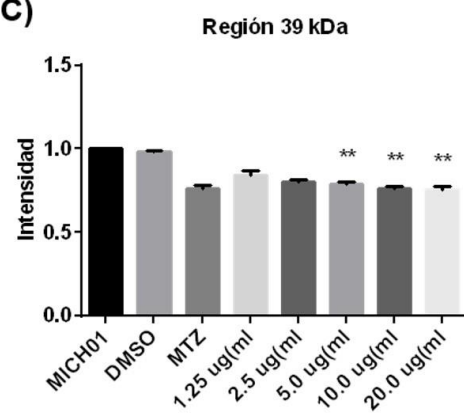
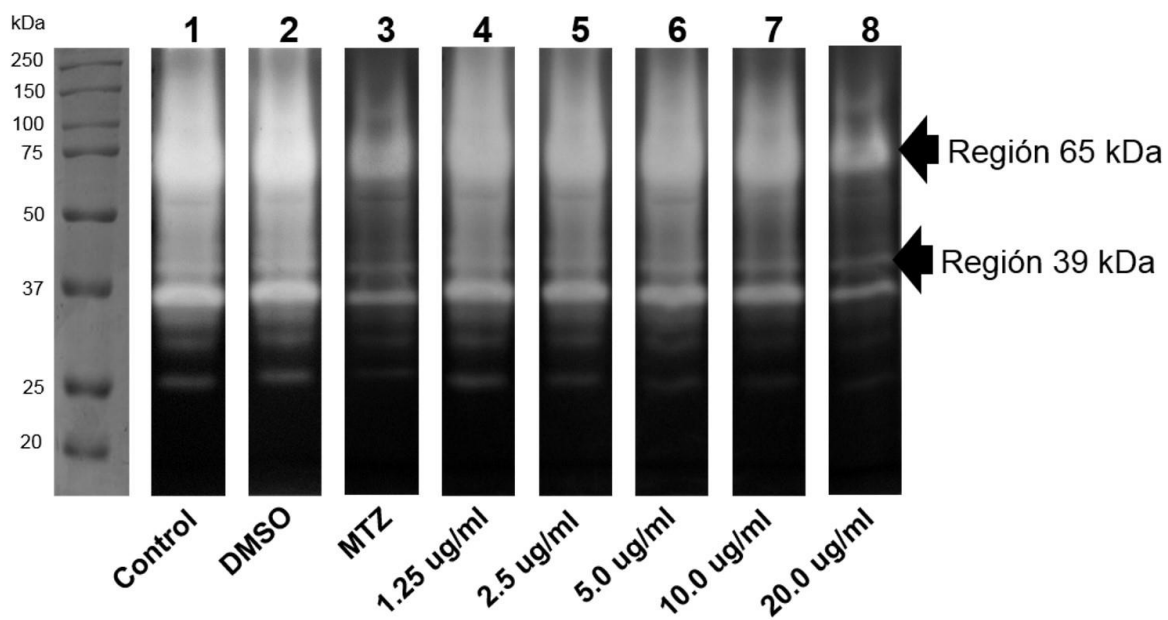
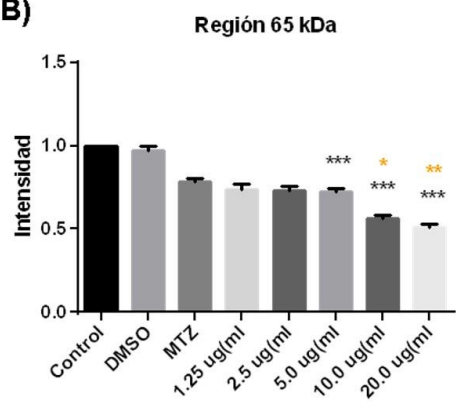


Figura 6. Efecto del tratamiento con el compuesto A7.11.11 sobre la actividad proteolítica de CP65 y CP39. (A) Zimogramas de proteasas totales de lisados de parásitos tratados a diferentes concentraciones del compuesto orgánico A7.11.11. Carril 1. Control. Carril 2. DMSO. Carril 3. Metronidazol. Carril 4. [1.25 µg/mL]. Carril 5. [2.5 µg/mL]. Carril 6. [5 µg/mL]. Carril 7. [10 µg/mL]. Carril 8. [20 µg/mL]. Las puntas de flecha muestran la posición de las dos regiones de actividad de proteolítica donde se encuentran las CP involucradas en la citotoxicidad (CP65 y CP39). (B, C) Análisis densitométrico de la actividad proteolítica de CP65 y CP39 de lisados de parásitos que contienen proteasas totales. Usando el Programa My Imagine Analysis (Thermo-Fisher). Los datos fueron expresados como promedio ± SEM (Error estándar de la media) *p<0.05, **p<0.01. Estos experimentos se realizaron al menos tres veces con resultados similares.

A)



B)



C)

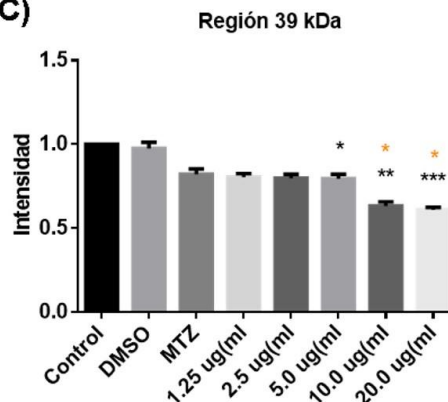
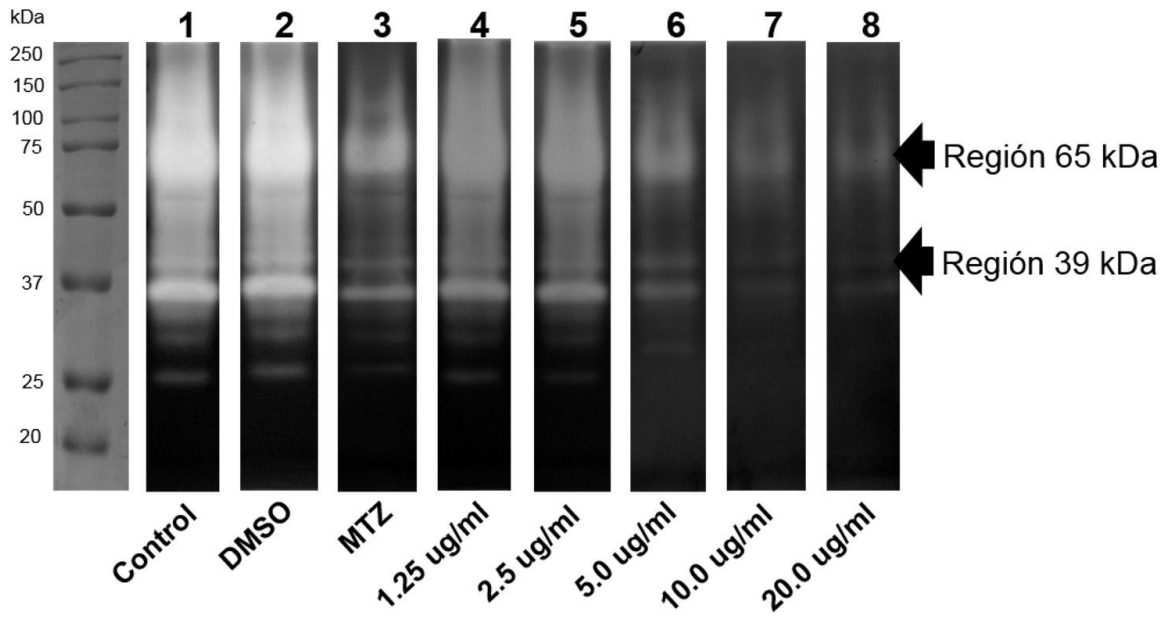
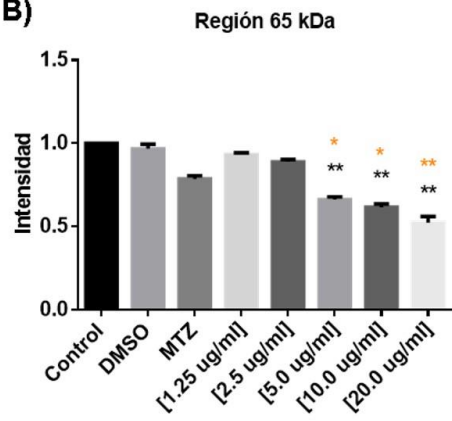


Figura 7. Efecto del tratamiento con el compuesto A7.11.9 sobre la actividad proteolítica de CP65 y CP39. (A) Zimogramas de proteasas totales de lisados de parásitos tratados a diferentes concentraciones del compuesto orgánico A7.11.9. Carril 1. Control. Carril 2. DMSO. Carril 3. Metronidazol. Carril 4. [1.25 µg/mL]. Carril 5. [2.5 µg/mL]. Carril 6. [5 µg/mL]. Carril 7. [10 µg/mL]. Carril 8. [20 µg/mL]. Las puntas de flecha muestran la posición de las dos regiones de actividad de proteolítica donde se encuentran las CP involucradas en la citotoxicidad (CP65 y CP39). (B, C) Análisis densitométrico de la actividad proteolítica de CP65 y CP39 de lisados de parásitos que contienen proteasas totales. Usando el Programa My Image Analysis (Thermo-Fisher). Los datos fueron expresados como promedio \pm SEM (Error estándar de la media) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Estos experimentos se realizaron al menos tres veces con resultados similares.

