

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 DE CIENCIAS GENÓMICAS

Identificación de proteínas solubles en ácido
perclórico de *Trichomonas vaginalis*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

P R E S E N T A:

DANIEL AGUSTÍN BRAVATA ALCÁNTARA

DIRECTORA: Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez

CODIRECTOR: Dr. Héctor Quezada Pablo

POSGRADO
EN CIENCIAS
GENÓMICAS

Ciudad de México, noviembre de 2024

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: Dra. Elisa Azuara Lieceaga UACM

Secretario: Dra. María Elizbeth Álvarez Sánchez UACM

Vocal: Dr. Héctor Quezada Pablo Hospital infantil de México

Plantel de adscripción:

PLANTEL DEL VALLE, UACM.

DIRECTORA

Dra. María Elizbeth Álvarez Sánchez
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

CODIRECTOR

Dr. Héctor Quezada Pablo
Hospital infantil de México

AGRADECIMIENTOS

Durante el desarrollo de este trabajo hubo muchos momentos donde aprendí, disfrute y que de cierta manera no fue fácil la realización de este trabajo, pero resalto toda la labor de aquellos que estuvieron presentes durante la realización de esta tesis.

Agradezco primeramente a la Dra. Elizabeth Álvarez Sánchez por haberme aceptado y permitido formar parte de su grupo de trabajo, gracias por todo el aprendizaje y apoyo durante el desarrollo de esta tesis que estuvo a cargo bajo su tutoría.

Durante la construcción de este trabajo en todo este proceso el apoyo de mis lectores para mejorar este trabajo, gracias a sus observaciones, las cuales fueron aportaciones importantes en el desarrollo de mi tesis, gracias por formar parte, Dr. Mauricio Castañón Arreola, Dra. Elisa Azuara Lieceaga y al Dr. José Alberto Mendoza Espinoza.

Gracias a mi universidad UACM, por haberme dado la oportunidad de formarme en ella y a todos los profesores y profesoras que fueron la guía durante toda la carrera.

El desarrollo de este trabajo fue posible de igual forma a la colaboración con el Dr. Héctor Quezada Pablo y Ana Laura Guzmán-Ortiz del hospital infantil de México Federico Gómez, gracias por todo el apoyo y confianza que me brindaron.

Les agradezco mucho a la M. en C. Laura Vázquez que fue muy importante para la realización de este trabajo en el laboratorio uno del posgrado, al M. en C. Marcos Morales y el M. en C. Alberto Santiago por todo el apoyo brindado.

A todos aquellos que formaron parte de este gran proceso, mis compañeros de laboratorio y del posgrado en general, a mi amigo de toda la carrera Jesús Vega por su amistad en este periodo y haber aprendido y pasado tantas cosas juntos.

A Amairany Martínez por ser parte de este gran proceso y todo el apoyo que me brindo, así como con cada motivación brindada de seguir adelante y el escucharme en todo momento y hacer esto un tanto menos complicado, gracias por todo.

Gracias a todas aquellas personas que formaron parte de mi vida en este proceso.

DEDICATORIA

La realización de este trabajo no hubiese sido posible sin todo el apoyo que me brindaron a lo largo de todo este tiempo, ustedes sin duda son el principal cimiento para todo mi desarrollo profesional y el deseo de superarse día a día y aunque no ha sido nada sencillo, este trabajo se los dedico a ustedes, que siempre han estado acompañándome, a mi gran madre que le estere eternamente agradecido al igual que a mis hermanos y por ultimo a mi padre que, a pesar de que ya no esté en este mundo, fue parte de este proceso y que sin duda todo esto fue posible gracias a ustedes, los quiero mucho.

Indice	
Abreviaturas	5
Resumen.....	6
1 Introducción	7
1.1 <i>Trichomonas vaginalis</i>	7
1.2 Ciclo de vida	8
1.3 Tricomoniasis	9
1.4 Transmisión	10
1.5 Epidemiología.....	11
1.6 Diagnóstico.....	13
1.7 Tratamiento	14
1.8 Genoma.....	16
1.9 Proteoma de <i>T. vaginalis</i>	17
1.10 Propiedades y factores de virulencia de <i>T. vaginalis</i>	18
1.11 Metabolismo de <i>Trichomonas vaginalis</i>	22
1.12 Regulación de la expresión génica	23
2. Antecedentes	25
3. Justificación.....	31
4. Hipótesis	31
5. Objetivos	31
5.1 General.....	31
5.2 Objetivos Particulares.....	31
6. Estrategia experimental.	32
7. Metodología	33
7.1 Cultivo de <i>T. vaginalis</i>	33
7.2 Precipitación de proteínas en ácido perclórico	33
7.4 Tinción de plata, geles de poliacrilamida	34
7.5 Western-blot utilizando anticuerpos rTv-PSP1	34
7.6 Electroforesis Bidimensional.....	35
7.7 Procesamiento extractos de proteínas de <i>T. vaginalis</i>	35
7.8 Análisis de HPLC acoplado a MS/MS	36
7.9. Interactoma de las proteínas que cumplieron los criterios de inclusión.	36

8. Resultados	37
8.1 Perfil de proteínas solubles en ácido perclórico electroforesis primera dimensión	37
8.2 Análisis proteómico de las proteínas solubles en ácido perclórico.	38
8.3 Identificación de las proteínas solubles en ácido perclórico por HPLC-MS/MS	40
8.4 Interactoma de las proteínas solubles en ácido perclórico	45
8.5 Grados de los nodos	47
8.6 Cuellos de botella.	50
8.7 Análisis de GO de las proteínas solubles en ácido perclórico de <i>T. vaginalis</i> ..	52
8.8 Vías KEGG y análisis de EST	61
9. Discusión.....	65
10. Conclusiones.....	68
11. Perspectivas.....	68
12. Apendice	76
13. Anexos	79

Indice de tablas

Tabla 1. Códigos de PDB de proteínas cristalizadas de la familia PSP.....	28
Tabla 3. Proteínas totales obtenidas de la espectrometría de masas.	42
Tabla 4. PSPs de <i>T. vaginalis</i> identificadas por espectrometría de masas.	44
Tabla 5. Proteínas mas interconectadas	49
Tabla 6. Cuellos de botella del interactoma de las proteínas solubles en ácido perclórico.....	51
Tabla 7. Procesos biológicos en los que participan las proteínas solubles en ácido perclórico de <i>T. vaginalis</i>	54
Tabla 8. Componentes celulares en los que participan las proteínas solubles en ácido perclórico de <i>T. vaginalis</i>	56
Tabla 9. Funciones moleculares en las que participan las proteínas solubles en ácido perclórico de <i>T. vaginalis</i>	59
Tabla 11. Número de los EST de los genes de las proteínas solubles en ácido perclórico obtenido de TrichDB	62
Tabla 12. Análisis <i>in silico</i> de ESTs obtenidos de la base de datos TrichDB.	64

Indice de figuras

Figura. 1 <i>Trichomonas vaginalis</i>	8
Figura 2. Ciclo de vida <i>T. vaginalis</i>	9
Figura 3. Casos de tricomoniasis reportados por entidad federativa en México.	13
Figura 4. Factores y propiedades de virulencia involucrados de <i>T. vaginalis</i>	21
Figura 5. Modelo homotrimérico de la proteína Tv-PSP1.	29
Figura 6. Obtención de proteínas solubles en ácido perclórico.....	38
Figura 7. Análisis por PDQuest de la electroforesis bidimensional..	40
Figura 8. Interactoma de las PSPs de <i>T. vaginalis</i> identificadas.....	46
Figura 9. Distribución de grados de las proteínas obtenido en Phyton..	47
Figura 10. Interactoma representando el degree de las proteínas más interconectadas	51
Figura 12. Análisis de GO por proceso biológico..	55
Figura 13. Gráfico de los procesos biológicos.....	55
Figura 14. Análisis de GO por componente celular.....	57
Figura 15. Gráfico de los componentes celulares..	58
Figura 16. Análisis de GO por función molecular..	60
Figura 17. Gráfico de las funciones moleculares.	60
Figura 18. Interactoma de la vía KEGG.	61
Figura 20. Interactoma completo del Gene Ontology (GO).....	79

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosín Trifosfato
DTT	Dithiothreitol
ESTs	Etiquetas de secuencia expresada (Expressed sequence tag)
Fd	Ferredoxina
IRE	Elementos de respuesta a Hierro
kDa	Kilodaltones
M	Molar
mg	Miligramos
min	Minutos
mM	Milimoles
NAATs	Pruebas de amplificación de ácidos nucleicos de alta sensibilidad
ON	Toda la noche
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PCA	Ácido Perclórico
pH	Potencial de Hidrógeno
PSP	Proteína soluble en ácido perclórico
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TA	Temperatura ambiente
TE	Elementos transponibles
TYM	Medio de cultivo tripticasa-extracto de levadura-maltosa
VECs	Células del epitelio vaginal

Resumen

Trichomonas vaginalis es el agente causal de la tricomoniasis, una infección común en todo el mundo asociada con importantes problemas de salud pública. La infección en mujeres causa vaginitis, uretritis, flujo vaginal seropurulento maloliente e infertilidad, mientras que los hombres son portadores asintomáticos. Sugerimos que hasta el momento se ha descrito estructural o funcionalmente en *T. vaginalis* una enzima tipo RNasa, de la familia de proteínas YER057c/YJGF, cuyo objetivo potencial podría ser un ARNm de una proteína que participa en la citotoxicidad del parásito. (Villalobos, 2019). Los miembros de la familia de proteínas YER057c/YJGF, o proteínas solubles en ácido perclórico (PSP), se han descrito en 23 especies en arqueobacterias, procariotas y eucariotas, están altamente conservados y pueden participar en procesos celulares clave. El objetivo de este trabajo fue encontrar la proteína soluble en ácido perclórico (PSP). Las proteínas solubles en ácido perclórico (PSP) se caracterizan por ser proteínas altamente conservadas con pesos moleculares de alrededor de 14 kDa, por lo que a partir de los extractos en condiciones normales de cultivo de *T. vaginalis* el objetivo fue encontrar proteínas diferentes a la PSP1 ya caracterizada. Se realizaron geles SDS-PAGE 1D y 2D de estas proteínas solubles en ácido perclórico y posteriormente se analizaron por HPLC-MS. En total se obtuvieron 77 proteínas, de las cuales solo 45 se eligieron con los parámetros de inclusión. Analizamos *in silico* las funciones putativas de las proteínas mediante una ontología de genes de las PSPs y a partir de un top 5 cuellos de botella y un top 5 de las proteínas con mayor número de conexiones determinamos sus posibles funciones como inhibidores de la traducción, chaperonas y participación en diferentes procesos moleculares como la traducción y algunas vías metabólicas que podrían ser de importancia para el parásito.

1 Introducción

1.1 *Trichomonas vaginalis*

T. vaginalis fue observada por primera vez en 1836 por el médico francés Alfred Donné en preparaciones de exudados vaginales y uretrales humanos. El nombre de *Trichomonas* se debe a la similitud que el parásito presenta con los “Tricodes” y las “Monas”. *T. vaginalis* pertenece a la Familia Trichomonadidae, al género *Trichomonas* que se caracterizan en especies como: tenax, hominis y entre la que se encuentra la especie *vaginalis* (Costamagna *et al.*, 2008).

T. vaginalis es un protozooario móvil, anaerobio, de forma ovoide, con una longitud de 10 a 20 μm , tiene 5 flagelos en un extremo y uno más adosado a su membrana ondulante le confiere la característica movilidad al microorganismo (Costamagna *et al.*, 2008).

El citoesqueleto de este parásito está formado por microtúbulos que dan lugar a la formación de diversas estructuras como el complejo pelta-axostilar, la costa y los filamentos parabasales (Ibáñez-Escribano and Gómez-Barrio, 2017). En la parte posterior presenta una espícula llamada axostilo, esta estructura le permite anclarse a su sustrato del hospedero (Fig.1) (Hidalgo y García, 2005).

T. vaginalis es un protozooario que carece de mitocondrias y peroxisomas, en su lugar presenta organelos electrodensos llamados hidrogenosomas, los cuales son organelos redox donde se lleva a cabo el metabolismo fermentativo de los carbohidratos. Los hidrogenosomas están unidos por membranas dobles y producen ATP por fosforilación a nivel de sustrato (Muller, 1993).