A)



B)



C)

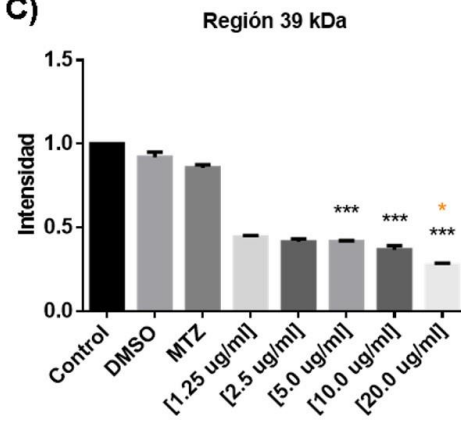


Figura 8. Efecto del tratamiento con el compuesto A7.4.5+SPE-2 sobre la actividad proteolítica de CP65 y CP39. (A) Zimogramas de proteasas totales de lisados de parásitos tratados a diferentes concentraciones del compuesto orgánico A7.4.5+SPE-2. Carril 1. Control. Carril 2. DMSO. Carril 3. Metronidazol. Carril 4. [1.25 µg/mL]. Carril 5. [2.5 µg/mL]. Carril 6. [5 µg/mL]. Carril 7. [10 µg/mL]. Carril 8. [20 µg/mL]. Las puntas de flecha muestran la posición de las dos regiones de actividad de proteolítica donde se encuentran las CP involucradas en la citotoxicidad (CP65 y CP39). (B, C) Análisis densitométrico de la actividad proteolítica de CP65 y CP39 de lisados de parásitos que contienen proteasas totales. Usando el Programa My Image Analysis (Thermo-Fisher). Los datos fueron expresados como promedio ± SEM (Error estándar de la media) **p<0.01, ***p<0.001. Estos experimentos se realizaron al menos tres veces con resultados similares.

Figura 9. Efecto del tratamiento con los tres compuestos sobre la actividad proteolítica de TVMP50. (A) Zimogramas de proteasas totales de lisados de parásitos tratados con los tres compuestos orgánicos a concentraciones de 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Carril 1. Control. Carril 2. DMSO. Carril 3. Metronidazol. Carril 4. A7.11.11 [5 $\mu\text{g}/\text{mL}$]. Carril 5. A7.11.11 [10 $\mu\text{g}/\text{mL}$]. Carril 6. A7.11.9 [5 $\mu\text{g}/\text{mL}$]. Carril 7. A7.11.9 [10 $\mu\text{g}/\text{mL}$]. Carril 8. A7.4.5+SPE-2 [5 $\mu\text{g}/\text{mL}$]. Carril 9. A7.4.5+SPE-2 [10 $\mu\text{g}/\text{mL}$]. La punta de flecha muestra la posición de la región de actividad de proteolítica de mp50. (B) Análisis densitométrico de la actividad proteolítica de mp50 de lisados de parásitos que contienen proteasas totales. Usando el Programa My Image Analysis (Thermo-Fisher). Los datos fueron expresados como promedio \pm SEM (Error estándar de la media) ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Estos experimentos se realizaron al menos tres veces con resultados similares.

Posteriormente, se realizó un ensayo de unión celular entre células HeLa en monocapas y extractos de tricomonas tratadas con los tres diferentes compuestos A.11.11, A7.11.9 y A7.4.5+SPE-2 a distintas concentraciones (1.5, 2.5, 5.0, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) seguido de una electroforesis en gel de sustrato. Los resultados muestran, que el tratamiento con el compuesto A.11.11 tuvo una reducción mínima en la actividad proteolítica de las CP's 65 y 39, similar al ensayo de proteasas totales (Figura 10), el análisis densitométrico confirmó estos resultados, donde se observó una disminución en la actividad proteolítica de CP39 hasta en un 50 % (Figura 10 C), mientras que el tratamiento con los compuestos A7.11.9 y A7.4.5+SPE-2 tuvieron un comportamiento similar (Figura 11 y 12, respectivamente). La Figura 11 se muestra una dramática reducción en la actividad proteolítica de CP65 y CP39 unidas a las células después del tratamiento con A7.11.9 (carril 5-8) en comparación con parásitos control (carril 1 y 2). Interesantemente, hay una reducción hasta más del 90 % de la CP39 con los parásitos tratados con A7.11.9 a 5.0, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (carril 6-8) en comparación con parásitos control (carril 1 y 2). Para el tratamiento con el compuesto A7.4.5+SPE-2 la reducción en la actividad proteolítica de CP65 y CP39 unidas a las células fue mayor. En la Figura 12 se muestra una reducción hasta más del 90 % de la CP39 con los parásitos tratados con A7.4.5+SPE-2 a partir de la concentración de 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (carril 5-8) en comparación con parásitos control (carril 1 y 2). Estos resultados sugieren un vínculo de la citotoxicidad dependiente de CP65 y CP39. Los análisis densitométricos confirmaron estos resultados. Finalmente se analizó, se analizó si el tratamiento con los tres compuestos orgánicos a concentraciones de 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ disminuye la actividad proteolítica de mp50 (Figura 13). Interesantemente, el tratamiento con el compuesto orgánico A7.4.5+SPE-2 a concentraciones de 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ disminuyen la actividad proteolítica de la metaloproteasa 50 (mp50) hasta en un 40% comparada con el fármaco de excelencia metronidazol y hasta en un 80% comparada con nuestros controles DMSO y sin tratar (Figura 13B).

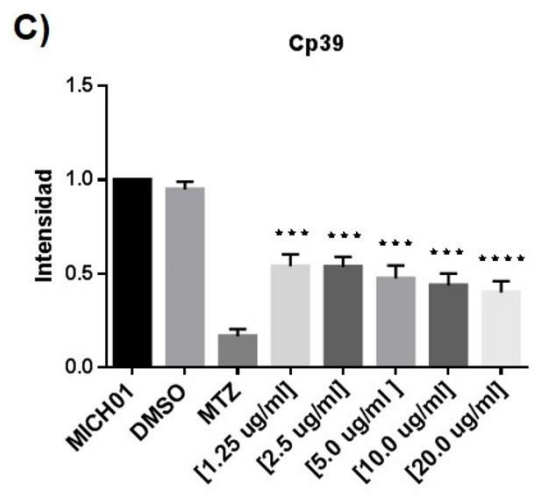
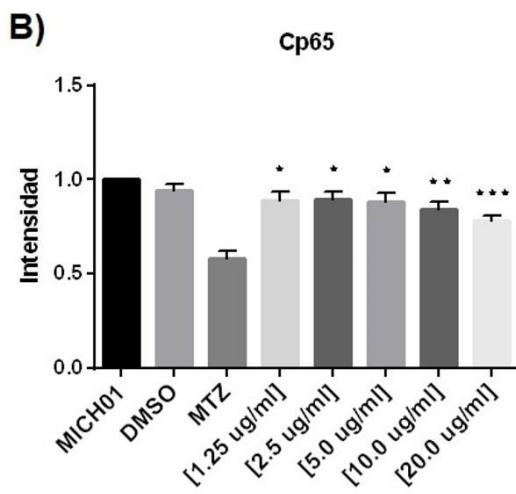
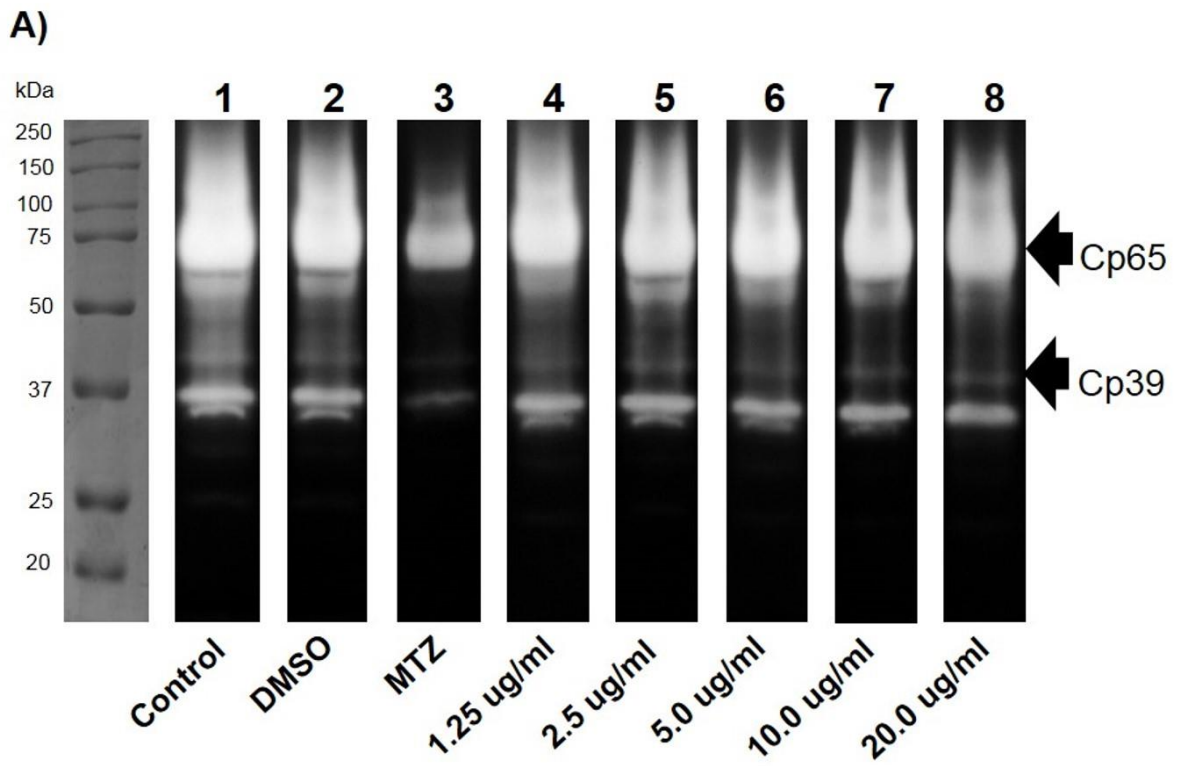
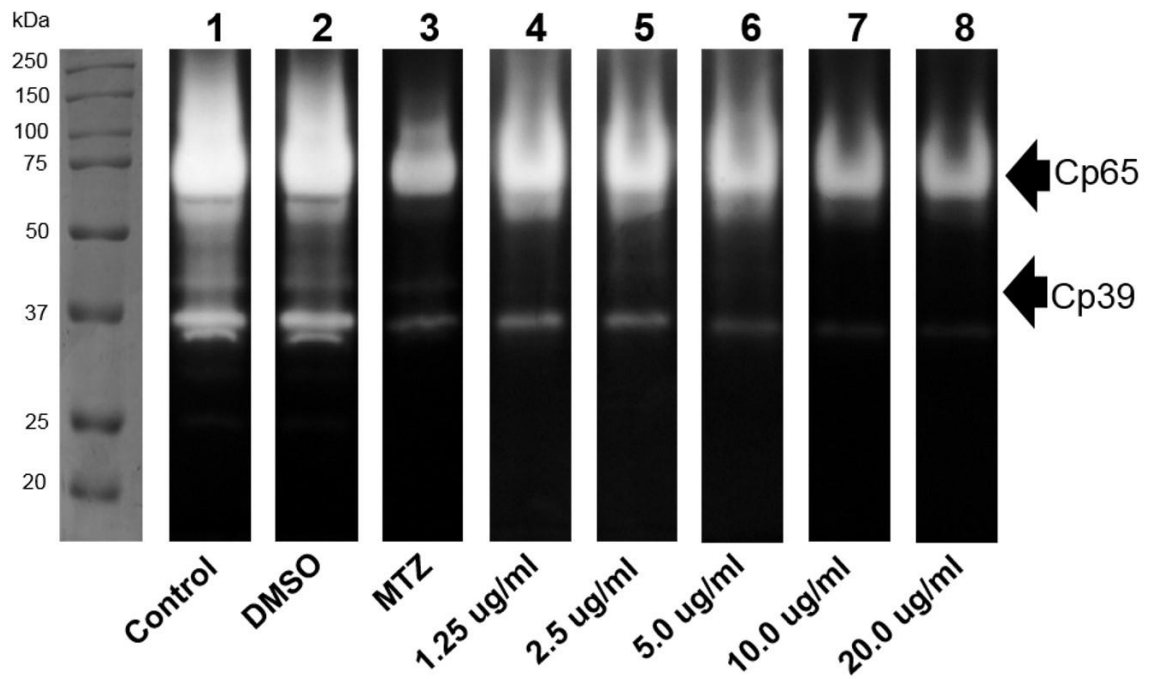
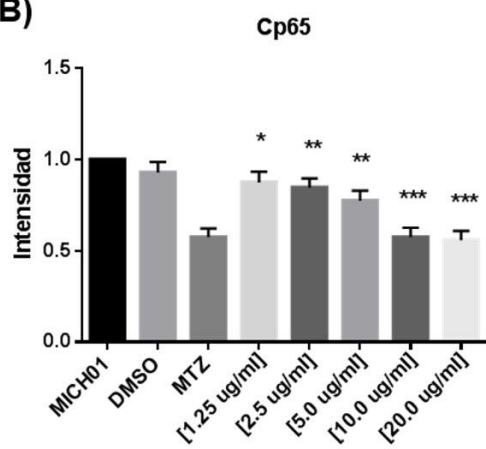