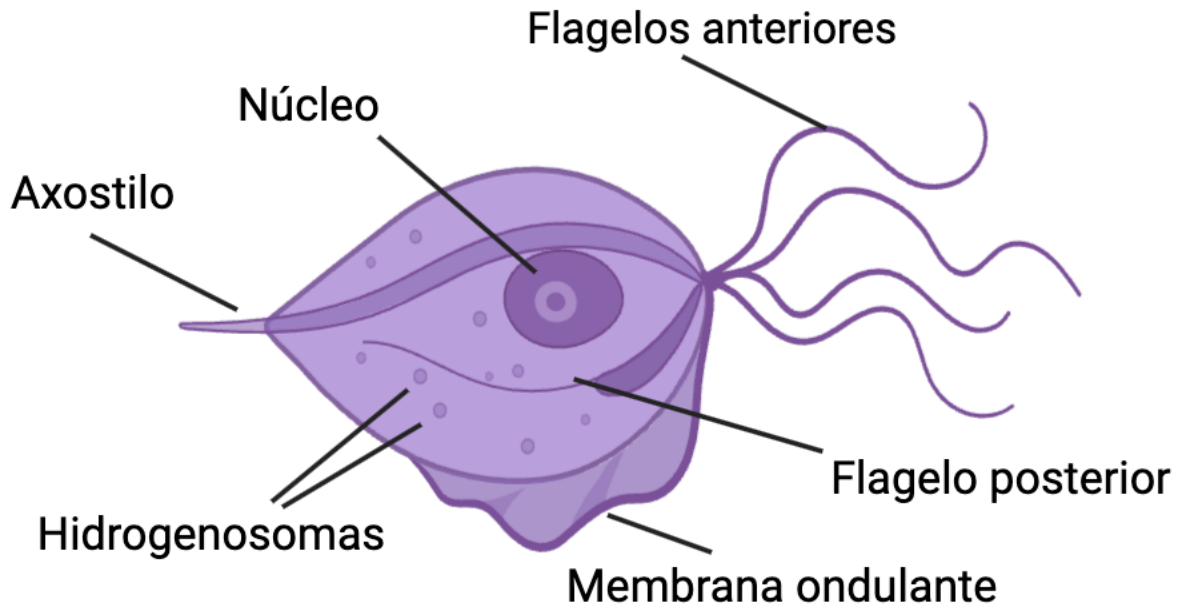


Figura. 1 *Trichomonas vaginalis*. En la figura se muestra la morfología del parásito que se distingue por 5 flagelos, un núcleo, un axostilo, una membrana ondulante e hidrogenosomas. Basado en (Ibáñez-Escribano and Gómez-Barrio, 2017)

1.2 Ciclo de vida

Los humanos son el único reservorio de *T. vaginalis*. Este parásito habita en el tracto urogenital de las personas (Kochan et al., 2021).

T. vaginalis sólo se presenta en forma de trofozoíto, no existiendo ninguna forma de resistencia o quiste en su ciclo vital. Aunque se han descrito formas redondeadas en ambientes desfavorables; estas formas pseudoquisticas se observan como organismos esféricos y este estado es reversible en cuanto el parásito vuelve a encontrarse en un medio adecuado (Pereira et al., 2003).

Este parásito tiene una reproducción asexual por división binaria longitudinal, lo que significa que duplica todos sus componentes y genera dos células idénticas al final de su ciclo (Schwebke and Burgess, 2004), y este proceso inicia con la replicación de organelos locomotores, posteriormente por la formación de dos estructuras denominadas atractoforos, los cuales se convierten en los polos para la división celular, seguido de estos se desarrollan los microtúbulos cromosómicos que se extienden hasta el núcleo para posteriormente formar un huso extracelular conocido como paradesmosis, que se extiende mientras las células hijas se separan y finalmente cada célula hija producirá cualquier organelo faltante (Fig. 2) (Brugerolle, 1975).

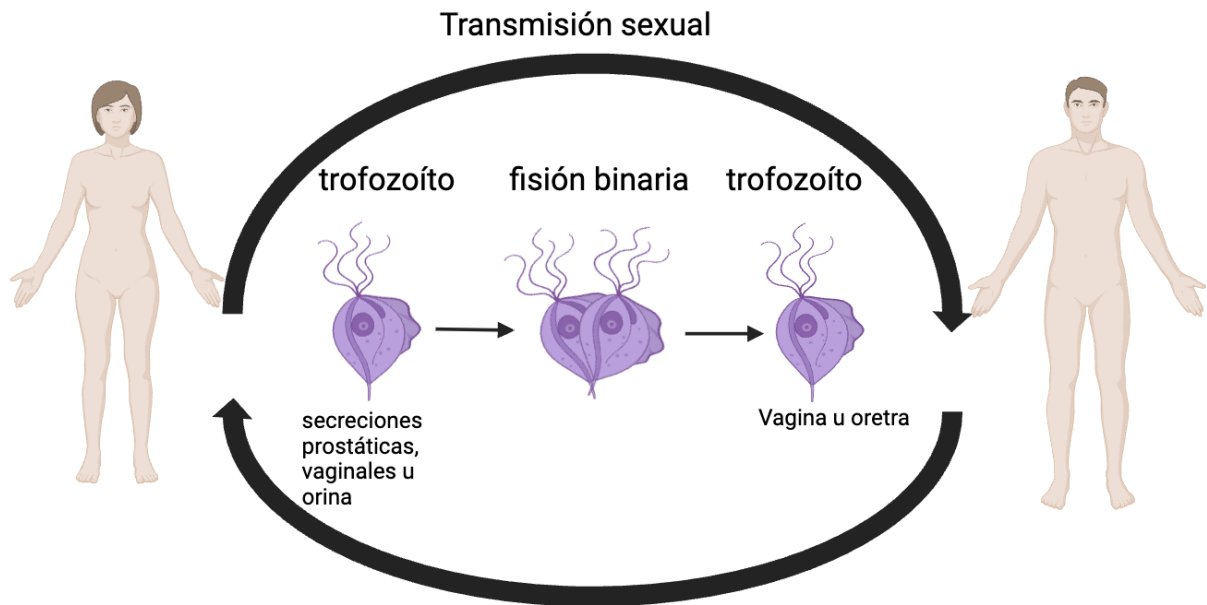


Figura 2. Ciclo de vida *T. vaginalis*. El parásito se encuentra en el tracto urogenital femenino y en el hombre en uretra y próstata, el cual se divide por fisión binaria y se transmite por contacto sexual (Brugerolle, 1975).

1.3 Tricomoniasis

La tricomoniasis es la infección causada por el parásito protozoario *T. vaginalis* y es la infección de transmisión sexual no viral (ITS) curable más común en todo el mundo (*Tricomoniasis - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud, 2023*).

T. vaginalis infecta preferentemente en sitios vaginales y vulvares en mujeres y con mucho mayor frecuencia la uretra en hombres (Meites et al., 2015). Durante la infección área genital puede observarse irritada y presentar dolor lo que causa molestia en las relaciones sexuales; los síntomas vaginales y urinarios se pueden presentar solos o juntos (Morris Sheldon R., 2023). Las mujeres que presentan síntomas de tricomoniasis se quejan de flujo vaginal, prurito e irritación. Los signos de la infección incluyen flujo vaginal (42%), olor (50%) y edema o eritema (22 a 37%). El flujo se describe como espumoso, en el 10% de los pacientes y además la colpitis macularis (cuello uterino en fresa) es un signo clínico específico de esta infección (Wølner Hanssen et al., 1989). Cabe destacar que casi la mitad de las mujeres con tricomoniasis son asintomáticas (Fouts and Kraus, 1980). En el caso de los hombres, el 97% son asintomáticos (no presentan ni signos ni síntomas), y solo el 10%

de los hombres presentan uretritis, prostatitis, epididimitis y disminución de la motilidad de los espermatozoides (Fig. 3) (World Health Organization, 2023).

Algunos hombres pueden experimentar una secreción espumosa del pene y padecen dolor al orinar, así como la necesidad de orinar a menudo (Morris, 2023). A veces, después de un interrogatorio cuidadoso, un hombre puede afirmar que ha notado picazón y malestar dentro del pene, además de una ligera humedad en la punta del pene durante unos días, pero que desapareció espontáneamente (Catterall, 1972).

Las infecciones que no se detectan ni se tratan incrementan el riesgo de adquirir y transmitir el VIH. Estudios han evidenciado una conexión entre la infección por tricomonas y un mayor riesgo de infección por VIH en áreas donde esta enfermedad es endémica. Esta relación epidemiológica es biológicamente plausible, ya que la infección por tricomonas provoca una respuesta inflamatoria que atrae células vulnerables al VIH al área de exposición (la vagina). Además, la infección puede generar microabrasiones en la vagina, facilitando así el ingreso del VIH al torrente sanguíneo (Mavedzenge *et al.*, 2010). El papel que desempeña *T. vaginalis* en el desarrollo de cáncer de cérvix es no tan claro, pero se cree que el proceso inflamatorio causado por este protozoo predispone al epitelio a la carcinogénesis (Ospina and Ariza, 2008). La disrupción del epitelio cervical se debe al proceso de inflamación causado por TV, que facilita la entrada del VPH en la capa basal del epitelio. Como resultado, conduce a la integración del ADN viral en el ADN del huésped y a la sobreexpresión de oncogenes virales que contribuyen a la activación de mecanismos cancerígenos (Castle y Giuliano, 2003).

Algunas otras secuelas asociadas a la tricomoniasis han sido la endometritis persistente, la infertilidad y la Enfermedad pélvica inflamatoria (PID) (Stark *et al.*, 2009).

La tricomoniasis no tratada causada por *T. vaginalis* puede ascender por la uretra hasta la próstata, lo que resulta en una infección prostática crónica y persistente que se sugiere que desempeña un papel en el desarrollo y la progresión del cáncer de próstata (Sutcliffe *et al.*, 2006).

1.4 Transmisión

T. vaginalis infecta principalmente el epitelio escamoso del tracto genital y reside en el tracto genital inferior femenino y la uretra y próstata masculinas. *T. vaginalis* se transmite entre humanos, su único huésped conocido, principalmente por relaciones sexuales. La infección puede persistir durante largos períodos, posiblemente meses o incluso años, en mujeres, pero generalmente persiste menos de 10 días en hombres (Krieger, 1995), y de forma muy infrecuente, durante el parto (World Health Organization, 2023). Lilia *et al.*, en 2003 reportó que los neonatos de las madres con *T. vaginalis* presentan 8 veces mayor riesgo de sepsis neonatal, 7 veces mayor riesgo de morbilidad neonatal y 2.6 veces mayor riesgo de hiperbilirrubinemia, mientras que las gestantes con *T. vaginalis* presentaron desnutrición gestacional y el feto desarrolló con mayor frecuencia infección congénita. Se ha reportado en casos pulmonares de *T. vaginalis* recién nacidos con neumonía neonatal y en pacientes con prácticas sexuales urogenitales. El hallazgo de la especie *Trichomonas tenax* en el tracto respiratorio bajo es un evento extremadamente raro, más común de la infección pleuropulmonar (Ramírez *et al.*, 2010).

1.5 Epidemiología

La prevalencia de la tricomoniasis a nivel global es difícil de estimar debido a la falta de estudios epidemiológicos que aporten información precisa de la incidencia y prevalencia de esta infección (Costamagna *et al.*, 2008). La tricomoniasis no es una infección de declaración obligatoria; por lo tanto, las estimaciones de prevalencia generalmente provienen de modelos o estudios basados en la población. En 2016, la OMS estimó que la prevalencia global de *T. vaginalis* era del 5.0% en mujeres y del 0.6% en hombres (Rowley *et al.*, 2019). La prevalencia de la infección por trichomonas está mejor documentada en los Estados Unidos, donde las tasas son sistemáticamente más altas que las de las infecciones por *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* combinadas. En estudios representativos de la población general, las tasas de infecciones por tricomonas, clamidia y gonorrea se han estimado en 3,2, 2,2 y 0,2%, respectivamente (Satterwhite *et al.*, 2013). A nivel mundial, las infecciones por tricomonas representan casi la mitad de todas las ITS curables. Estas estimaciones dependen de la población, con tasas muy altas entre algunos grupos y casi ninguna enfermedad en otros. En Europa, estudios a nivel de

población han estimado que la prevalencia de la enfermedad es <1% en países con tasas de clamidia similares a las de los Estados Unidos, lo que sugiere una fluctuación geográfica en la presencia subyacente de la enfermedad que no está bien descrita o entendida (Kissinger, 2015).

En el estudio de Muñoz *et al.*, 2018 encontraron una prevalencia de *T. vaginalis* de un 23.81% en mujeres trabajadoras sexuales (TSF) (TSF), una prevalencia inferior a la mostrada en ciudades de la Región Fronteriza México-Estados Unidos, que fue de 35% en TSF. En países de América Latina, como El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua y Panamá, la prevalencia fue del 11%, mientras que en Perú y Argentina la prevalencia de *T. vaginalis* en (TSF) fue del 9% y 7%, respectivamente. La tricomoniasis es una infección cosmopolita, sin embargo, estos datos muestran una marcada regionalización de la transmisión de *T. vaginalis* debido al trabajo sexual.

En el año 2023 en México se reportaron 1175 casos en hombres y 18946 en mujeres, siendo un total de 20121 casos de tricomoniasis, lo que significa una reducción de 1257 casos con respecto a los 21378 reportados en el año 2022. Por el contrario, para los años 2021 y 2020 se reportaron 22493 y 22822 casos respectivamente y como se ve ha habido una disminución ya que en estos años estuvo presente la pandemia del COVID-19 por lo que se la daba prioridad a esta enfermedad respiratoria. Estos casos podrían estar subestimados, debido a que esta infección no es de reporte obligatorio y puede haber diversos hospederos asintomáticos dentro de la población. Las estadísticas muestran que los estados de Veracruz, Puebla y Chiapas tienen el mayor número de casos y los estados con menor incidencia reportada son Querétaro y Aguascalientes (Fig. 4). Actualmente los casos hasta la semana 38 del año 2024 son 12113 en mujeres y 725 casos en hombres, dando un total de 12888 casos y al igual que el año del 2023 los estados con mayor incidencia son: Veracruz, Chiapas y Puebla.