Figura 10. Efecto del tratamiento con el compuesto A7.11.11 sobre la actividad proteolítica de CP65 y CP39. (A) Zimograma que detecta la actividad proteolítica de lisados de parásitos tratados con el compuesto orgánico A7.11.11 obtenidos después del ensayo de unión celular. Carril 1. Control. Carril 2. DMSO. Carril 3. Metronidazol. Carril 4. [1.25 µg/mL]. Carril 5. [2.5 µg/mL]. Carril 6. [5 µg/mL]. Carril 7. [10 µg/mL]. Carril 8. [20 µg/mL]. Las puntas de flecha muestran la posición de las dos regiones de actividad de proteolítica donde se encuentran las CP involucradas en la citotoxicidad (CP65 y CP39). (B, C) Análisis densitométrico de la actividad proteolítica de CP65 y CP39 de lisados de parásitos que contienen proteasas totales. Usando el Programa My Imagine Analisis (Thermo-Fisher). Los datos fueron expresados como promedio ± SEM (Error estándar de la media) *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001. Estos experimentos se realizaron al menos tres veces con resultados similares.

A)



B)



C)

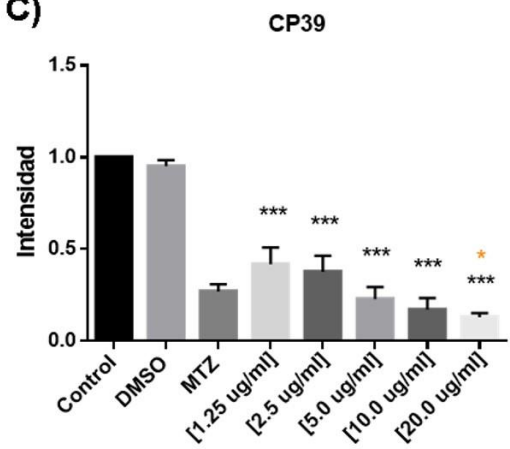


Figura 11. Efecto del tratamiento con el compuesto A7.11.9 sobre la actividad proteolítica de CP65 y CP39. (A) Zimograma que detecta la actividad proteolítica de lisados de parásitos tratados con el compuesto orgánico A7.11.9 obtenidos después del ensayo de unión celular. Carril 1. Control. Carril 2. DMSO. Carril 3. Metronidazol. Carril 4. [1.25 µg/mL]. Carril 5. [2.5 µg/mL]. Carril 6. [5 µg/mL]. Carril 7. [10 µg/mL]. Carril 8. [20 µg/mL]. Las puntas de flecha muestran la posición de las dos regiones de actividad de proteolítica donde se encuentran las CP involucradas en la citotoxicidad (CP65 y CP39). (B, C) Análisis densitométrico de la actividad proteolítica de CP65 y CP39 de lisados de parásitos que contienen proteasas totales. Usando el Programa My Imagine Analisis (Thermo-Fisher). Los datos fueron expresados como promedio ± SEM (Error estándar de la media) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$. Estos experimentos se realizaron al menos tres veces con resultados similares.

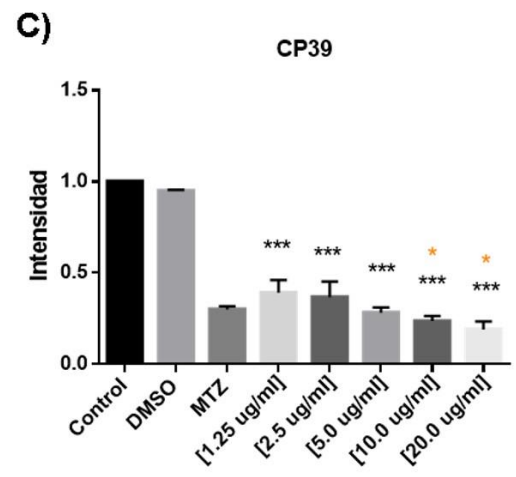
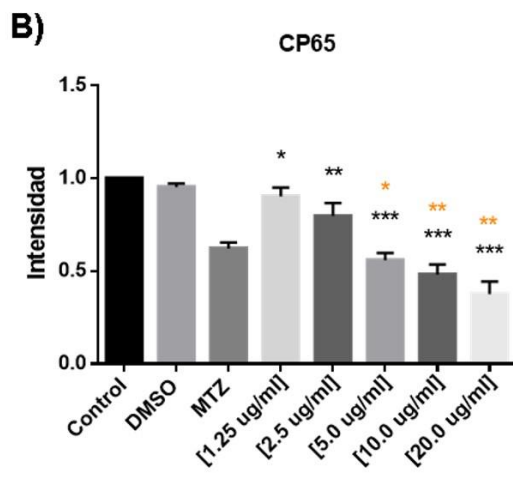
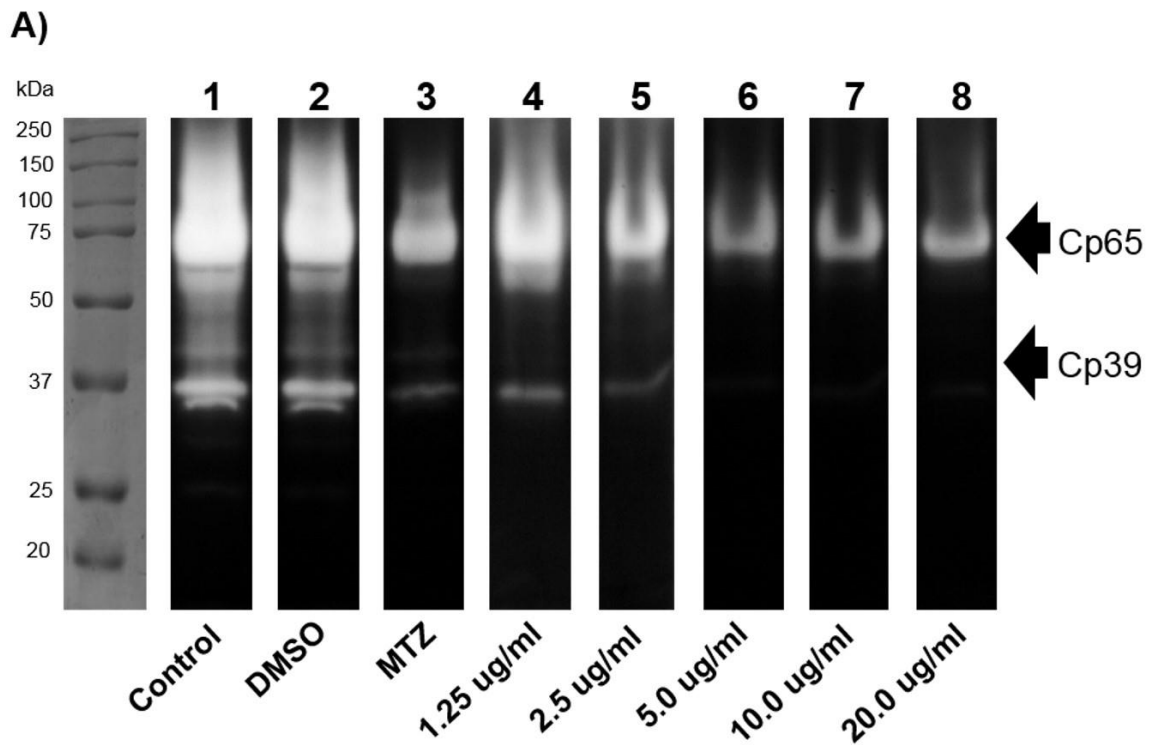


Figura 12. Efecto del tratamiento con el compuesto A7.4.5+SPE-2 sobre la actividad proteolítica de CP65 y CP39. (A) Zimograma que detecta la actividad proteolítica de lisados de parásitos tratados con el compuesto orgánico A.7.4.5+SPE-2 obtenidos después del ensayo de unión celular. Carril 1. Control. Carril 2. DMSO. Carril 3. Metronidazol. Carril 4. [1.25 µg/mL]. Carril 5. [2.5 µg/mL]. Carril 6. [5 µg/mL]. Carril 7. [10 µg/mL]. Carril 8. [20 µg/mL]. Las puntas de flecha muestran la posición de las dos regiones de actividad de proteolítica donde se encuentran las CP involucradas en la citotoxicidad (CP65 y CP39). (B, C) Análisis densitométrico de la actividad proteolítica de CP65 y CP39 de lisados de parásitos que contienen proteasas totales. Usando el Programa My Image Analysis (Thermo-Fisher). Los datos fueron expresados como promedio \pm SEM (Error estándar de la media) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$. Estos experimentos se realizaron al menos tres veces con resultados similares.