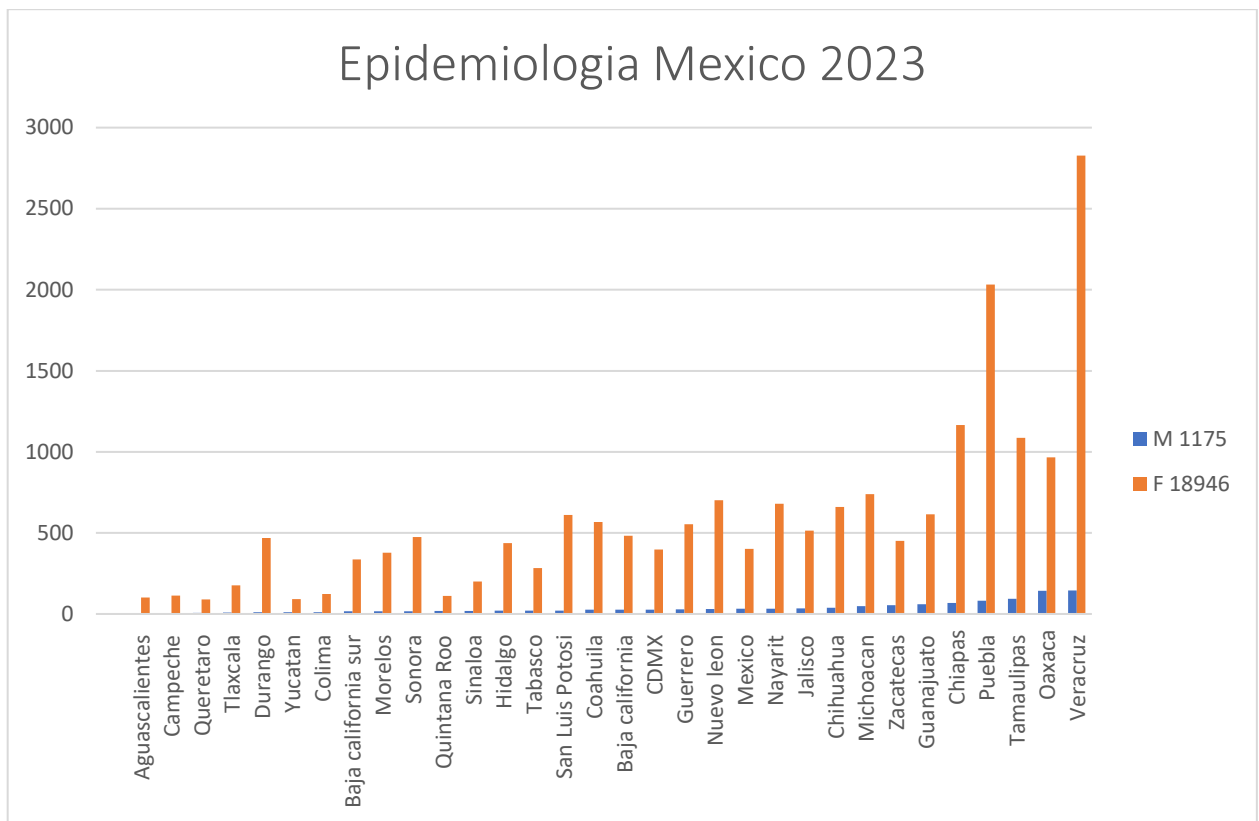


Figura 3. Casos de tricomoniasis reportados por entidad federativa en México. Número de casos de tricomoniasis reportados por estado durante el 2023 en color naranja se representan las mujeres y en azul las los hombres.

(<https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/879365/sem52.pdf>) (Boletín Epidemiológico, 2023)

1.6 Diagnóstico

Los avances recientes en el desarrollo de pruebas para detectar *T. vaginalis* han aumentado las oportunidades de diagnóstico y tratamiento de esta importante infección de transmisión sexual (Hobbs and Seña, 2013). La prueba convencional del papanicolaou (CPS) no se considera precisa para el diagnóstico de *T. vaginalis* y se recomienda que las mujeres se sometan a pruebas de confirmación. Ha sido demostrado que las preparaciones líquidas facilitan el diagnóstico de los parásitos por la movilidad de sus flagelos, así como la presencia de lesiones escamosas. El diagnóstico dependerá de la experiencia del laboratorista (Wiese *et al.*, 2000).

El cultivo de tricomonas es considerado el estándar de oro y es el método de referencia para diagnosticar la infección por *T. vaginalis* antes que los métodos de detección molecular ya que tiene una sensibilidad del 100% (Fanfair and Workowski, 2014).

El examen de microscopía en una preparación húmeda de secreciones vaginales es la evaluación diagnóstica más común para la infección por *T. vaginalis*. La observación directa de las tricomonas en forma de pera con su característica motilidad espasmódica o giratoria se considera 100% específica de *T. vaginalis*. Los estudios que comparan el examen de la microscopía con pruebas de detección molecular de alta sensibilidad documentan la escasa sensibilidad de la microscopía, que oscila entre el 44% y el 68%. (Patil *et al.*, 2012)

Las pruebas de detección de antígenos disponibles comercialmente incluyen la Prueba rápida tricomonas (OSOM) (Diagnóstico Sekisui, California, EE. UU.) y la prueba de aglutinación en látex Tv (Kalon Biológico, Surrey, Reino Unido). OSOM es una prueba de tira inmunocromatográfica aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) que utiliza anticuerpos específicos para detectar antígenos proteicos de tricomonas. El procesamiento y las pruebas de muestras no requieren instrumentación y los resultados están disponibles en 30 minutos o menos con una sensibilidad >80% (Hobbs y Seña, 2013)

Existen pruebas más sensibles y específicas (sensibilidad del 97,2% y una especificidad del 99,9%) para la detección de *T. vaginalis* como es la de amplificación de ácidos nucleicos de alta sensibilidad (NAATs) en donde se lleva a cabo la amplificación de copias de ADN individual específico o secuencias diana de ARN, por lo tanto, la sensibilidad analítica de las (NAATs) es mayor que la del análisis por microscopía, cultivo, detección de antígeno o ensayos con sondas de ácido nucleico, que detectan organismos o sus constituyentes (Hobbs y Seña, 2013).

1.7 Tratamiento

El uso del metronidazol para el tratamiento de la tricomoniasis se propuso desde 1959 (Durel *et al.*, 1967). El metronidazol es un tratamiento muy eficaz para las infecciones anaeróbicas y una variedad de enfermedades protozoarias y parasitarias. (Scully, 1988). El hidrogenosoma de *T. vaginalis* es vital para el metabolismo del metronidazol. En el caso de un ambiente anaeróbico, el piruvato de la glucólisis ingresa al hidrogenosoma donde es descarboxilado por la enzima unida a la membrana, la ferredoxina oxidoreductasa de piruvato (PFOR), que dona electrones a la ferredoxina (Fd). La descarboxilación del piruvato forma acetato y finalmente ATP. La Fd es

oxidada por la hidrogenasa (Hyd) produciéndose hidrógeno molecular como producto final en la cadena de transporte de electrones. El profármaco metronidazol (RNO₂) ingresa al hidrogenosoma mediante difusión pasiva donde compite con la hidrogenasa por los electrones de Fd. La reducción de metronidazol activa el fármaco a su forma tóxica de radical nitro. En presencia de oxígeno, se produce un reciclaje que hace que los radicales regresen al profármaco. La resistencia generalmente surge después de múltiples ciclos de tratamiento con metronidazol para la tricomoniasis u otra afección y, en la mayoría de los casos, los síntomas pueden resolverse finalmente con altas dosis de tinidazol y/o metronidazol durante períodos prolongados, pero en algunos casos estos tratamientos en dosis altas son mal tolerados y no tienen éxito (Dunne *et al.*, 2003).

El tratamiento estándar es una dosis única de 2 g por vía oral, sin embargo, las parejas sexuales deben recibir tratamiento simultáneamente para lograr una efectividad del 90%. Por otra parte, los pacientes con tratamiento de metronidazol se deben abstener de tener relaciones sexuales durante al menos 1 semana y hasta que ellos y su(s) pareja(s) completen el tratamiento. El metronidazol se puede utilizar en todas las etapas del embarazo y durante la lactancia (Sherrard *et al.*, 2014).

Las mujeres embarazadas sintomáticas deben ser tratadas en el momento del diagnóstico, aunque algunos médicos han preferido diferir el tratamiento hasta el segundo trimestre y los fabricantes recomiendan evitar dosis altas si se está amamantando o si se está usando una dosis única de metronidazol (Sherrard *et al.*, 2014).

Ha sido descrito que cualquier derivado de nitroimidazole administrado en dosis única o durante un período más prolongado produce curación en >90% de los casos (Thin *et al.*, 1979).

En *T. vaginalis* los mecanismos de resistencia aeróbica a metronidazol son aún poco comprendidos. La comparación cepas resistentes a metronidazol de *T. vaginalis*, con respecto a cepas sensibles ha mostrado que la resistencia aeróbica es el resultado de una alteración de la captación de oxígeno por parte de las tricomonas resistentes, lo que da como resultado la interferencia del oxígeno intracelular con el proceso de activación del fármaco (Yarlett, y Lloyd, 1986, Tachezy *et al.*, 1993).

Los cambios metabólicos que acompañan al desarrollo *in vitro* de la resistencia al metronidazol demuestran la versatilidad del metabolismo de las tricomonas y

proporcionan un ejemplo interesante de cómo los eucariotas unicelulares pueden ajustar su metabolismo en respuesta a la presión de un entorno desfavorable (Kulda, 1999).

1.8 Genoma

El genoma de *T. vaginalis* es de 160 Mb organizados en 6 cromosomas. Al menos el 65% del genoma de *T. vaginalis* es altamente repetido y se identificó un conjunto central de ~60.000 genes codificadores de proteínas, haciendo que *T. vaginalis* tenga una de las mayores capacidades de codificación entre los eucariotas (Carlton *et al.*, 2007).

Muchas familias de genes en el genoma de *T. vaginalis* han experimentado una expansión a una escala sin precedentes en eucariotas unicelulares. Es probable que estas expansiones de familias "conservadas" de genes mejoran la adaptación de este parásito a su ambiente (Vogel y Chothia, 2006). Hay dos posibles mecanismos importantes que pueden ser responsables de la expansión del genoma a gran escala. Uno puede ser mediante transferencia lateral de genes o bien mediante eventos de duplicación de genes a gran escala (De Koning *et al.*, 2000). Strese *et al.* definen este fenómeno como la adquisición e incorporación de material genético de un organismo donador, sin que exista un proceso de transferencia sexual o vertical, en al menos un 0.25% de los genes de este protozoario. La transmisión potencial se habría producido mediante un proceso de fagocitosis, seguido de una fisión binaria, que habría incorporado en su genoma y en el de sus células hijas dichos genes (Strese *et al.* 2014).

Todos los intrones de *T. vaginalis* examinados tienen un motivo de sitio de empalme 3' de 12 nt altamente conservado que abarca el punto de ramificación y es necesario para el empalme, lo que significa que los motivos del sitio de empalme (SS), son reconocidos por pequeños ARN nucleares y componentes proteicos del espliceosoma, coordinan múltiples pasos en el empalme (Reed, 2000). Este motivo también se encuentra en el único intrón descrito en un gen de otro eucariota de ramificación profunda como lo es en *Giardia intestinalis* (Vaňáčová *et al.*, 2005).

T. vaginalis alberga en su genoma elementos transponibles (TE) que tienen el potencial de ser perjudiciales para la función genómica normal, como por ejemplo en

la transcripción de genes codificadores de proteínas. Se han identificado pequeñas moléculas de ARN correlacionadas con una expresión reducida de genes y transposones de *T. vaginalis* (Warring *et al.*, 2021). En muchos organismos, la expresión de elementos transponibles está regulada por la actividad de varias clases de ARN pequeños expresados endógenamente (sRNA), moléculas de ARN cortas (~20 a 35 nucleótidos [nt]) que efectúan el silenciamiento génico ya sea dirigiendo a los ARNm para su degradación o reclutando maquinaria de silenciamiento epigenético a ubicaciones específicas en el genoma (Bartel, 2004). Los elementos transponibles suelen estar compuestos de regiones no codificantes, como las repeticiones invertidas terminales (TIR), y genes que codifican la maquinaria proteica necesaria para su propia transposición, como los genes de la transposasa y la integrasa. *T. vaginalis* contiene transposones de ADN de clase 2, que dependen de mecanismos de cortar y pegar para replicarse y transponerse a diferencia de los transposones de ARN de clase 1, que se mueven a través de la transcripción y los intermediarios de ARN (Feschotte, 2008). Los ejemplos de familias de elementos transponibles (TE) identificadas en *T. vaginalis* incluyen la familia *Tvmar1* Mariner, los cuales tienen una longitud de consenso de 1.304 pb que incluye un solo gen que codifica una proteína transposasa (Silva *et al.*, 2005). También se encuentran familias de genes masivamente amplificados en el kinoma del parásito, que comprende ~880 genes que codifican distintas proteínas cinasas eucariotas (ePK) y ~40 proteínas cinasas atípicas, lo que lo convierte en uno de los kinomas eucariotas más grandes conocidos. El parásito tiene proteínas de unión a nucleótidos de guanina heterotriméricas y componentes de la vía de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK), lo que sugiere mecanismos de transducción de señales similares a los de las levaduras. Inusualmente, el kinoma de *T. vaginalis* contiene 124 genes similares a la tirosina cinasa citosólica TKL, pero carece por completo de los receptores de serina/treonina ePK de la familia TKL. Se encontró que las cinasas inactivas constituyen el 17% del kinoma de *T. vaginalis* (Carlton *et al.*, 2007)

1.9 Proteoma de *T. vaginalis*

Por ensayos de 2DE y espectrometría masas se han identificado aproximadamente 500 proteínas, de las cuales, las más abundantes fueron proteínas glucolíticas, las proteínas del citoesqueleto y las Hsp70 (Huang *et al.*, 2009)

Las peptidasas son enzimas que hidrolizan enlaces peptídicos y constituyen un conjunto de proteínas estructural y funcionalmente diverso que se puede agrupar en clanes y familias distintos en función de relaciones evolutivas intrínsecas (Rawlings *et al.*, 2010).