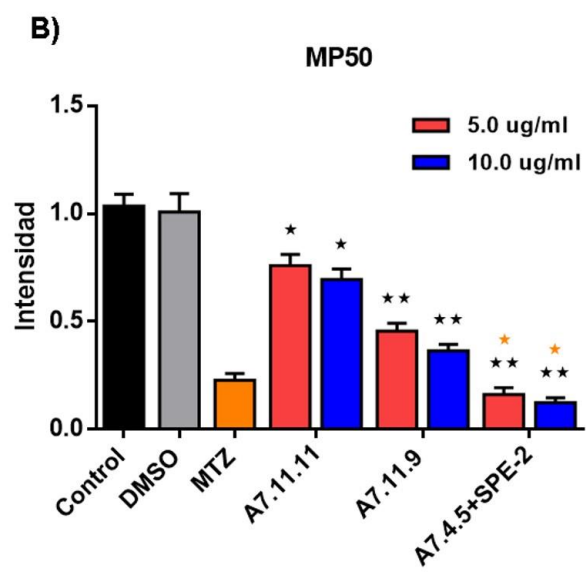
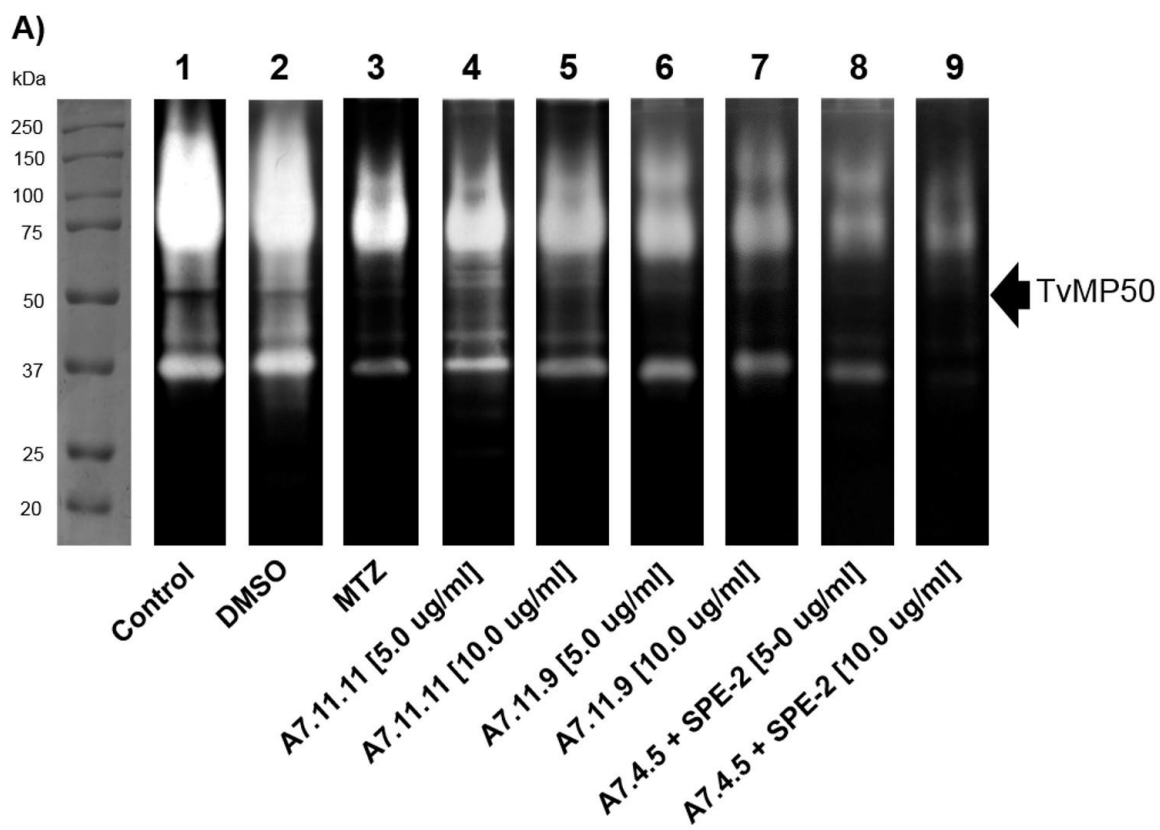


Figura 13. Efecto del tratamiento con los tres compuestos sobre la actividad proteolítica de mp50. (A) Zimogramas de proteasas totales de lisados de parásitos tratados con los tres compuestos orgánicos a concentraciones de 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$. Carril 1. Control. Carril 2. DMSO. Carril 3. Metronidazol. Carril 4. A7.11.11 [5 $\mu\text{g/mL}$]. Carril 5. A7.11.11 [10 $\mu\text{g/mL}$]. Carril 6. A7.11.9 [5 $\mu\text{g/mL}$]. Carril 7. A7.11.9 [10 $\mu\text{g/mL}$]. Carril 8. A7.4.5+SPE-2 [5 $\mu\text{g/mL}$]. Carril 9. A7.4.5+SPE-2 [10 $\mu\text{g/mL}$]. La punta de flecha muestra la posición de la región de actividad de proteolítica de mp50. (B) Análisis densitométrico de la actividad proteolítica de mp50 de lisados de parásitos que contienen proteasas totales. Usando el Programa My Imagine Analysis (Thermo-Fisher). Los datos fueron expresados como promedio \pm SEM (Error estándar de la media) ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Estos experimentos se realizaron al menos tres veces con resultados similares.

7.3 Influencia de las concentraciones de tratamiento con los compuestos A7.11.11, A7.11.9 y A4.4.5+SPE-2 en la citotoxicidad de *Trichomonas vaginalis* sobre monocapas de células HeLa

Posteriormente, se analizó el efecto del tratamiento con los compuestos A7.11.11, A7.11.9 y A4.4.5+SPE-2 sobre la citotoxicidad de *T. vaginalis*, se cultivó el aislado de MICH01 en medio y con el tratamiento con los compuestos A7.11.11, A7.11.9 y A4.4.5+SPE-2 a concentración de 5 y 10 µg/mL, que fueron las que presentaron una mejor actividad proteolítica, descartando la de 20 µg/mL ya que los parásitos iban a estar muertos. Primeramente, evaluamos si los compuestos orgánicos causan daño citotóxico a las células HeLa mediante un ensayo de viabilidad celular por MTT. Los datos no mostraron cambios significativos en la viabilidad celular de las células HeLa tratadas con los tres diferentes compuestos orgánicos durante 40 min (Figura 14).

Posteriormente, se realizó una cinética de crecimiento y los niveles de destrucción celular por el parásito, se evaluaron después de la exposición a los 20 y 40 min sobre monocapas de células HeLa. Los experimentos de citotoxicidad a los 20 min mostraron que los parásitos cultivados con el compuesto A7.11.11 a concentración de 5 y 10 µg/mL exhibían niveles bajos de citotoxicidad (38 % y 35%, respectivamente), el compuesto A.11.9 niveles bajos de citotoxicidad del 20 y 19 % a concentración de 5 y 10 µg/mL, respectivamente. Interesantemente el compuesto A4.4.5+SPE-2 mostró los niveles más bajos de citotoxicidad del 20 % a concentración de 5 µg/mL, mientras que para la concentración 10 µg/mL se redujo hasta un 5 %, en comparación con los parásitos cultivados con metronidazol (8%) o los controles MICH y DMSO (40 %) (Figura 15 A). Por otra parte, los experimentos de citotoxicidad a los 40 min se comportaron de manera similar que, a los 20 min los parásitos cultivados con el compuesto A7.11.11 a concentración de 5 y 10 µg/mL exhibían niveles de citotoxicidad del 50 % y 40%, respectivamente; el compuesto A.11.9 mostró de igual manera niveles bajos de citotoxicidad del 49 y 39 % a las concentraciones de 5 y 10 µg/mL, respectivamente. Interesantemente el compuesto A4.4.5+SPE-2 mostró niveles de citotoxicidad del 30 % a concentración de 5 y 10 µg/mL, en comparación con los parásitos cultivados con metronidazol (40%) o los controles MICH y DMSO (55 %) (Figura 15 B).

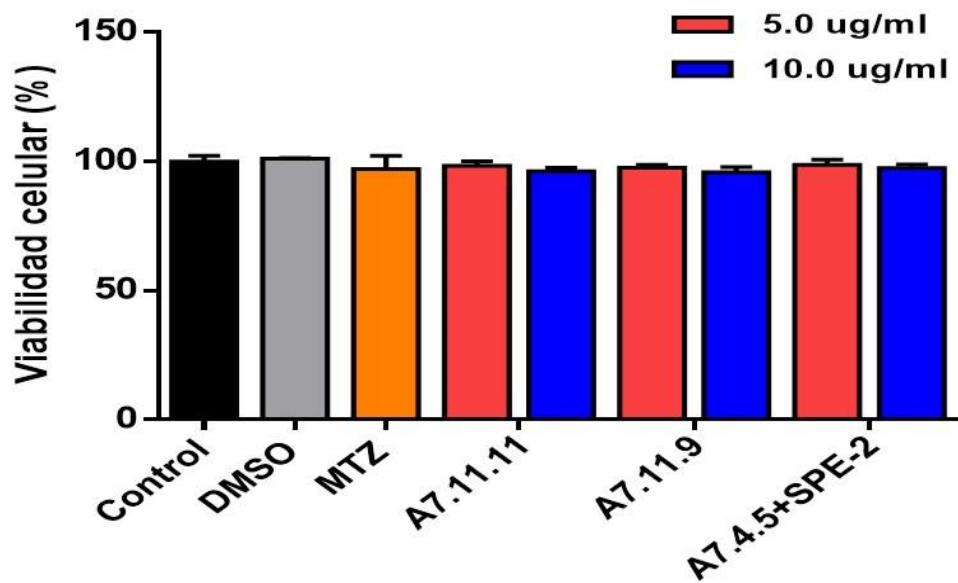


Figura 14. Efecto del tratamiento con los compuestos A7.11.11, A7.11.9 y A4.4.5+SPE-2 en las células HeLa. Ensayo de viabilidad celular de las células HeLa tratadas con los compuestos orgánicos A7.11.11, A7.11.9 y A4.4.5+SPE-2 a concentraciones de 5 y 10 µg/mL durante 40 min.

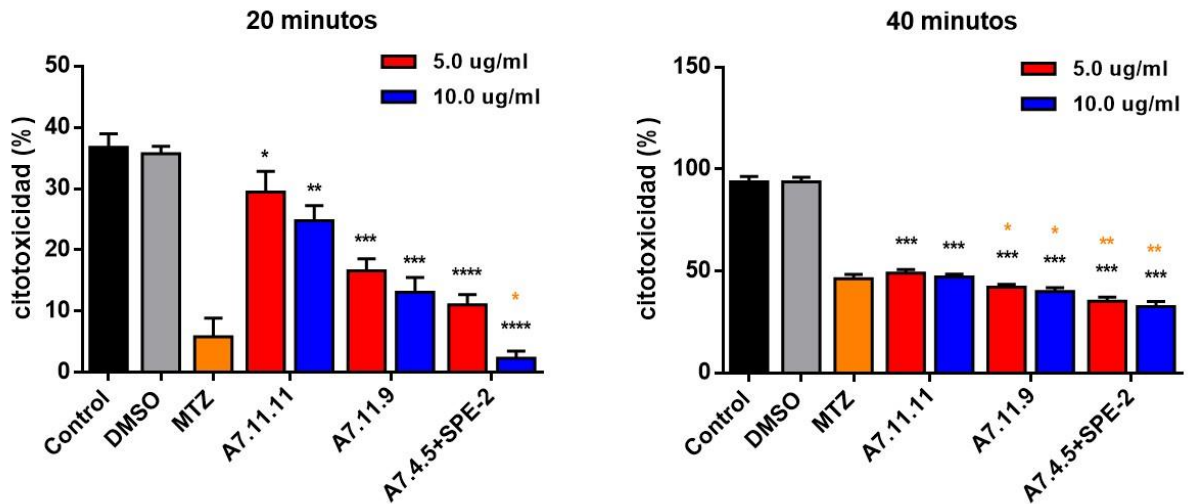


Figura 15. Efecto del tratamiento con los compuestos A7.11.11, A7.11.9 y A4.4.5+SPE-2 en los niveles de citotoxicidad de *T. vaginalis* aislado MICH01. Los ensayos de citotoxicidad fueron realizados por el método colorimétrico de monocapas de células HeLa, se cultivaron en placas de 96 pocillos con *T. vaginalis* (2×10^5) cultivadas en medio normal, con DMSO, metronidazol, los tres compuestos: A7.11.11, A7.11.9 y A4.4.5+SPE-2, a concentraciones de 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, para su interacción A) Porcentaje de citotoxicidad a los 20 min y B) 40 min. Se muestran barras de error estándar. Los experimentos fueron realizados por triplicado con resultados similares.

7.4 Las concentraciones 5 y 10 µg/mL de los tratamientos con los compuestos A7.11.11, A7.11.9 y A4.4.5+SPE-2 reducen la expresión de *tvcp39*, *tvcp65* y *mp50*.

Posteriormente se investigó si las diferencias observadas en los zimogramas en parásitos cultivados con los tres diferentes compuestos (A7.11.11, A7.11.9 y A4.4.5+SPE-2) a concentraciones 5 y 10 µg/mL se debe al efecto de los compuestos sobre la actividad proteolítica de CP39, CP65 y TvMP50 y/o al nivel de expresión de los genes *tvcp39*, *tvcp65* y *tvmp50*. Se realizaron ensayos de RT-PCR utilizando ADNc de parásitos cultivados en medios con los tres diferentes compuestos a concentraciones 5 y 10 µg/mL, normales, con DMSO y metronidazol; usando cebadores específicos para *tvcp39* (Hernández-Gutiérrez y cols., 2003), *tvcp65* (Solano-González y cols., 2006) y *mp50* (Quintas-Granados y cols., 2013) (Figura 16).

En la figura 14A, se observa que hay una menor cantidad del amplicón de 270 pb correspondiente a la cantidad de transcrito de *tvcp39*, después del tratamiento con el compuesto A7.4.5+SPE-2 a concentraciones 5 y 10 µg/mL, comparado con los controles (sin tratar y DMSO). Los parásitos tratados con el compuesto A7.11.9 a la concentración de 10 µg/mL se observa una expresión similar a los parásitos tratados con metronidazol. Sin embargo, para el tratamiento con el compuesto A7.11.11 no se observa una gran diferencia de la expresión de *tvcp39* comparado con los controles. Por otro lado, también se analizó la cantidad de transcrito para *tvcp65* después del tratamiento con los tres diferentes compuestos. La cantidad de expresión del transcrito de *tvcp65* fue la más baja después del tratamiento con metronidazol y el compuesto A7.4.5+SPE-2 a una concentración de 10 µg/mL (Figura 16B). Se analizó la cantidad de transcrito de *mp50* después del tratamiento con los tres diferentes compuestos. La expresión de *tvmp50* fue la más baja después del tratamiento con metronidazol y el compuesto A7.4.5+SPE-2 a concentraciones de 5 y 10 µg/mL; y más alta en condiciones sin tratamiento y DMSO (Figura 16C). El amplicón de 112 pb del transcrito de *β-tubulina*, usado como control de carga, mostró una expresión similar en todas las condiciones (Figura 16D). El análisis densitométrico de los productos de RT-PCR ilustra estas diferencias (Figura 16E, F y G). Estos datos muestran que el tratamiento con los compuestos A7.11.9 y A7.4.5+SPE-2 reducen la expresión del transcrito de *tvcp39*, *tvcp65* y *mp50* probablemente debido a cambios en su estabilidad.

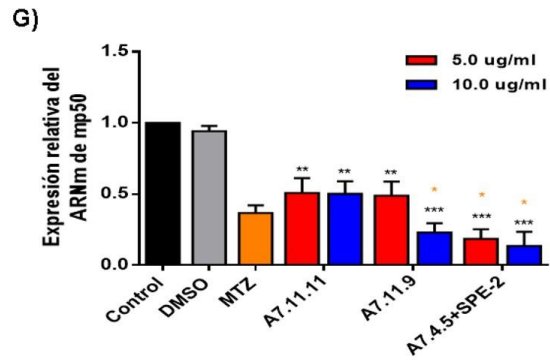
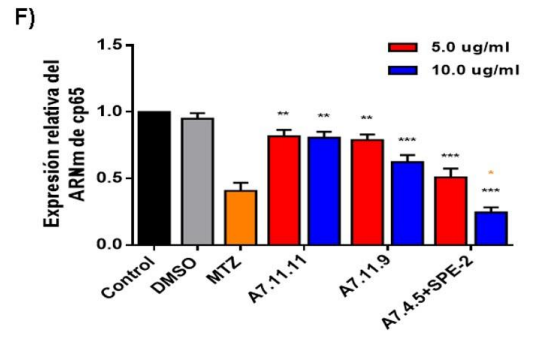
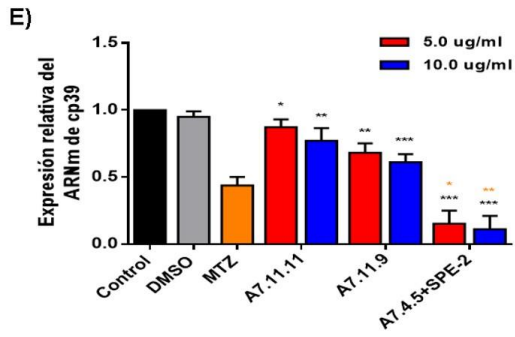
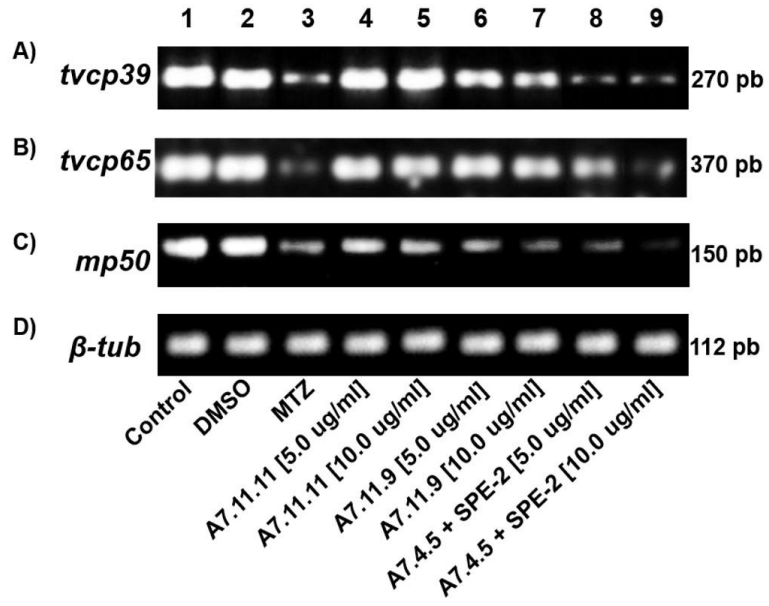