Las cisteínas peptidasas (CP) de la familia de la papaína están implicadas como factores de virulencia en las tricomonas, se identificaron más de 40 de ellas, destacando la diversidad de esta familia. Las cisteínas peptidasas que contribuyen al proteosoma 20S (ubiquitina C-terminal hidrolasas) son abundantes con 117 miembros (~25% del degradoma), lo que enfatiza la importancia de la degradación de proteínas citosólicas en el parásito (Carlton *et al.*, 2007).

Las peptidasas desempeñan papeles importantes en muchos procesos biológicos y son potenciales factores de virulencia, candidatos a vacunas y dianas farmacológicas en *T. vaginalis* y otros protistas parásitos (Klemba and Goldberg, 2002).

Por otro lado, también se han identificado muchas serinas peptidasas de tipo subtilisina y varias de tipo romboide, candidatas para procesar proteínas de superficie de *T. vaginalis*, además, de la primera treonina peptidasa de tipo asparaginasa encontrada en un protista. También se identificaron 13 familias de metalopeptidasas, así como tres proteínas similares a cistatina, inhibidores naturales de la peptidasa, que pueden regular la actividad de las abundantes cisteína peptidasas similares a papaína (Carlton *et al.*, 2007).

1.10 Propiedades y factores de virulencia de *T. vaginalis*

Las moléculas o proteínas de superficie superficiales y secretadas de *T. vaginalis* están implicadas en las interacciones del parásito con su entorno, incluidas las células epiteliales humanas, los leucocitos y las proteínas extracelulares del tracto urogenital (Hirt *et al.*, 2007)

La adherencia del parásito al epitelio vaginal, propiedad clave para la colonización y la infección, es un evento altamente específico que está mediado por

cuatro adhesinas con masas moleculares de 65 kDa; (AP65), 51 kDa (AP51), 33 kDa (AP33) y 23 kDa (AP23) que median la interacción de *T. vaginalis* con las células epiteliales (Arroyo *et al.*, 1992). El otro mediador principal de la adherencia a los epitelios del hospedero es el lipofosfoglicano de superficie, la proteína más expresada en la membrana de superficie de *T. vaginalis* e (2×10^6 a 3×10^6 copias por parásito) (Fichorova *et al.*, 2006).

T. vaginalis puede secretar proteínas que van a intervenir en numerosos procesos vitales tales como las cisteín-proteasas importantes en procesos de colonización y adherencia. Actualmente se conocen aproximadamente 23 cistein proteasas (CP) con tamaños que van desde los 23 a los 110 kDa (Figueroa-Angulo *et al.*, 2012).

El mecanismo de citotoxicidad requiere múltiples moléculas involucradas en el daño celular como son los efectores citolíticos en un mecanismo contacto independiente, en el que puede participar el factor de desprendimiento celular (CDF). En un mecanismo dependiente de contacto se encuentra involucrada la cisteín proteasa de superficie CP65 (Álvarez *et al.*, 2000) involucrada en la citotoxicidad de *T. vaginalis* a las monocapas de células HeLa y que, degrada algunas proteínas de la matriz extracelular, como colágeno IV y la fibronectina que la hacen inmunogénica en la infección humana.

El daño al epitelio del hospedero también es causado por la apoptosis de las células epiteliales mediada por el parásito y, depende de la liberación de la cisteín proteasa de 30 kDa CP30 (Kummer *et al.*, 2008).

Otro grupo de cuatro cistein proteasas de *T. vaginalis* (TvCP12, TvCP39, TvCP65 y TvCP2) se han visto presentes en mecanismos de citotoxicidad causada durante la infección (Ibáñez-Escribano y Gómez-Barrio, 2017).

En el sitio de la infección, el parásito tiene una maquinaria compleja que modula la producción de ROS, citocinas y quimiocinas e induce la apoptosis de las células inmunitarias del hospedero. También interfiere en la maduración de las células presentadoras de antígenos, como las células dendríticas. En conjunto, estos mecanismos permiten la supervivencia del patógeno y el establecimiento de la infección (Galego y Tasca, 2023).

T. vaginalis ha desarrollado diversos mecanismos en la supervivencia y colonización del tracto genitourinario, y de la evasión del sistema inmune del

hospedero. Los neutrófilos y macrófagos son las principales células implicadas contra el parásito, mientras que IL-8, IL-6 y TNF- α son las citocinas más producidas en respuesta a esta infección, además de que *T. vaginalis* estimula las células epiteliales vaginales, ectocervicales y endocervicales para liberar citocinas que pueden reclutar y activar células inmunes innatas como neutrófilos, macrófagos y mastocitos del sitio de la infección (Fig 4) (Galego y Tasca, 2023).

La actividad hemolítica y la consiguiente adquisición de nutrientes, ha sugerido que puede ser el responsable de la exacerbación de síntomas observados que ocurren durante y después de la menstruación, ya que *T. vaginalis* lisa los glóbulos rojos por donde adquiere de ellos lípidos y hierro (Fiori *et al.*, 1999).

Se han observado dos mecanismos distintos de fagocitosis en *T. vaginalis* durante estudios *in vitro* con levaduras: una forma clásica de fagocitosis que implica la extensión de pseudópodos, que luego engullen la célula blanco, y también una forma más pasiva, donde la célula blanco se hunde en la membrana de *T. vaginalis* (Pereira y Benchimol, 2007).

Existen también hidrolasas que tienen actividad similar a la tripsina y funcionan como factores de separación de células al degradar proteínas de la célula del hospedero como laminina, fibronectina y otros componentes (Mielczarek y Blaszkowska, 2016).

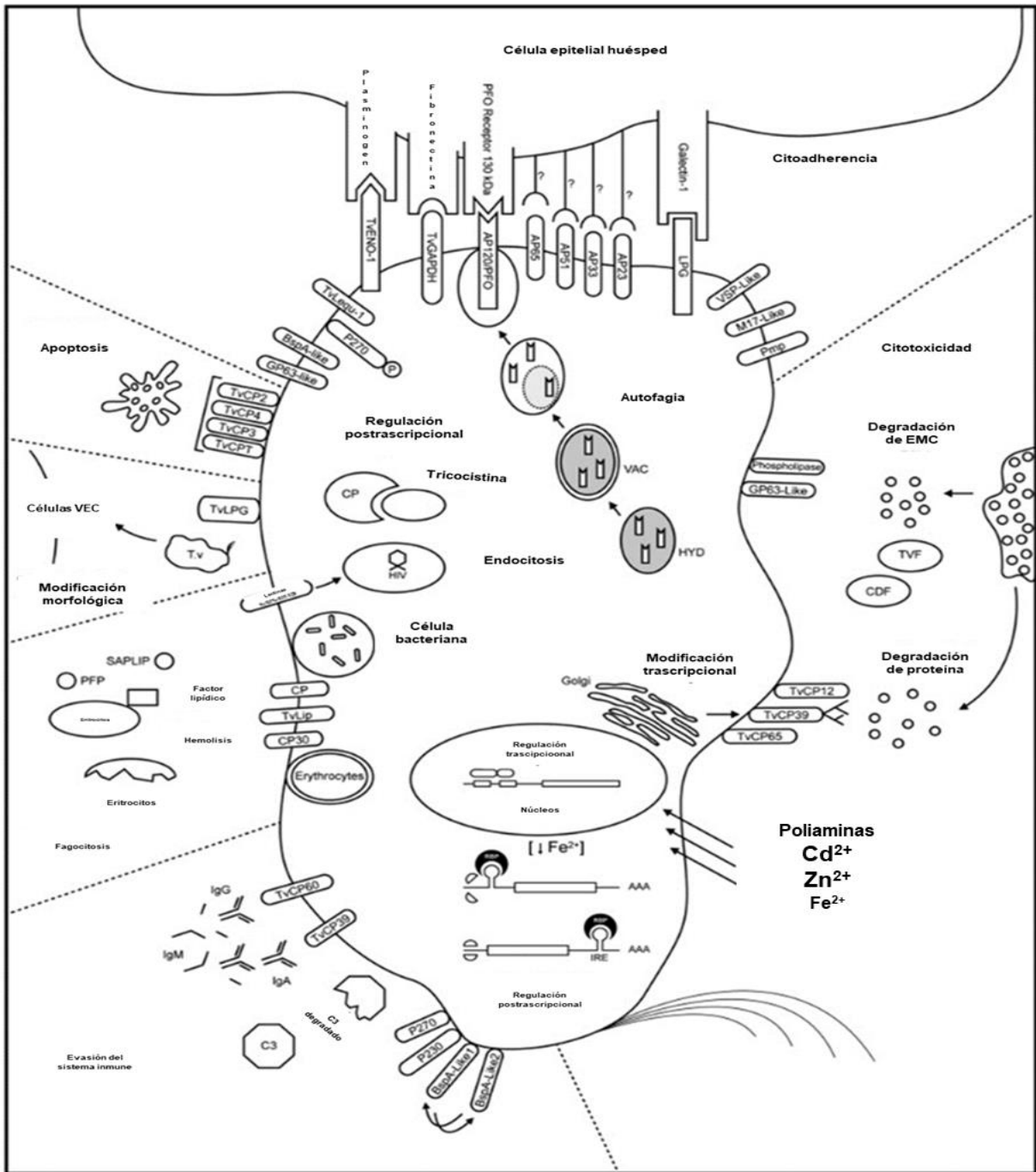


Figura 4. Factores y propiedades de virulencia involucrados de *T. vaginalis*. En la imagen se pueden observar las diferentes propiedades de virulencia junto con los factores de virulencia implicados en la patogenicidad del parásito. Tomada y modificado: (Figuerola-Angulo *et al.*, 2012)

Se ha descrito que el aumento de los síntomas de la tricomoniasis en la mujer está asociada a las fluctuaciones hormonales durante el ciclo menstrual. El nivel de estrógenos alcanza dos picos máximos durante el ciclo: el primero durante la ovulación

y el segundo en la mitad de la fase lútea (periodo previo a la menstruación). La presencia de receptores específicos para estrógenos y andrógenos en la superficie de *T. vaginalis* refleja la importancia de las hormonas en el desarrollo de esta parasitosis (Ford *et al.*, 1987).

La presencia de estrógenos en el tracto genitourinario disminuye la secreción de factores de virulencia como el factor de desprendimiento celular (CDF). Además, los niveles sanguíneos de estrógenos influyen en la producción de glucógeno en las células del epitelio vaginal. Cuando hay una deficiencia de estrógenos, se induce una disminución de la flora normal, que emplea y transforma el glucógeno en ácido láctico como fuente de energía (Garber *et al.*, 1991).

1.11 Metabolismo de *Trichomonas vaginalis*

La glucosa es la principal fuente de energía que se convierte en piruvato para la generación de ATP en el hidrogenosoma de tricomonas bajo restricción de glucosa (GR), la regulación del metabolismo de los aminoácidos es crucial para el crecimiento y la supervivencia de las tricomonas (Huang *et al.*, 2019).

T. vaginalis es incapaz de producir espermina metabólicamente y depende de la captación de su molécula del entorno extracelular, esto ocurre a través de un sistema anti-porte que requiere la liberación extracelular de putrescina. (Yarlett *et al.*, 2000). Se ha demostrado que la putrescina induce la apoptosis de células de mamíferos in vitro, a través del aumento de la actividad de la caspasa-3, un regulador clave del proceso de apoptosis (Takao *et al.*, 2006), lo que demuestra la importancia de la producción de poliaminas en la patogénesis de *T. vaginalis*. *T. vaginalis* también es capaz de fagocitar in vitro células epiteliales vaginales, leucocitos y eritrocitos, junto con bacterias comensales (Rendón *et al.*, 1998).

El genoma de *T. vaginalis* carece de genes que codifiquen para las proteínas necesarias para la síntesis de anclas de glicosilfosfatidilinositol (GPI), lo que convierte a *T. vaginalis* en el primer eucariota conocido que carece de una vía biosintética aparente de anclas de GPI. Queda por determinar si *T. vaginalis* ha desarrollado una vía biosintética inusual para la síntesis de sus anclas lipídicas no proteicas, como la inositol-fosfoceramida de los lipofosfoglicanos de superficie (Singh *et al.*, 1994).

Estos protozoarios son incapaces de sintetizar la mayoría de sus propios lípidos y colesterol de *novo*, y dependen de suministros de fuentes externas. Existen evidencias que sugieren que, estos parásitos pueden absorber los lípidos y el colesterol que necesitan de las partículas de lipoproteínas presentes en el hospedero y/o en el medio de crecimiento. Los estudios también respaldan la idea de que las moléculas individuales de lípidos y ácidos grasos pueden transportarse sin la ayuda de las lipoproteínas. Se ha demostrado que los fosfolípidos exógenos experimentan una remodelación de los ácidos grasos (mediante reacciones de desacilación/reacilación), lo que permite a estos protozoos alterar los lípidos, evitando la síntesis de moléculas de fosfolípidos completamente nuevas (Beach *et al.*, 1990) (Das *et al.*, 2002).