Figura 16. Cambios en la expresión de *tvcp39*, *tvcp65* y *mp50* después del tratamiento con los compuestos A7.11.11, A7.11.9 y A7.4.5+SPE-2. Análisis semicuantitativo de RT-PCR para detectar los transcritos *tvcp39*, *tvcp65* y *mp50* separado en electroforesis en geles de agarosa al 1.5% usando ARN total de los parásitos tratados con las diferentes condiciones. Carril 1. Control, no tratado. Carril 2. DMSO. Carril 3. metronidazol. Carril 4. Tratamiento con el compuesto A7.11.11 [5 µg/mL]. Carril 5. Tratamiento con el compuesto A7.11.11 [10 µg/mL]. Carril 6. Tratamiento con el compuesto A7.11.9 [5 µg/mL]. Carril 7. Tratamiento con el compuesto A7.11.9 [10 µg/mL]. Carril 8. Tratamiento con el compuesto A7.4.5+SPE-2 [5 µg/mL]. Carril 9. Tratamiento con el compuesto A7.4.5+SPE-2 [10 µg/mL]. (A) Producto de la RT-PCR de 270 pb correspondiente al transcrito de *tvcp39*. (B) Producto de la RT-PCR de 370 pb correspondiente al transcrito de *tvcp65*. (C) Producto de la RT-PCR de 150 pb correspondiente al transcrito de *mp50*. (D) Producto de la RT-PCR de 112 pb correspondiente al transcrito de *β-tubulina*, a partir de los mismos parásitos descritos anteriormente, usado como control interno de carga y especificidad (E-G) Análisis densitométrico de los productos de RT-PCR utilizando el Programa MyImage (Thermo-Fisher). Los valores de intensidad del amplicón *tvcp39*, *tvcp65* y *mp50*. Los valores fueron normalizados con *β-tubulina*. Los datos fueron expresados como promedio ± SEM (Error estándar de la media) *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001. Estos experimentos fueron realizados por triplicado con resultados similares.

VIII. DISCUSIÓN

La tricomoniasis es una de las enfermedades de transmisión sexual más comunes en los humanos. Los medicamentos con 5-nitroimidazol son los más usados para combatir esta infección, siendo el metronidazol el medicamento por elección (Cudmore y cols., 2004). Se considera que el metronidazol es el fármaco más rentable, porque es económico y generalmente eficaz para eliminar la infección por *T. vaginalis* (Sutcliffe y cols., 2012). Sin embargo, la resistencia al metronidazol se ha incrementado (Sutcliffe y cols., 2012; Schwebke y cols., 2006). Es por ello, que el estudio de nuevas opciones terapéuticas contra la tricomoniasis es de suma importancia.

A lo largo del tiempo el uso de hierbas medicinales para tratar enfermedades ha ido en aumento, se conoce que alrededor de 20,000 plantas se usan para este propósito (Mehriardestani y cols., 2017). Muchos medicamentos conocidos y efectivos tienen origen vegetal. Por ejemplo, la quinina, un medicamento contra la malaria, se proporciona a partir de la corteza de la Chinchona (Moinet y cols., 1878). Además, el uso de las plantas medicinales para tratar enfermedades parasitarias ha ido en aumento, como la giardiasis, amibiasis y tricomoniasis. Mena-Rejón y colaboradores demostraron que el uso de antraquinona crisofanol extracto derivado de *Senna racemosa*, tuvo una actividad anti-parasitaria a una concentración letal 50 (CI50) de 2.10 µg/mL para *Giardia intestinalis* y 3.87 µg/mL para *Entamoeba histolytica* (Mena-Rejón y cols., 2007). Por otro lado, existen diversos estudios sobre el uso de plantas medicinales para la eliminación de *T. vaginalis*. Algunas de las plantas más utilizadas para contrarrestar la infección por *T. vaginalis* son: *Zataria multiflora*, Simbar y colaboradores encontraron que su aceite esencial contiene una gran cantidad de timol y carvacrol, ambos antimicrobianos y antifúngicos (Simbar y cols., 2008), *Eucalyptus*; el eucalipto contiene diferentes compuestos como terpenoides y fenólicos, que juega un papel importante en su actividad anti-tricomonicida. Mahdi y colaboradores demostraron que el extracto de Eucaliptus causó la muerte del parásito a un pH de 5.3. (Hassani y cols., 2013; Mahdi y cols., 2006). Estudios previos han demostrado que la antraquinona emodina obtenida a partir de extractos de la planta *Rheum palmatum* (Polygonaceae); una planta medicinal utilizada ampliamente en china, a

una concentración de 10µg/mL es letal para *T. hominis* (Wang y cols., 1993). Sin embargo, hasta el momento solo existe un estudio de antraquinonas relacionadas con *T. vaginalis*; en el cual demuestran que la emodina posee una actividad anti-tricomonicida a través de la formación de radicales libres generando daño al ADN. En este trabajo se analiza el efecto de tres compuestos orgánicos elaborados a partir de antraquinonas, uno de los principios activos de algunas plantas.

Primeramente, se demostró que el tratamiento con los compuestos orgánicos derivados de antraquinonas A7.11.11, A7.11.9 y A7.4.5+SPE-2 inhibe significativamente el crecimiento de *T. vaginalis*. Siendo el compuesto A7.4.5+SPE-2 el que muestra una actividad más eficaz a la producida por el medicamento de referencia metronidazol.

En los estudios *in vitro* usamos concentraciones de los compuestos orgánicos derivados de antraquinonas A7.11.11, A7.11.9 y A7.4.5+SPE-2 en un rango de 1.25 a 20 µg/mL para establecer la eficacia de este compuesto contra la tricomoniasis. En los estudios previamente mencionados, donde analizaron la actividad anti-tricomonicida *in vitro* de los extractos de plantas como, *Zataria multiflora*, *Eucalyptus*, *Lavandulifolia* *Stachys* y *Rheum palmatum* mostraron una buena actividad anti-tricomonicida, a una concentración letal 50 (Cl₅₀) entre 5,6 y 8,0 g/mL (Arthan D y cols., 2008; Cantillo-Ciau Z y cols., 2010; Frasson AP y cols., 2012). Interesantemente, en este estudio obtuvimos valores más bajos para los compuestos orgánicos A7.11.9 y A7.4.5+SPE-2 de 2.57 y 1.32 mg/mL, respectivamente; incluso más bajos de los obtenidos para el metronidazol.

La acción del compuesto orgánico A7.4.5+SPE-2 es similar a la del metronidazol, el fármaco de elección contra la tricomoniasis (Fakhrieh y cols., 2017). Los datos obtenidos estuvieron de acuerdo con reportes previos donde se demuestra que los derivados de las antraquinonas como la emodina funcionan como un agente eficaz para tratar la tricomoniasis (Wang y cols., 1993). El ensayo de viabilidad (Tabla 5) ha demostrado que el compuesto A7.4.5+SPE-2 tiene una actividad anti-tricomonicida a concentraciones de 5 y 10 µg/mL más efectivo que el metronidazol.

La patogénesis de *T. vaginalis* es un proceso multifactorial que involucra eventos tales como la citotoxicidad (Figuroa-Angulo y cols., 2012). La citotoxicidad es una

propiedad clave para la infección por *T. vaginalis* y está mediada principalmente por moléculas implicadas en el daño celular, como las CP's (CP39 y CP65) ubicadas en la superficie de *T. vaginalis* (Figueroa-Angulo y cols., 2012). Nuestros datos muestran una disminución en la actividad proteolítica de CP65 y CP39 un efecto directo de los compuestos orgánicos A7.11.9 y A7.4.5+SPE-2 sobre la cantidad de los transcritos *tvcp65* y *tvcp39* y de las proteínas CP65 y CP39.

Se demostró que los compuestos orgánicos A7.11.9 y A7.4.5+SPE-2 regulan negativamente los niveles de citotoxicidad de *T. vaginalis*. Particularmente, se demostró que las concentraciones 5 y 10 µg/mL de los compuestos orgánicos regulan negativamente la expresión y la actividad proteolítica de CP65 y CP39, lo que conlleva a una reducción en la citotoxicidad dependiente de estas cisteín proteasas. Estudios previos, han demostrado, que el microambiente juega un papel muy importante en la patogenicidad de *T. vaginalis* el hierro tiene un efecto tricomonocida, regulando negativamente la expresión y la actividad proteolítica de CP65 y CP39 (Hernández-Gutiérrez y cols., 2003; Álvarez-Sánchez y cols., 2007). Estos datos son consistentes con el efecto negativo observado en nuestros compuestos orgánicos.

Vale la pena mencionar que las mismas concentraciones de los compuestos orgánicos A7.11.9 y A7.4.5+SPE-2 son capaces de disminuir la expresión génica de algunas cisteín proteasas como CP39 y CP65, afectando directamente las propiedades de patogenicidad como la citotoxicidad (Figueroa-Angulo y cols., 2012). La reducción del ARNm de CP65 y CP39 podría deberse a una alteración en su velocidad de transcripción o a una modulación a nivel postranscripcional, incluso puede ser un efecto indirecto al alterar la expresión de co-reguladores de estas proteínas (Alvarez-Sánchez y cols., 2008).

La citotoxicidad después de la interacción de *T. vaginalis* con monocapas de células HeLa dio como resultado la pérdida de la monocapa, después de 40 min de interacción, por lo que, la citotoxicidad está implicada en mecanismos dependientes de contacto. Nuestros resultados son consistentes con los reportados previamente, donde demuestran que al interaccionar *T. vaginalis* con monocapas de células HeLa hay una degradación de esta. Sin embargo, Alderete y colaboradores también demostraron que al realizar la interacción con *T. foetus*, produjo la mitad de daño celular que *T. vaginalis*.

Mientras que, *T. tenax*, un miembro no patógeno de la flora normal de la cavidad oral en el hombre, no produjo citotoxicidad en las monocapas de células HeLa (Alderete y cols., 1984). Por otra parte, cuando la interacción se realizó con los parásitos cultivados con los tres diferentes compuestos orgánicos, hubo un mantenimiento de las monocapas de las células HeLa a concentraciones de 5 y 10 µg/mL.

Se ha demostrado que las metaloproteasas participan como factores de virulencia de *T. vaginalis* implicado en el daño celular de células prostáticas (Quintas-Granados y cols., 2003). La proteína TvMP50 es una metaloproteasa inmunogénica, y en cultivos ricos en hierro promueven su actividad proteolítica. Además, se ha descrito que la proteína TvMP50 se encuentra sobre-expresada en aislados masculinos de *T. vaginalis* (Puente-Rivera y cols., 2017). Nosotros encontramos que los compuestos orgánicos A7.11.9 y A7.4.5+SPE-2 son capaces de disminuir la expresión génica de mp50, por lo que, nuestros datos sugieren que los compuestos orgánicos A7.11.11, A7.11.9 y A7.4.5+SPE-2 son capaces combatir la infección de *T. vaginalis* al regular negativamente las propiedades de patogenicidad como la citotoxicidad y evasión de la respuesta inmune.

Los resultados sugieren que los compuestos orgánicos A7.11.11, A7.11.9 y A7.4.5+SPE-2 poseen la capacidad de inhibir la acción patogénica de *T. vaginalis* a través de la disminución en la actividad proteolítica de CP39, CP65 y/o al nivel de expresión de los genes *tvcp39*, *tvcp65* y *mp50*.

IX. CONCLUSIONES

Los compuestos orgánicos de mediana y alta actividad disminuyen la actividad proteolítica, el efecto citotóxico de los parásitos hacia las células blanco, así como la disminución de la expresión de tvcp39, tvcp65 y mp50, con respecto al control y metronidazol.

En conjunto nuestros hallazgos resaltan la importancia de los compuestos orgánicos y sugieren una nueva estrategia prometedora para el tratamiento contra la tricomoniasis.

X. REFERENCIAS

1. Alderete JF (1984). Pathogenic *Trichomonas vaginalis* cytotoxicity to cell culture monolayers. *Br J Vener Dis.* 60, 99-105.
2. Alderete JF (2001). Enzymes on microbial pathogens and *Trichomonas vaginalis*: molecular mimicry and functional diversity. *Cell Microbiol.* Jun. 6, 359-370.
3. Ali V (2007). Current therapeutics, their problems, and sulfur-containing-amino-acid metabolism as a novel target against infections by “amitochondriate” protozoan parasites. *Clinical microbiology reviews.* 1, 164-187.
4. Alvarez-Sánchez ME (2000). A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity. *Microb Pathog.* 4, 193-202.
5. Alvarez-Sánchez ME (2007). Negative iron regulation of the CP65 cysteine proteinase cytotoxicity in *Trichomonas vaginalis*. *Microbes Infect.* (14-15), 1597-1605.
6. Alvarez-Sánchez ME (2008). Polyamine depletion down-regulates expression of the *Trichomonas vaginalis* cytotoxic CP65, a 65-kDa cysteine proteinase involved in cellular damage. *Int J Biochem Cell Biol.* 11, 2442-2451.
7. Arroyo R (2015). *Trichomonas vaginalis* Cysteine Proteinases: Iron Response in Gene Expression and Proteolytic Activity. *Biomed Res.* 946787.
8. Arthan D (2008). Inhibitory effects of Thai plants betaglycosides on *Trichomonas vaginalis*. *Parasitol. Res.* 103, 443–448.
9. Bachmann LH (2011). *Trichomonas vaginalis* genital infections: progress and challenges. *Clin Infect Dis* 53, S160 –S172.
10. Bahmani M (2014). The most common herbal medicines affecting *Sarcomastigophora* branches: a review study. *Asian Pac J Trop Med.* 7S1, S14-21.
11. Bhesania AH (2016). Trichomoniasis—a review. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* 5, 731–741.
12. Bouchemal K (2017). Strategies for Prevention and Treatment of *Trichomonas vaginalis* Infections. *Clin Microbiol Rev.* 3,811-825.

13. Bruins MJ (2013). Respiratory disease and *Trichomonas vaginalis* in premature newborn twins. *Pediatr Infect Dis J.* 32, 1029–1030.
14. Cantillo-Ciau Z (2010). The tropical brown alga *Lobophora variegata*: a source of antiprotozoal compounds. *Mar. Drugs* 8, 1292–1304.
15. Carlton JM (2007). Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science.* 5809, 207–212.
16. Carrada-Bravo T. (2006). Tricomoniasis vaginal. *Rev Mex Patol Clin*, 3,151-156.
17. Cherpes TL (2006). The associations between pelvic inflammatory disease, *Trichomonas vaginalis* infection, and positive herpes simplex virus type 2 serology. *Sex Transm Dis.* 33, 747–752.
18. Cudmore SL (2004). Treatment of infections caused by metronidazole-resistance *Trichomonas vaginalis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 783–793.
19. E. Solano-González (2006). Location of the cell-binding domain of CP65, a 65 kDa cysteine proteinase involved in *Trichomonas vaginalis* cytotoxicity, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38 2114e2127.
20. Edmondson MA (2017). *Tritrichomonas foetus* vaccine on clearance of the organism and subsequent fertility of heifers following experimental inoculation. *Theriogenology* 90, 245–251.
21. Edwards T (2016). *Trichomonas vaginalis*: Clinical relevance, pathogenicity and diagnosis. *Crit Rev Microbiol.* 3, 406-417.
22. Fakhrieh Kashan Z (2017). Therapeutic effects of Iranian herbal extracts against *Trichomonas vaginalis*. *Iran Biomed J.* 5, 285-293.
23. Field N (2016). *Trichomonas vaginalis* infection is uncommon in the British general population: implications for clinical testing and public health screening. *Sex Transm Infect.* 052660.
24. Figueroa-Angulo EE (2012). The effects of environmental factors on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. *Microbes Infect.* Dec; 15,1411-1427.
25. Frasson AP (2012). First report of anti-*Trichomonas vaginalis* activity of the medicinal plant *Polygala decumbens* from the Brazilian semi-arid region, Caatinga. *Parasitol. Res.* 110:2581–2587.
26. Glehn MP (2017). Prevalence of *Trichomonas vaginalis* in women of reproductive age at a family health clinic. *J Infect Dev Ctries.* 3,269-276.

27. Gregson S (2001). A rural HIV epidemic in Zimbabwe? Findings from a population-based survey. *Int J STD AIDS*. 3,189–96.
28. Harp DF (2011). Trichomoniasis: evaluation to execution. *European journal of obstetrics and gynecology and reproductive biology*; 1, 3-9.
29. Hassani (2013). Effects of different extracts of *Eucalyptus camaldulensis* on *Trichomonas vaginalis* parasite in culture medium. *Adv Biomed Res*. 2, 47.
30. Hernández HM (2014). Biological roles of cysteine proteinases in the pathogenesis of *Trichomonas vaginalis*. *Parasite*. 21, 54.
31. Hernández-Gutiérrez R (2003). A 39-kDa cysteine proteinase CP39 from *Trichomonas vaginalis*, which is negatively affected by iron may be involved in trichomonal cytotoxicity. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 50, 696–698.
32. Hernández-Gutiérrez R (2004). *Trichomonas vaginalis*: characterization of a 39-kDa cysteine proteinase found in patient vaginal secretions. *Exp Parasitol*. 107, 125–135.
33. Hirt RP (2015). *Trichomonas vaginalis* origins, molecular pathobiology and clinical considerations. *Curr Opin Infect Dis*. 1, 72-79.
34. Hrdy I (2004). *Trichomonas* hydrogenosomes contain the NADH dehydrogenase module of mitochondrial complex I. *Nature*. 15577909.
35. Huppert JS (2005). Use of an immunochromatographic assay for rapid detection of *Trichomonas vaginalis* in vaginal specimens. *J Clin Microbiol*. 2, 684-687.
36. Imam NFA (2007). Antibody isotypes in urethral swabs of symptomatic and asymptomatic men infected with *Trichomonas vaginalis*. *J Egypt Soc Parasitol*. 3, 977–988.
37. Kissinger P (2015). *Trichomonas vaginalis*: a review of epidemiologic, clinical and treatment issues. *BMC Infect Dis*. 15,307.
38. Klinger EV (2006). A Community-based study of risk factors for *Trichomonas vaginalis* infection among women and their male partners in Moshi urban district, northern Tanzania. *Sex Transm Dis*. 12,712–8.
39. Kraiden S (1986). Persistent *Trichomonas vaginalis* infection due to a metronidazole-resistant strain. *CAMJ*; 134, 1.373-1.374.
40. Kulda J (1999). Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. *Int J Parasitol*. 29, 199-212.

41. Lama A (2009). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a surface-associated, fibronectin-binding protein of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* 77, 2703–2711.
42. Mason PR (2001). Enzyme immunoassay for urogenital trichomoniasis as a marker of unsafe sexual behaviour. *Epidemiol Infect.* 1, 103–109.
43. Mehriardestani M (2017). Medicinal plants and their isolated compounds showing anti-*Trichomonas vaginalis*- activity. *Biomed Pharmacother.* 88. 885-893.
44. Mena-Rejon GJ, Quijano L, Cedillo-Rivera R (2007). Antiprotozoal activity of *Senna racemosa*. *J Ethnopharmacol.* 112,415-6.
45. Menezes CB (2016). Trichomoniasis - are we giving the deserved attention to the most common non-viral sexually transmitted disease worldwide? *Microb Cell.* 9, 404-419.
46. Mielczarek E (2016). *Trichomonas vaginalis*: pathogenicity and potential role in human reproductive failure. *Infection.* 4, 447-458.
47. Miller WC (2005). Epidemiology of chlamydial infection, gonorrhea, and trichomoniasis in the United States. *Infect Dis Clin North Am.* 2,281–96
48. Moinet FW (1878). Quinine a Physiological Antidote to the Malarial Poison. *Edinb Med J.* 23, 706-715.
49. Muzny CA (2014). Added benefit of nucleic acid amplification testing for the diagnosis of *Trichomonas vaginalis* among men and women attending a sexually transmitted diseases clinic. *Clin Infect Dis.* 59, 834–841.
50. Narcisi EM (1996). In vitro effect of tinidazole and furazolidone on metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 5, 1121-1125.
51. Ojeda–Luna MC (2004). Tricomoniasis urogenital. *Epidemiología (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica).* 19, 1-3.
52. Oliveira AS (2016). *Trichomonas vaginalis*: An Updated Overview Towards Diagnostic Improvement. *Acta Parasitol.* 1, 10-21.
53. Ondrak JD (2016). *Tritrichomonas foetus* Prevention and Control in Cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2,411-423.