1.12 Regulación de la expresión génica

La mayoría de los estudios sobre la expresión génica en *T. vaginalis* se han centrado en el estudio de la región promotora de genes codificadores de proteínas. Los genes codificadores de proteínas en *T. vaginalis* se transcriben mediante una ARN polimerasa II resistente a la α -amanitina (Quon *et al.*, 1996). En esta región promotora existe un elemento promotor Inr que evolucionó tempranamente en los organismos eucariotas, y es probable que la maquinaria de transcripción de las tricomonas esté altamente optimizada para la función de Inr (Rodríguez *et al.*, 2010).

T. vaginalis posee varios mecanismos para regular la expresión de factores de virulencia, particularmente CP y adhesinas, entre los que se encuentran cationes como el hierro, zinc o cadmio que dependerá la concentración en la que se encuentren para la expresión de estas proteínas. Su regulación se puede observar en cuatro niveles diferentes: regulación transcripcional, postranscripcional, traduccional y postraduccional (Figuroa *et al.*, 2012). En el caso de *T. vaginalis*, los datos disponibles favorecen la transcripción de genes codificadores de proteínas por la ARN polimerasa II (Quon *et al.*, 1996). Hasta ahora, solo se ha identificado un elemento promotor putativo en *T. vaginalis*. Este elemento, es un motivo de 13 nucleótidos que está en el sitio de inicio de la transcripción de todos los genes de *T. vaginalis*, la cual es una secuencia altamente conservada, rica en pirimidinas, que es similar al elemento

iniciador eucariota (Inr), en particular, el Inr de *T. vaginalis* tiene un motivo conservado que también se conserva en el Inr eucariota (Liston y Johnson, 1998).

El papel de la acetilación de histonas en *T. vaginalis* desempeña un papel clave en la regulación de la transcripción y la patogénesis del parásito. La importancia de la acetilación de histonas en la regulación transcripcional radica en su propiedad reversible dependiendo de varias histonas acetiltransferasas (HAT) e histonas desacetilasas (HDAC). El análisis del genoma de *T. vaginalis* revela una familia de al menos 20 supuestos HAT y 21 HDAC, que pueden agruparse en diferentes clases según su similitud con sus homólogos humanos (Pachano *et al.*, 2017)

En eucariotas superiores, el sistema IRE/IRP es un mecanismo postranscripcional de regulación del hierro basado en la unión de proteínas reguladoras del hierro (IRP) citoplasmáticas a elementos sensibles al hierro (IRE) situados en las regiones no traducidas de los ARNm de algunas proteínas reguladas por hierro. En condiciones de bajo contenido de hierro, las IRP se unen a los IRE bloqueando la traducción de los ARNm que contienen IRE en sus extremos 5' o aumentando la estabilidad de los ARNm que tienen IRE en sus extremos 3' (Muckenthaler *et al.*, 2008). Por otra parte, la metilación del ADN es uno de los principales mecanismos epigenéticos que rigen la regulación genética (Gibney and Nolan, 2010). Los genes codificadores de proteínas en *T. vaginalis* están controlados en gran medida por dos elementos promotores centrales, que producen ARNm con UTR 5' cortos (Wang *et al.*, 2020).

Se ha demostrado que el Zn^{2+} y el Fe^{2+} que regulan la expresión de genes que codifican para proteínas involucradas en el metabolismo y los mecanismos de patogenicidad en este parásito; en contraste, también se encontró que altas concentraciones de estos cationes son tóxicas para los trofozoítos de *T. vaginalis*, sin embargo, los mecanismos de homeostasis y absorción de Zn^{2+} y Fe^{2+} aún no están claros en este parásito (Fernández *et al.*, 2017). En presencia de Zn^{2+} se incrementa la expresión de varias proteínas, entre ellas dos fimbrinas (en preparación 2024), las cuales son cruciales junto con la actina en la remodelación estructural que experimenta el parásito al interactuar con las células del tracto genitourinario, adaptando una forma ameboidea (Figueroa *et al.*, 2012).

Por otra parte, con respecto al Fe^{2+} , cuando este catión, el parásito aumenta su actividad citotóxica a través de algunas cistein proteasas (CP) (CP30 o CP65), lo

que incrementa su motilidad y con ello una penetración más profunda a las capas del epitelio, logrando de esta forma colonizar y su supervivencia en el ambiente vaginal (Ibáñez y Gómez, 2017).

Por el contrario, los niveles altos de Fe^{2+} afectan los procesos metabólicos asociados al hidrogenosoma, influyendo en el potencial de membrana de este organelo electrodenso, y en la expresión de enzimas hidrogenosomales entre las que se encuentran las Adhesinas proteasas (AP) (Kim *et al.*, 2006). *T. vaginalis* puede responder a cantidades variables de hierro mediante mecanismos diferenciales de expresión génica para sobrevivir, crecer y colonizar en el entorno vaginal hostil. Existen estudios sobre el papel del hierro en la expresión del gen *ap65-1*, que codifica una enzima málica de 65 kDa implicada en la citoadherencia del parásito y ha sido demostrado que este elemento desempeña un papel crucial en la transcripción del gen que codifica para esta adhesina (Rodríguez *et al.*, 2010).

Existe otros genes que codifican la familia de proteínas YjgF/YER057c/UK114, la cual está muy extendida en la naturaleza, pero aún no tiene una función biológica claramente definida. Los miembros de la familia existen como homotrímeros y se caracterizan por hendiduras entre subunidades delineadas por residuos bien conservados; es probable que estos sitios tengan importancia funcional, aunque nunca se ha detectado actividad catalítica para ningún miembro de esta familia (Burman *et al.*, 2007).

Las proteínas PSP, miembros de la familia de proteínas YER057c/YJGF, se han descrito en 23 especies, incluidas arqueobacterias, procariontes y eucariontes, las secuencias entre ellas se encuentran muy conservadas, es por ello por lo que se cree que podrían estar participando en procesos celulares básicos como ribonucleasas, chaperonas e inhibición de carcinogénesis (Villalobos *et al.*, 2018).

2. Antecedentes

La gran familia de proteínas YjgF/YER057c/UK114, que comprende aproximadamente 200 miembros y la mayoría con una función biológica poco clara que pertenecen al grupo de alta identidad (38%) (aproximadamente 80 proteínas) comparten 9 residuos completamente conservadas que se encuentran repartidos por toda la secuencia (Manjasetty *et al.*, 2004).

El primer miembro de esta familia que se descubrió fue una proteína soluble en ácido perclórico de hígado de rata (K-PSP1), caracterizada como una endorribonucleasa, que inhibe la iniciación de la traducción de proteínas en sistemas de lisado de reticulocitos de conejo al afectar directamente la actividad de la plantilla de ARNm (Oka *et al.*, 1995). La precipitación con ácido perclórico (PCA) es uno de los protocolos de desproteización más utilizados; sin embargo, ciertas proteínas y moléculas pequeñas pueden permanecer solubles (Ongay *et al.*, 2010). El ácido perclórico (PCA) se utiliza para la desnaturalización y precipitación de las principales proteínas séricas, y las proteínas alcalinas, que permanecen solubles. La precipitación con (PCA) es un método tradicional para solubilizar y aislar mucoproteínas séricas (proteínas séricas fuertemente glicosiladas) para enriquecer las glicoproteínas en muestras de suero y eliminar proteínas redundantes de las muestras. Este método proporciona una herramienta útil para preparar muestras para el análisis de una variedad de pequeñas moléculas y glicoproteínas como posibles biomarcadores de la progresión de alguna enfermedad (Winzler *et al.*, 1948). Estas proteínas fuertemente glicosiladas podrían proporcionar información relevante para el conocimiento en procesos en los que podrían estar involucrados, lo que puede mejorar el resultado y predecir distintas funciones (Makszin *et al.*, 2019).

La proteína soluble en ácido perclórico del riñón de rata (K-PSP1) también inhibió la síntesis de proteínas libres de células en lisado de reticulocitos de conejo de una manera diferente a la RNasa A. La expresión de K-PSP1 en el riñón del modelo de rata nefrótica depende de la diferenciación. Por otro lado, la expresión de K-PSP1 en células tumorales renales estaba regulada negativamente en comparación con el tejido intacto (Asagi *et al.*, 1998).

La proteína PSP de humano hp14.5 presenta una estructura homotrimérica, donde cada subunidad consiste en un dominio globular formado por seis hojas β y dos α -hélices, dispuestas en una orientación casi paralela a las hojas. La disposición de las hojas β es 1-2-3-6-4-5, donde 4 y 5 están en paralelo y las demás antiparalelas (Manjasetty *et al.*, 2004).

La inhibición del crecimiento del tumor, donde la proteína PSP denominada UK101 está relacionada con la baja proliferación de la capa epitelial y su participación en un mecanismo inmune capaz de actuar en fases tempranas de carcinogénesis (Ghezzi *et al.*, 1999).

Estudios previos han identificado que la expresión de UK114 en humano es específica de tejido y se ha encontrado que la proteína es más abundante en hígado y riñón y UK114 no parece actuar como un gen supresor de tumores; sin embargo, puede ser útil como biomarcador que ayudará a clasificar el estado de diferenciación de las muestras de carcinoma hepatocelular (Chong *et al.*, 2008).

El gen que codifica la proteína TdcF de *E. coli*, un miembro de la familia YjgF/YER057c/UK114, reside en un operón que sugiere fuertemente un papel en el metabolismo del 2-cetobutirato para esta proteína (Burman *et al.*, 2007).

En *Drosophila melanogaster* la proteína DUK114 debido a una similitud de secuencia limitada con Hsp90 (proteína de choque térmico 90), también se ha propuesto que sean chaperonas moleculares y se demostró ser una chaperona molecular muy potente en ensayos *in vitro*. En términos molares, la actividad chaperona del DUK114 de 15 kDa es comparable con la de Hsp90, la chaperona molecular arquetípica casi 6 veces más grande (Farkas *et al.*, 2004).

En *Leishmania infantum*, identificaron proteínas con diferentes funciones, como chaperonas, proteínas de unión a ADN, proteínas de migración celular y metaloproteasas; estas últimas son relevantes dado que están involucradas en procesos de infección: la metalopeptidasa (MA) interactúa con la endoribonucleasa L-PSP, una clase de proteína que actúa sobre ARNm de cadena sencilla mediante la inhibición de la síntesis de proteínas (Da Fonseca Pires *et al.*, 2014).

En *Rhodoseudomonas palustris* se reportó una posible endoribonucleasa L-PSP denominada Rhp-PSP. Esta proteína tiene propiedades antivirales contra el virus del mosaico del tabaco (VMT), se propuso que el mecanismo mediante el cual se logró la inhibición de la infección se debe a su capacidad de degradar el ARN (Su *et al.*, 2015)

Dos miembros de la familia YERO57c/YJGFc están presentes en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que son, Mmf1p es un factor de matriz mitocondrial y el factor homólogo Mmf1p (Hmf1p), los cuales copurifican con la fracción citoplasmática soluble, la función biológica que se ha descrito para estas proteínas es similar: tanto Hmf1p como Yil051cp influyen en el mantenimiento del DNA mitocondrial y el tiempo de división celular (Oxelmark *et al.*, 2000).

En *Salmonella entérica* las proteínas YjgF tienen actividad enamina/imina desaminasa y aceleran la liberación de amoníaco de los intermedios reactivos enamina/imina de la treonina deshidratasa dependiente de piridoxal 5'-fosfato

(Lambrecht *et al.*, 2012). En la (Tabla 1) se muestran distintos organismos incluyendo *T. vaginalis* donde se muestran los códigos de las proteínas ya cristalizadas de esta familia PSPs

Tabla 1. Códigos de PDB de proteínas cristalizadas de la familia PSP

Organismo	Estructura PDB
<i>Escherichia coli</i>	1PF5, 2UYN, 3V4D, 1QU9, 2UYJ, 2UYP
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1JD1, 3QUW
<i>Salmonella typhymurium</i>	3GTZ
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	3LME
<i>Entamoeba histolytica</i>	3MQW, 3M1X, 3M4S
<i>Trichomonas vaginalis</i>	A2DAL5

En *T. vaginalis* hasta el momento se ha descrito de manera funcional una enzima de tipo RNAsa, de la familia de proteínas YER057c/YJGF, cuyo blanco potencial podría ser un ARNm de una proteína que participa en la citotoxicidad del parásito. (Villalobos *et al.*, 2018).

En *T. vaginalis* se caracterizó una PSP que se encuentra en el núcleo, el citoplasma y los hidrogenosomas. Tv-PSP1 tiene una estructura trimérica y una alta estabilidad en solución. El genoma del parásito contiene tres ORF que codifican PSP (tv-psp1, tv-psp2, ytv-psp3), pero solo dos de ellos se expresa el transcrito, según el análisis EST y se propone una supuesta función de ribonucleasa en el parásito (Villalobos *et al.*, 2018).

Para analizar las posibles condiciones en las cuales se expresan los genes de proteínas PSP en *T. vaginalis* se realizó el análisis de EST de los tres marcos de lectura abiertos de genes de las proteínas TvL-PSPs, el gen principal o mayormente expresado en el parásito es el gen que codifica para la proteína Tv-PSP1, seguida por el gen que expresa a la proteína TvL-PSP3, la cual se podría proponer que se expresa en bajas concentraciones de hierro y en condiciones normales de cultivo, aunque en menor cantidad. En lo que respecta al gen de *tv-psp2*, no se detectó su expresión,

posiblemente se deba a que este gen se exprese en una condición ambiental no estudiada aún, ya que no se puede descartar la posibilidad de su expresión en alguna condición a la que sea expuesta el parásito (Fig. 6) (Villalobos-Osnaya *et al.*, 2018). La proteína Tv-PSP1 está regulada negativamente por poliaminas, y es soluble en ácido perclórico (PSP) debido a sus características, se ha considerado que esta proteína participa en un proceso de degradación de RNAm importante en el proceso de citotoxicidad del parásito como *tvcp39*, debido a la presencia de estructuras tallos burbuja tipo ERE en su extremo 3 UTR, que podrían ser reconocidas por Tv-PSP1 (Villalobos, 2009).

107.

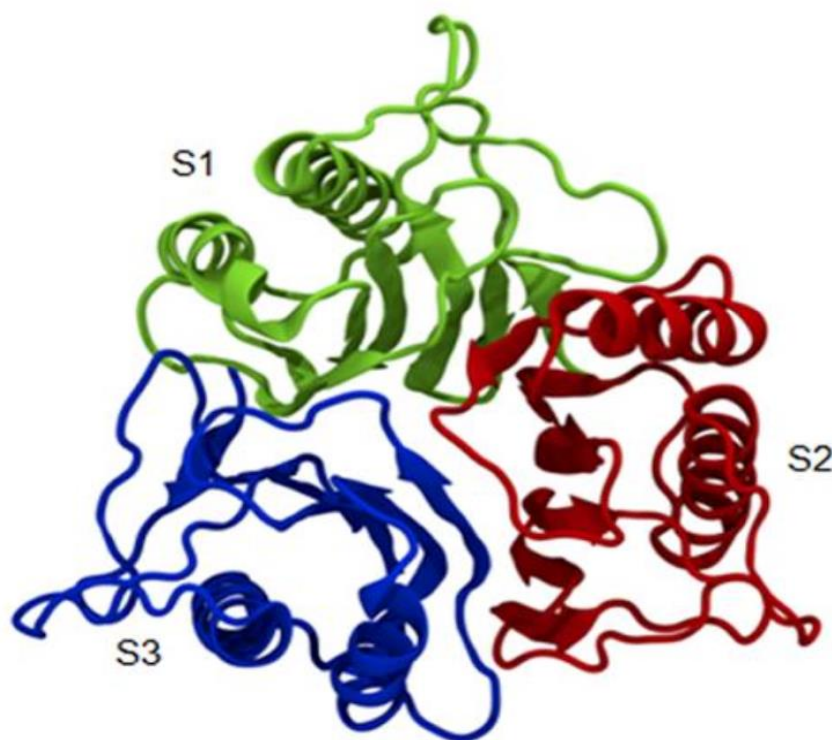


Figura 5. Modelo homotrimérico de la proteína Tv-PSP1. Modelo formado por tres subunidades monoméricas de la proteína Tv-PSP1. Tomada de: Villalobos, 2019.

Para determinar si Tv-PSP1 se une a las secuencias de tallo-bucle de ARNm, (Millán *et al.*, 2023) se realizaron ensayos de cambio de movilidad electroforética (REMSA) y se determinó mediante fluorescencia intrínseca la formación de complejos entre Tv-PSP1 y ambas secuencias de tallo-burbuja. Estos resultados mostraron que

Tv-PSP1 se une a secuencias tallo burbuja, lo que sugiere que puede estar unido a la molécula de ARNm.

Por lo tanto, es muy probable que la proteína Tv-PSP1 de *T. vaginalis* mantenga una función estructural conservada asociada con la regulación del ARNm que funciona en complejos de proteínas ARNm no bien identificados hasta ahora (Millán *et al.*, 2023).

Las PSP tienen diferentes ubicaciones celulares en varios organismos; esto podría estar relacionado con las funciones celulares de esta familia de proteínas (Oka *et al.*, 1995). Por lo que es importante comprender esta familia de proteínas que se encuentran en diferentes organismos y específicamente en *T. vaginalis* dada la importancia que podrían tener en los procesos celulares y moleculares del mismo, ya sea para la supervivencia, virulencia o metabolismo del parásito, por ello nos dimos a la tarea de seguir identificando distintas proteínas PSPs aparte de la (Tv-PSP-1) ya descrita por el método de (Oka *et al.*, 1995) con la precipitación de ácido perclórico siendo la mejor opción para esta familia de proteínas al estar glicosiladas, dicho método nos ayuda a obtener de mejor forma estas proteínas de nuestros extractos a través de distintos ensayos.

3. Justificación

En diferentes organismos se han identificado proteínas solubles en ácido perclórico (PSP) que tienen funciones relevantes para los mismos. En *T. vaginalis* se identificó y caracterizó la proteína Tv-PSP-1 que tiene una función de endorribonucleasa, sin embargo, datos preliminares nos indica la existencia de otras proteínas PSP en el proteoma de este parásito. Por lo que es importante identificar a las otras proteínas PSPs de *T. vaginalis* y predecir de manera *in silico* las posibles funciones en la que se encuentran involucradas para que en un futuro se pueda dilucidar la función de estas proteínas en el parásito.

4. Hipótesis

Las proteínas PSP de *T. vaginalis* participan en funciones relevantes como su adaptación al microambiente, sobrevivencia y virulencia de este parásito.

5. Objetivos

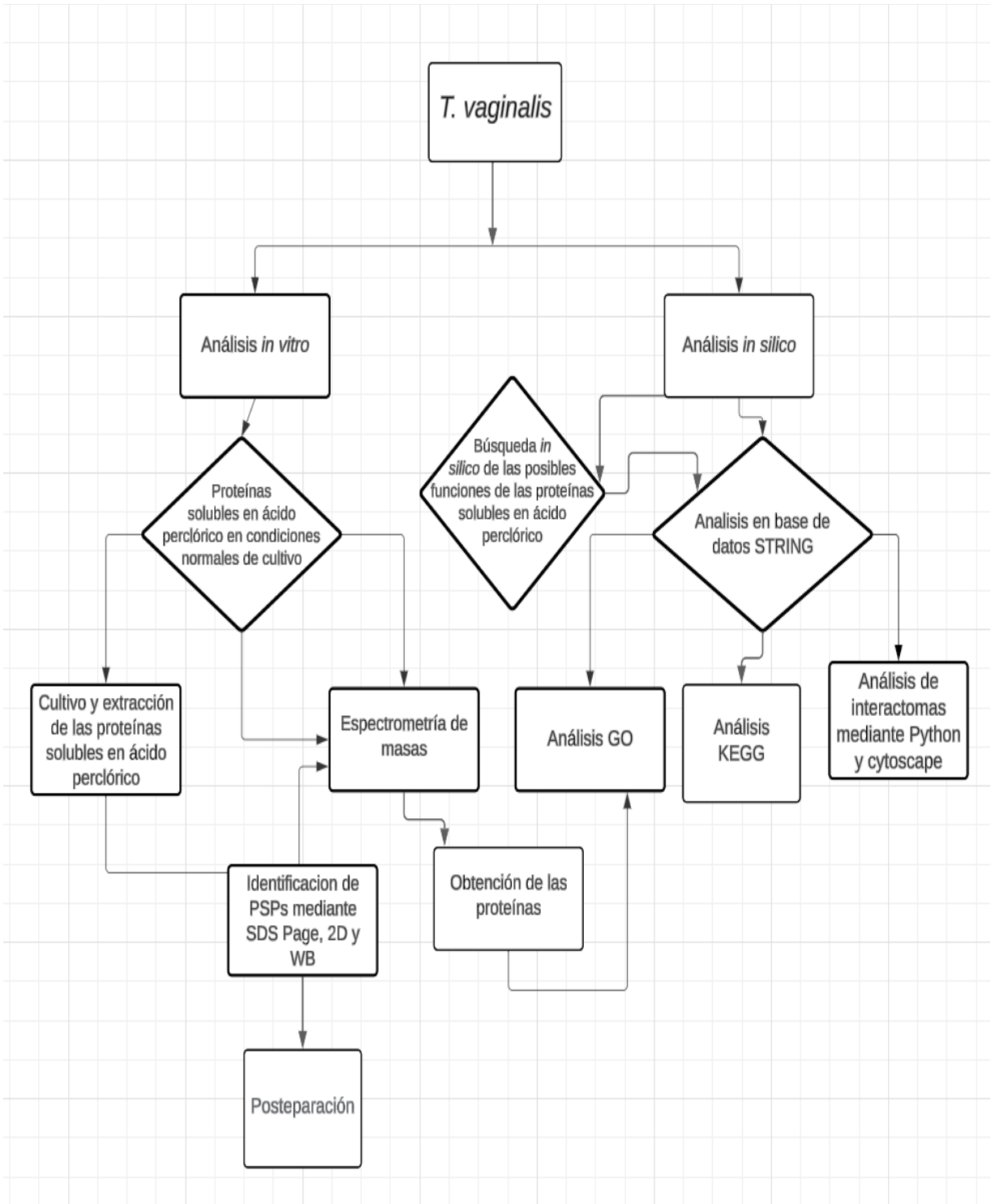
5.1 General

Identificar las proteínas solubles en ácido perclórico de *T. vaginalis* que se expresan en condiciones estandar de cultivo.

5.2 Objetivos Particulares

1. Aislar las proteínas solubles en ácido perclórico en condiciones normales de cultivo de *T. vaginalis*.
2. Identificar a las proteínas solubles en ácido perclórico mediante espectrometría de masas
3. Determinar *in silico* la función putativa de las proteínas solubles en ácido perclórico de *T. vaginalis*.

6. Estrategia experimental.



7. Metodología

7.1 Cultivo de *T. vaginalis*

El aislado CNCD147 de *T. vaginalis* fue cultivado en medio triptona, extracto de levadura y maltosa (TYM) pH 6.2 suplementado con 10% de suero de caballo (Gibco) previamente inactivado por calor. Cada 24h se hizo un pase de cultivo.

7.2 Precipitación de proteínas en ácido perclórico

T. vaginalis (1×10^8) fueron recolectados por centrifugación a $300 \times g$ durante 5 min a 4°C y se lavó tres veces con PBS a pH 7.0. El sobrenadante se resuspendió en un tampón que contenía Tris-Base 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM y DTT 1 mM y se complementó con un coctel de inhibidores de proteasa (Roche). La suspensión se sónico durante 3 minutos en una amplitud del 85% en ciclos de 30/30 (encendido/apagado) y se centrifugó a $10,000 \times g$ durante 60 min a 4°C . Posteriormente, se añadió ácido perclórico (Sigma-Aldrich, Santa Clara, EE. UU.) hasta una concentración final del 5% (v/v) y se centrifugó a $10,000 \times g$ durante 15 min a 4°C . El sobrenadante se recolectó y se precipitó con sulfato de amonio al 20% (Sigma-Aldrich). El sobrenadante de PSP se resuspendió en el mismo tampón descrito anteriormente. La concentración de proteínas se cuantificó espectrofotométricamente a 280 nm usando el Nanodrop (Thermo Scientific). La integridad de las proteínas se analizaron mediante SDS-PAGE teñidos con plata.

7.3. Geles SDS-PAGE al 15%

Se utilizaron 4 cristales de 1mm y se colocaron en un soporte para para dos geles al 15%, posteriormente se hizo la solución separadora con 3.75 mL de H₂O destilada, se agregó 7.50 mL de acrilamida al 30%, se agregó 3.75 mL de la solución 4x tris-Cl/SDS pH 8.8, se añadieron 50 uL de persulfato de amonio (PSA) al 10% y por último 20 uL TEMED y se esperó a que polimerizara durante 20 minutos. Posterior a que pasaron los 20 minutos se preparó la solución concentradora añadiendo 3.05 mL de H₂O destilada, 0.650mL de acrilamida al 30%, se agregó 1.25 mL de solución 4x

Tris-Cl/SDS a un pH de 6.8, se agregaron 25 uL de persulfato de amonio al 10% y por último 10 uL de TEMED.

7.4 Tinción de plata, geles de poliacrilamida

Los geles de poliacrilamida se resuspendieron en solución fijadora que contiene etanol al 40% y ácido acético al 5% toda la noche (ON), posteriormente se le realizaron dos lavados de 20 minutos cada uno con solución de lavado que contiene 10 ml de etanol al 100% y 240 ml de dH₂O₂, se realizaron tres lavados con agua bidestilada por 5 minutos cada uno, se agregó solución de pretratamiento que contiene 0.05 g de AgNO₃ por dos minutos, se realizaron dos lavados con agua bidestilada durante 20 segundos cada uno, se realizaron 3 lavados durante 20 segundos con agua bidestilada, posteriormente se agregó solución de impregnación que contiene 0.5 g de AgNO₃ durante 25 minutos, se realizaron dos lavados por 20 segundos cada uno, posteriormente se agregó solución de revelado que contiene 7.5 g de Na₂CO₃, 0.001g de Na₂SO₂O₃ y 100 ul de formaldehído al 37% durante 10 minutos, se realizaron dos lavados con agua bidestilada durante 20 segundos y por último se agregó solución de paro.