54. Pereira-Neves A (2003). Pseudocysts in trichomonads—new insights. *Protist.* 3-4, 313-329.
55. Pereyre S (2016). *Mycoplasma genitalium* and *Trichomonas vaginalis* in France: a point prevalence study in people screened for sexually transmitted diseases. *Clin Microbiol Infect* 23, 122.
56. Petrin D (1998), Delgaty K, Bhatt R, Garber G. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clin Microbiol.* 2, 300-317.
57. Quintas-Granados LI (2013). TvMP50 is an immunogenic metalloproteinase during male trichomoniasis. *Mol Cell Proteomics.* 7, 1953-1964.
58. Ramón-Luing Lde L (2011). Identification and characterization of the immunogenic cytotoxic TvCP39 proteinase gene of *Trichomonas vaginalis*. *Int J Biochem Cell Biol.* 10, 1500-1511.
59. Ryan CM (2011). Chemical structure of *Trichomonas vaginalis* surface lipoglycan: a role for short galactose (beta1-4/3) N-acetylglucosamine repeats in host cell interaction. *J Biol Chem* 286, 40494–40508.
60. Schwebke JR (2006). Barrientes FJ. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* isolates with resistance to metronidazole and tinidazole. *Antimicrobial agents chemotherapy.* 12, 4209-4210.
61. Seo MY (2014). Inflammatory response of prostate epithelial cells to stimulation by *Trichomonas vaginalis*. 74, 441–449.
62. Simbar M (2008). A comparative study of the therapeutic effects of the *Zataria multiflora* vaginal cream and metronidazole vaginal gel on bacterial vaginosis. *Phytomedicine.* 15, 1025-1031.
63. Sobngwi-Tambekou J (2009). *Chlamydia trachomatis* and *Trichomonas vaginalis*: observations after a randomised controlled trial for HIV prevention. *Sex Transm Infect.* 85, 116 –120.
64. Sutcliffe S (2012). Trichomonosis, a common curable STI, and prostate carcinogenesis--a proposed molecular mechanism. *PLoS Pathog.* 8,1002801.
65. Uribarren Berrueta (2017). TRICHOMONOSIS o TRICHOMONIASIS UROGENITAL o TRICOMONIASIS. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. Revisado 06 de diciembre del 2017.

(<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/tricomoniasis.html>)

66. Van Der Pol B (2016). Clinical and Laboratory Testing for *Trichomonas vaginalis* Infection. *J Clin Microbiol.* 1, 7-12.
67. Weiss HA (2006). Male circumcision and risk of syphilis, chancroid, and genital herpes: a systematic review and meta-analysis. *Sex Transm Infect.* 82, 101–109.
68. WHO. 2012. Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections. (http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75181/1/9789241503839_eng.pdf).
69. World Health Organization (2008). Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections. (http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75181/1/9789241503839_eng.pdf).
70. Youse HA (2012). Effect of *Echinophora platyloba*, *Stachys lavandulifolia*, and *Eucalyptus camaldulensis* plants on *Trichomonas vaginalis* growth in vitro. *Adv Biomed Res.* 1, 79

XI. ANEXOS

TAE 50 X

Reactivos	Concentración	1000 mL
Trizma base	2 M	242.28 gr
Ácido acético	1 M	57.1 gr
EDTA	0.05 M	18.612 gr
H ₂ O		1000 mL

TBE 10 X pH 8

Reactivos	1000 mL
Trizma base	121.1 gr
Ácido Bórico	61.8 gr
EDTA	7.4 gr
H ₂ O	1000 mL

Acrilamida al 30% bisacrilamida al 0.8%

Reactivos	100 mL
Acrilamida	29.2 gr
Bisacrilamida	0.8 gr
H ₂ O	100 mL

Disolver en 40 ml de agua destilada. Una vez disuelto aforar hasta 100 ml. Filtrar a travez de papel filtro "Whatman" No. 1 Almacenar a 4° C hasta un mes, previamente protegido de la luz.

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

Reactivos	1000 mL
Trizma base	18.165 gr
SDS	0.4 gr
H ₂ O	1000 mL

Disolver en 20 ml de agua destilada y ajustar a pH 8.8 con HCl. Aforar a un volumen final de 100 mL con agua destilada. Filtrar la solución almacenar a 4°C

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

Reactivos	100 mL
Trizma base	6.055 gr
SDS	0.4 gr
H ₂ O	100 mL

Disolver en 20 ml de agua destilada y ajustar a pH 8.8 con HCl. Aforar a un volumen final de 100 ml con agua destilada. Filtrar la solución almacenar a 4°C

Persulfato de amonio al 10% (BioRad)

Reactivos	10 mL
Persulfato de amonio	1.0 gr
H ₂ O destilada	10 mL

Amortiguador de muestra 2X (BM 2X)

Reactivos	20 mL
SDS	0.4 gr
Trizma base	0.304 gr
Azul de bromofenol	0.304 gr
B-mercaptoetanol	50 uL
H ₂ O destilada	Aforar 20 mL

Amortiguador de electroforesis 10X (stock)

Reactivos	1000 mL
Glicina	144 gr
Trizma base	30.02 gr
SDS	10 gr
H ₂ O destilada	Aforar 1000 mL

Amortiguador de electroforesis 1x

Reactivos	1000 mL
Amortiguador de electroforesis 10X	100 mL
H ₂ O destilada	Aforar 1000 mL

Solución decolorante de geles de poliacrilamida

Reactivos	1000 mL
Ácido acético glacial	50 mL
Metanol	165 mL
H ₂ O destilada	Aforar 1000 mL

Almacenar a temperatura ambiente

Preparación de Gelatina al 9%

Reactivos	10 mL
Gelatina	0.0324 gr
H ₂ O destilada	Aforar 10 mL

Incubar a 37° C para disolver la gelatina

Gel separador 10%

Reactivos	
Acrilamida 30% Bisacrilamida 0.8%	5 mL
4x Tris-Cl/SDS pH 8.8	3.75 ml
Persulfato de amonio (10%)	50 uL
TEMED	10 uL
H ₂ O destilada	6.25 mL

Para gel de gelatina, sustituir el agua por gelatina.

Gel concentrador

Reactivos	
Acrilamida 30% Bisacrilamida 0.8%	0.650 mL
4x Tris-Cl/SDS pH 6.8	1.25 ml
Persulfato de amonio (10%)	25 uL
TEMED	5 UI
H ₂ O destilada	3.05 mL

Amortiguador de activación de proteasas pH 4.5 3M

Reactivos	1000 mL
Acetato de sodio	13.61 mL
Ácido acético	20 ml
DTT	0.154 gr
H ₂ O destilada	Aforar a 1000 mL

Se disuelve en 500 mL de acetato de sodio, posteriormente se adiciona el ácido acético, se ajusta el pH y se afora a un litro. DTT (hasta usar, B-mercapto etanol)

Triton 2.5%

Reactivos	1000 mL
Triton X-100	25 mL
H ₂ O destilada	975 mL

TDSET

Reactivos	Concentración	500 mL
Tris-HCl pH7.8	1M	5 mL
DOC	10%	10 mL
SDS	20%	2.5 mL
EDTA pH 8	0.05 M	5 mL
Triton-X100		5 mL
H ₂ O		Aforar a 500 mL

Se mezclan los componentes en 100 mL y se afora a 500 mL

Solución colorante R-250

Reactivos	1000 mL
Metanol	500 mL
Azul de comassie	0.500 gr
Ácido acético glacial	100 ml
H ₂ O destilada	400 mL

PBS-EDTA

Reactivos	500 mL
PBS pH 7	500 mL
EDTA	1 gr

Para células, en un frasco de 500 mL agregar 2 viales con 45 mL de medio HeLa, 1 mL de antibiótico y 10 mL de suero bovino fetal.

Medio DMEM pH 7.2 para HeLa (Glucosa Alta)

Reactivos	1000 mL
HEPES	5.96 gr
Bicarbonato de sodio	3.7 gr
DTT	0.154 gr
H ₂ O destilada	Aforar a 1000 mL

Antes de aforar, llevar a 900 mL y ajustar a pH 7.2

Medio TyM pH 6.2

Reactivos	1000 mL
Bacto triptone	20 gr
Extracto de levadura	10 grl
Maltosa	5 gr
Cysteina	1 gr
Ácido ascórbico	0.2 gr
K ₂ HPO ₄	0.8 gr
KH ₂ PO ₄	0.8
H ₂ O destilada	Aforar a 1000 mL

DOC (Deoxicolato) 10%

Reactivos	10 mL
Deoxicolato	1.0 gr
H ₂ O destilada	10 mL

PBS-DOC 1%

Reactivos	10 mL
DOC 10%	1 mL
PBS pH 8	9 mL

Glicina 0.2 M

Reactivos	5 mL
Glicina	0.075 gr
PBS pH 7	5 mL

Amortiguador de muestra 5 X

Reactivos	10 mL
Tris HCl 1 M pH 6.8	0.6 mL
Glicerol	5 mL
SDS 10%	2 mL
2-mercaptoetanol	50 uL
Azul de bromofenol 1%	1 mL
H ₂ O destilada	Aforar 10 mL

Si no se tiene preparado azul de bromofenol pesar 0.1 gr

Amortiguador Fosfato Salino (PBS) 10x, pH. 7.0

Reactivos	1000 mL
NaCl	80 gr
KCl	2 gr
Na ₂ HPO ₄	6.5 gr
KH ₂ PO ₄	2 gr
H ₂ O destilada	Aforar 1000 mL

Mezclar con 900 mL de H₂O destilada y ajustar pH.

Amortiguador Fosfato Salino (PBS) 1x, pH. 7.0

Reactivos	1000 mL
PBS 10X	100 mL
H ₂ O destilada	Aforar 1000 mL

Amortiguador Fosfato Salino (PBS) 10x, pH. 8.0

Reactivos	1000 mL
NaCl	80 gr
KCl	2 gr
Na ₂ HPO ₄	6.5 gr
KH ₂ PO ₄	2 gr
H ₂ O destilada	Aforar 1000 mL

Mezclar con 900 mL de H₂O destilada y ajustar pH.

Amortiguador Fosfato Salino (PBS) 1x, pH. 8.0

Reactivos	1000 mL
PBS 10X	100 mL
H ₂ O destilada	Aforar 1000 mL

Metronidazol

Reactivos	1000 uL
Metronidazol	3.5 uL
H ₂ O	996.5 uL