7.5 Western-blot utilizando anticuerpos rTv-PSP1

El extracto de proteínas solubles en ácido perclórico de *T. vaginalis* se corrió en una electroforesis de 1D en geles SDS-PAGE al 15%. Uno de los cuales se tiñó plata y un espejo de éste se transfirió a una membrana de nitrocelulosa en cámara semiseca a 20 V/ 20 min. Una vez concluida la transferencia se tiñó con Rojo de Ponceau para observar la eficiencia de la transferencia, la membrana se destiñó con lavados de PBS pH 7.0, se bloqueó con PBS pH 7.0 / 5% de leche a 4°C durante toda la noche (ON). Al día siguiente se realizaron lavados con PBS pH 7.0 durante 10 min cada uno de ellos, posteriormente se incubó con el anticuerpo primario policlonal (dilución 1:3000) a 4°C / ON, la membrana se lavó 5 veces con PBS pH 7.0 en agitación durante 5 min cada lavado, se incubó con el anticuerpo secundario de ratón anti-cabra acoplado a enzima peroxidasa de rábano (HRP) en una dilución 1:3000 (ZYMED, Invitrogen), transcurridas 2 h, se realizaron 7 lavados con PBS pH 7.0 durante 5 min, finalmente se reveló por quimioluminiscencia con el reactivo Amersham ECL start Western

Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) en el equipo ChemiDoc (Bio-Rad) (Villalobos-Osnaya *et al.*, 2018).

7.6 Electroforesis Bidimensional

Para la primera dimensión, 130 µg de las proteínas solubles en ácido perclórico de *T. vaginalis* se resuspendieron en 120 µL de tampón de rehidratación (7 M de urea, 4 % de CHAPS, 70 mM de DTT, 2 % de anfolinas pH 4-7, trazas de azul de bromofenol; Bio-Rad) y se utilizó para hidratar una tira IPG de (7 cm, pH 3 –10 lineal; Bio-Rad) de forma pasiva durante 16 h. El experimento de enfoque isoeléctrico se realizó en un sistema Protean IEF (Bio-Rad) de la siguiente manera: paso 1: gradiente de 1 a 250 V durante 40 min; paso 2: 4000 V durante 3 h; y paso 3: gradiente de 4000 a 10,000 Vh. Previo a la segunda dimensión, las proteínas fueron reducidas (10 mg/ml DTT) y alquiladas (25 mg/ml de yodoacetamida, Bio-Rad), durante 15 min cada paso, en tampón de equilibrio (6 M urea, 2% SDS, 300 Tris-Cl mM pH 8.8, 20 % de glicerol y 0,002 % de azul de bromofenol) a temperatura ambiente durante 15 min. Las tiras de IPG equilibradas se separaron en geles SDS- PAGE al 15 % (7 cm x 8 cm x 1.0 mm) utilizando el sistema vertical Mini-Protean II Cell (Bio-Rad) y buffer de corrida (0.25 M Tris, 0.2 M glicina y 1% SDS). Los geles se corrieron a 35 mA/gel a temperatura ambiente y se tiñeron con tinción de plata (Villalobos-Osnaya *et al.*, 2018).

7.7 Procesamiento extractos de proteínas de *Trichomonas vaginalis*

Se realizó la reducción de proteínas agregando DTT (Dithiothreitol) llevando la muestra a una concentración de 20 mM de DTT, posteriormente se incubó a 56 °C por 30 min. Después se alquilaron las proteínas agregando IAM (iodoacetamida) lo suficiente para llevar la solución de proteínas a 40 mM de IAM, se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad por 30 min. Al finalizar se agregaron 5 µl de TRIS 0.5 M para llevar la muestra a pH 8 y se adicionaron 0.5 µg de tripsina grado espectrometría de masas para llevar a cabo la digestión de proteínas, se incubó toda la noche a 37 °C. Al día siguiente se detuvo la reacción con ácido fórmico (FA) llevando la muestra al 0.5 % de FA, posteriormente se realizó una limpieza de péptidos para eliminar las sales mediante un cartucho sep-pak C18 (Waters, Part No. WAT054960). Se llevo la muestra a 0.5 ml con solución A (agua ultrapura con 0.5% de ácido fórmico), se hizo un vortex

y un spin. Posteriormente se revisó que el pH estuviera en 3, se activó el cartucho con 1 mL de solución B (solución de 60% acetonitrilo, 40% agua ultrapura y 0.1% ácido fórmico) y se equilibraron con 2 mL de solución A. Posteriormente se hicieron 2 pasaron 2 veces la muestra a través del cartucho y se lavó con 4 mL de solución A. Finalmente se lavó con 500 uL de solución B y luego se pasó por otros 500 uL de solución B evitando la formación de burbujas y se guardó a -80°C hasta su inyección.

7.8 Análisis de HPLC acoplado a MS/MS

Se solubilizaron los péptidos en 20 ul de agua ultrapura, 5% acetonitrilo, 0.1% de ácido fórmico. Se inyectó por duplicado 2 ug de péptidos en el equipo cromatográfico HPLC Dionex Ultimate 3000 Thermo Scientific. Los péptidos se capturan primero en una trampa de péptidos/precolumna Acclaim PepMap 100 C18 (300 μ m x 1,5 cm) (Thermo Scientific) y posteriormente se eluyeron en una columna analítica de separación PepMap C18 ID de 0,3 μ m y longitud de 150 mm, tamaño de partícula de 1,6 μ m. (Bruker Daltonics). Las series cromatográficas se realizan a un flujo constante de 3 uL/min de una mezcla de 0,1 % (v/v) de ácido fórmico en agua (Tampón A, de un sistema Milli-Q) y 0,1 % (v/v) de ácido fórmico en acetonitrilo (Tampón B, grado HPLC de Sigma-Aldrich) en un gradiente de 90 min de 4-40% B, seguido de 5 min de lavado a 90% de B, y equilibrado por 10 min a 4% de B.

Para el análisis por espectrometría de masas, la ionización por electropulverización de los péptidos eluidos se realiza con una fuente de ionización Apollo/ESI (Bruker) en modo positivo, voltaje de pulverización a 1.5 kV, temperatura de 150 °C. Los espectros de masas se adquirieron con un espectrómetro de masas con analizador tipo trampa de iones (Amazon Speed, Bruker) y se operó en un modo positivo.

7.9. Interactoma de las proteínas que cumplieron los criterios de inclusión.

Las proteínas que cumplieron con nuestros criterios de inclusión (score ms, número de péptidos) fueron buscadas en la literatura y con ellas se formó un set de datos (Tabla 3). Este set de datos fue cargado en la plataforma String database (<https://string-db.org/>) donde construimos el interactoma proteína-proteína.

Posteriormente, se analizó la condensación de la red, nodos con mayor número de interacciones (degree) y cuellos de botella (BottleNeck) del interactoma, esto se

llevó a cabo por medio del lenguaje de programación Python 3.0 utilizando la interfaz de Google Colaboratory.

Para la visualización de la red PPI se utilizó el software CytoScape 3.10.2 (<https://cytoscape.org/>), se graficó la red PPI tomando en cuenta únicamente las interacciones que han sido descritas experimentalmente, se adiciono un top 5 que muestran los nodos con el mayor número de interacciones y uno que muestra los cuellos de botella, esto con la finalidad de identificar las proteínas con un mayor número de interacciones.

Adicionalmente se realizó un análisis Gene Ontology Enrichment (GO) con el set de proteínas cargándolas en la plataforma String database (<https://string-db.org/>) para obtener de estas un enriquecimiento funcional identificando los procesos biológicos, funciones moleculares y componentes celulares en los que están involucradas estas proteínas. Finalmente se realizó un análisis KEGG y análisis de ESTs con los ID de los genes de las 45 proteínas mediante la base de datos TrichDB para cada análisis.

8. Resultados

8.1 Perfil de proteínas solubles en ácido perclórico electroforesis primera dimensión

Las proteínas solubles en ácido perclórico (PSP) se caracterizan por ser proteínas muy conservadas y con pesos moleculares de alrededor de 14 kDa por lo que el objetivo fue encontrar distintas proteínas PSP a partir de los extractos de *T. vaginalis* además de PSP1. Los sobrenadantes de los extractos proteínicos precipitados con ácido perclórico con 20% de sulfato de amonio, resuspendidos en el buffer M3 y analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE AL 15%) en donde logramos observar al menos de 10 a 11 bandas en distintos pesos moleculares. A pesar de que estas proteínas se caracterizan por tener pesos bajos, encontramos bandas en pesos más altos y esto se podría asociar a que también las proteínas del Grupo de alta movilidad (HMG), además de que también podemos observar bandas en los pesos de 13.5 o 14 kDa que es el peso en el que se encuentra PSP1 y se tomó como un control positivo de nuestro extracto de que nuestra extracción está en las condiciones de ácido de perclórico. (Fig 6A).

Posteriormente utilizando los anticuerpos obtenidos por (Villalobos-Osnaya *et al.*, 2018) anti-Tv-PSP1, se inmuno-detectó la proteína PSP1 demostrando la presencia de proteínas solubles en ácido perclórico (Fig. 6B).

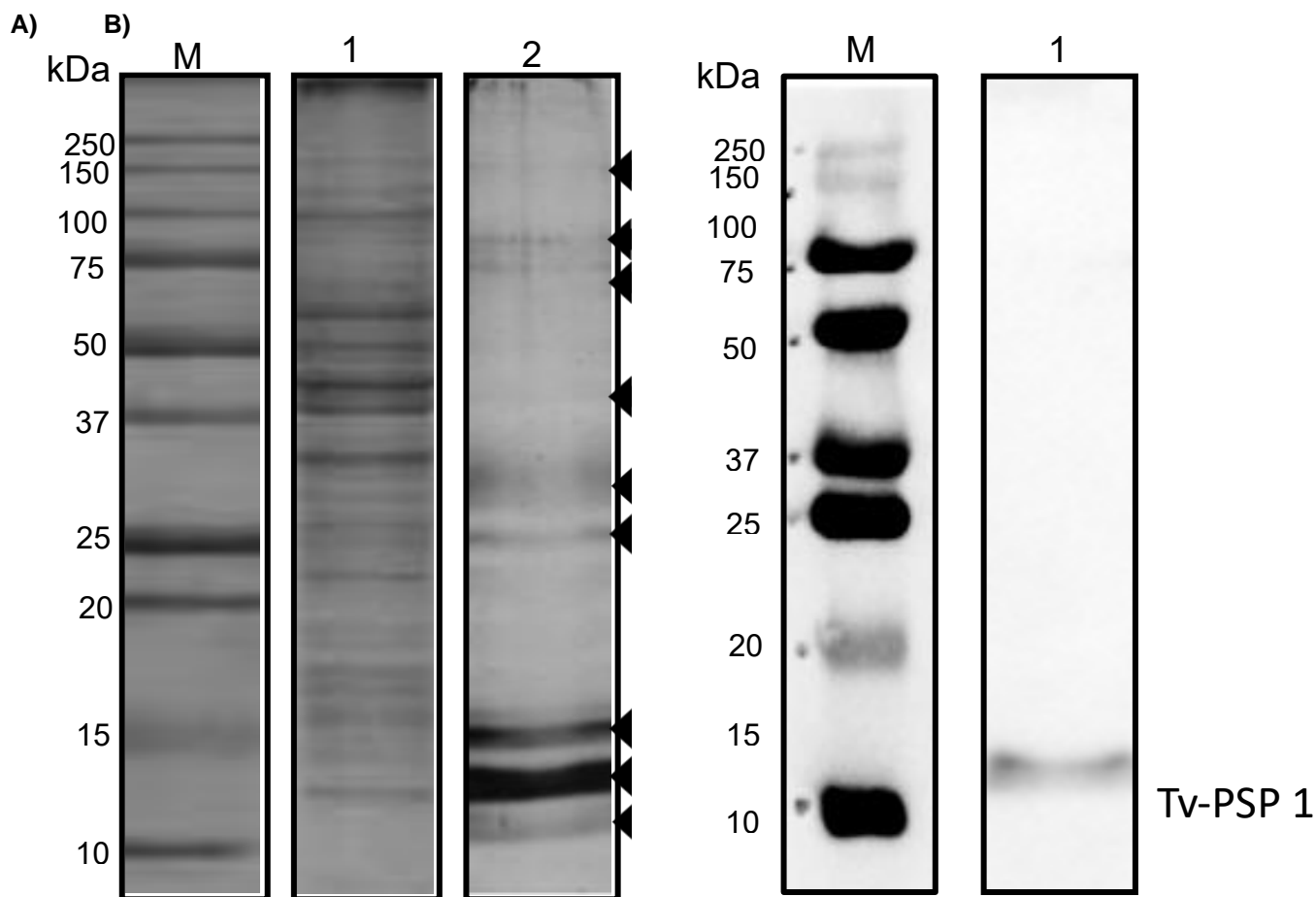
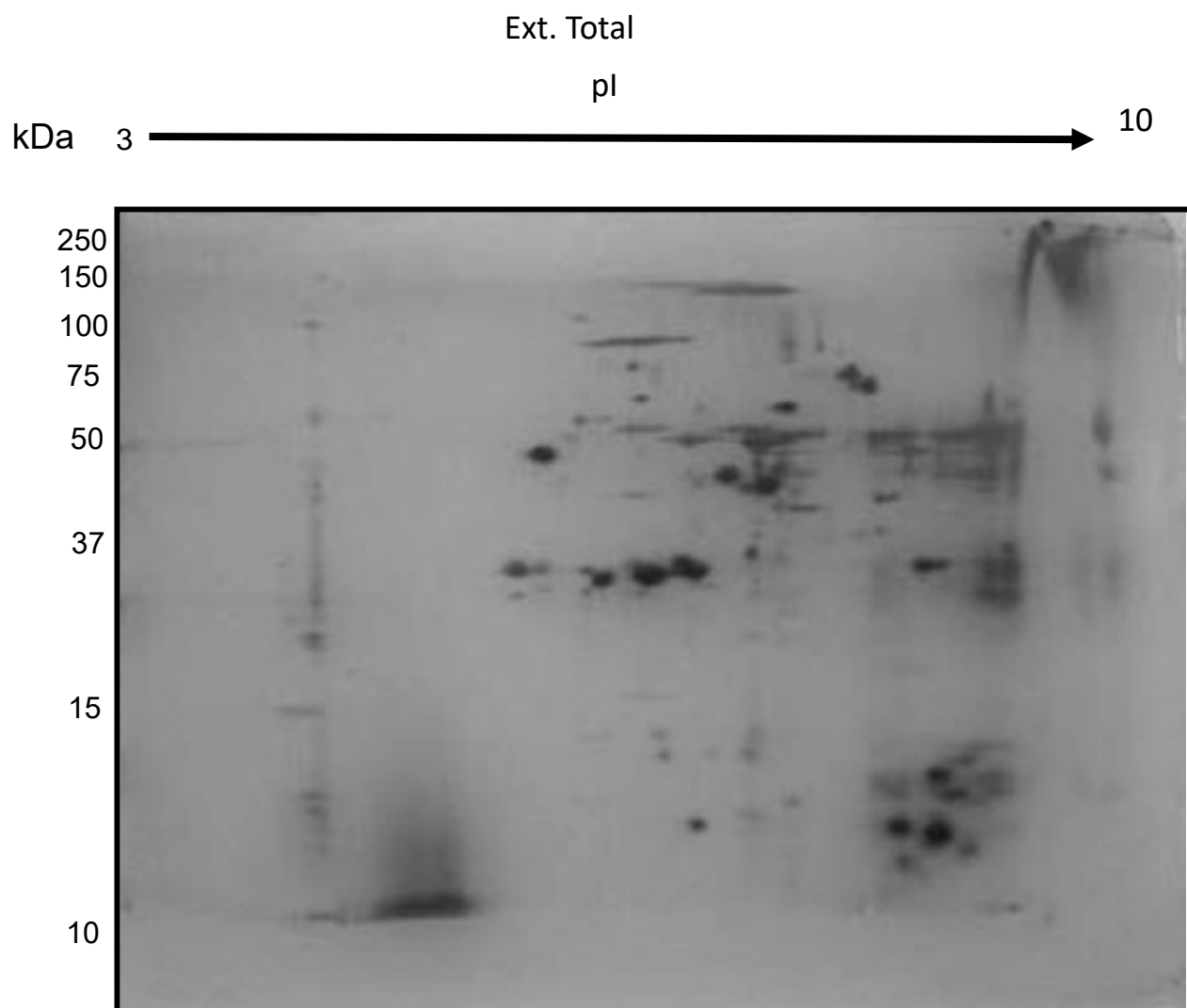


Figura 6. Obtención de proteínas solubles en ácido perclórico (A) Gel de SDS-PAGE al 15% en una dimensión teñido con plata. Carril M: Marcador de peso. Carril 1: Extractos de proteínas totales de *T. vaginalis*, de los cuales se obtuvieron las proteínas solubles en ácido perclórico, se muestran en carril 2, las puntas de flecha marcan las bandas que corresponden a las PSPs. (B) Western blot con los anticuerpos α -rTV-PSP1 dirigido contra las proteínas solubles en ácido perclórico.

8.2 Análisis proteómico de las proteínas solubles en ácido perclórico.

Mediante electroforesis bidimensional, se obtuvieron spots en nuestro gel del extracto total de *T. vaginalis* (figura 7), por otro lado, en el gel de las proteínas solubles en ácido perclórico (figura 7B) también identificamos otros spots y se hizo un análisis de Pdquest para comparar estos spots obteniendo la Tv-PSP1 como se muestra con la flecha roja que se tomó como control positivo de que nuestro extracto era viable con

un peso de 13.5 kDa y de igual forma otros spots en diferentes puntos isoeléctricos que posteriormente se realizó una espectrometría de masas para identificar estas proteínas.



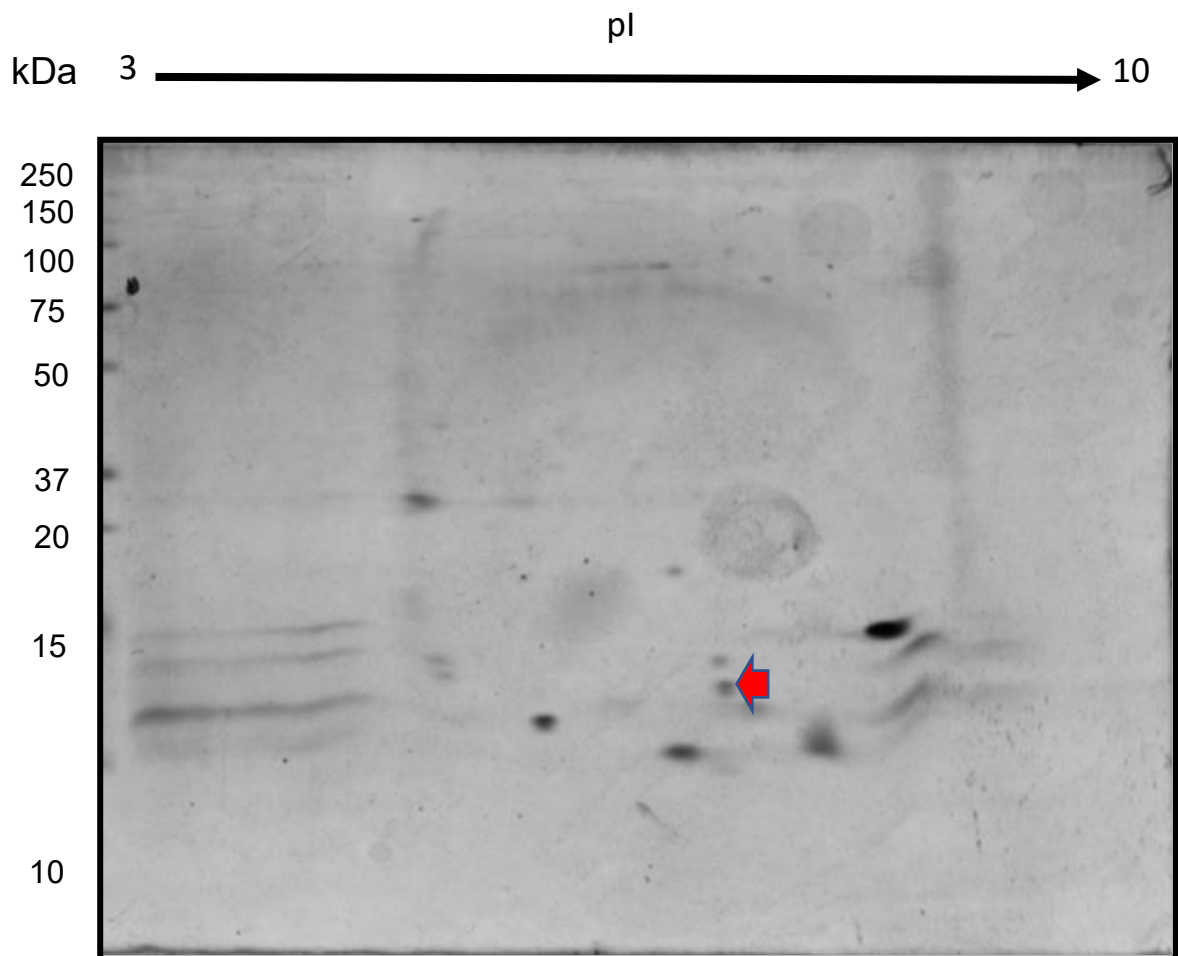


Figura 7. Análisis por PDQuest de la electroforesis bidimensional. A) Gel control de los extractos totales de *T. vaginalis*. B) Gel de las proteínas solubles en ácido perclórico con la proteína Tv-PSP1.

8.3 Identificación de las proteínas solubles en ácido perclórico por HPLC-MS/MS

Para identificar las proteínas solubles en ácido perclórico de *T. vaginalis* en condiciones normales de cultivo se procedió a hacer un análisis de espectrometría de masas, donde a partir de este análisis se identificaron 77 proteínas en total y de estas proteínas solamente nos quedamos con 45 (Tabla 4), ya que para esto nos basamos en dos parámetros que validaban estas proteínas. Estos parámetros según el software

y la base de datos utilizados, los cuales fueron en número de puntaje (Score) que iban de 52.2-441.5, esto significa que, a mayor score, mayor es la certeza en la identificación que nos indica la calidad o la confianza de la identificación de un compuesto o proteína en la base al espectro obtenido. Generalmente, el score se calcula comparando el espectro experimental con un espectro de referencia en una base de datos, y el otro parámetro es el número de péptidos los cuales eran \geq a 2, y esto significa que mientras más péptidos, mayor es la probabilidad de que estas proteínas este en nuestra muestra, por lo que se escogieron las proteínas con mayor score, y mayor número de péptidos. De estas proteínas identificadas también teníamos que identificar a la proteína Tv-PSP-1, debido a que solamente esta proteína se encuentra en condiciones normales cultivo que es la condición en la que trabajamos y que la obtuvimos también en el WB, a comparación de las otras dos PSPs que ya se han descrito previamente como lo fue la Tv-PSP-2 que se ha mencionado que se expresa en condiciones bajo estrés, ya sea de algún catión o el ambiente, y la Tv-PSP-3 que se expresa bajo condiciones bajas de hierro, por lo que Tv-PSP-1 iba a seguir siendo nuestro control positivo de este extracto, lo que nos indicaba que estas proteínas tenían la condición de ser precipitadas con el ácido perclórico. Dentro de estas proteínas logramos identificar Tv-PSP-1 con el código A2DAL5 como lo podemos ver en la tabla (Tabla 3).

Tabla 3. Proteínas totales obtenidas de la espectrometría de masas.

Número	Código proteína	Scores	Péptidos
1	A2HXI6	441.5 (M:441.5)	7
2	A2FE19	275.0 (M:275.0)	5
3	A2DYS0	253.3 (M:253.3)	6
4	A2DXL4	253.2 (M:253.2)	5
5	A2EBB4	233.7 (M:233.7)	4
6	A2DI06	224.5 (M:224.5)	5
7	A2ER97	223.0 (M:223.0)	5
8	A2EIR1	217.4 (M:217.4)	5
9	A2FPT8	196.2 (M:196.2)	3
10	A2EQB9	194.5 (M:194.5)	5
11	A2G5X6	183.9 (M:183.9)	3
12	A2EYN3	183.4 (M:183.4)	4
13	A2HNG1	182.4 (M:182.4)	4
14	A2DVQ8	176.9 (M:176.9)	5
15	A2FNQ3	160.4 (M:160.4)	3
16	A2FPV1	157.8 (M:157.8)	2
17	A2DY95	157.0 (M:157.0)	3
18	A2EJJ0	151.7 (M:151.7)	3
19	A2DQN8	147.6 (M:147.6)	3
20	A2DKF7	120.4 (M:120.4)	2
21	A2DAL5	116.6 (M:116.6)	3
22	A2FC65	109.7 (M:109.7)	2
23	A2DGQ4	108.3 (M:108.3)	3
24	A2FNW2	102.1 (M:102.1)	2
25	A2EUN9	101.8 (M:101.8)	2
26	A2FKH3	95.9 (M:95.9)	2
27	A2EW20	93.8 (M:93.8)	2
28	A2F0E3	92.3 (M:92.3)	2
29	A2FXW1	88.1 (M:88.1)	2
30	A2EKE3	87.1 (M:87.1)	3
31	A2EHA7	81.7 (M:81.7)	2
32	A2E5A4	80.1 (M:80.1)	2
33	A2F2J0	79.7 (M:79.7)	2
34	A2DB09	76.7 (M:76.7)	2
35	A2DD88	75.4 (M:75.4)	2
36	A2FZS0	71.5 (M:71.5)	2
37	A2E6Z8	68.1 (M:68.1)	2
38	A2D8B6	66.3 (M:66.3)	2
39	A2DTU7	65.3 (M:65.3)	2
40	A2F5G9	63.4 (M:63.4)	2
41	A2FB71	55.0 (M:55.0)	2
42	A2ENX0	53.0 (M:53.0)	2

43	A2FJ82	52.9 (M:52.9)	1
44	A2FJ30	52.6 (M:52.6)	1
45	A2E8J5	52.2 (M:52.2)	1
46	A2DDE2	49.2 (M:49.2)	1
47	A2FLK9	49.1 (M:49.1)	1
48	A2E9R8	49.0 (M:49.0)	1
49	A2D9I7	48.5 (M:48.5)	1
50	A2EIJ3	47.3 (M:47.3)	1
51	A2DLE4	43.9 (M:43.9)	1
52	A2EER9	43.6 (M:43.6)	1
53	A2FYE5	41.5 (M:41.5)	1
54	A2FKF2	40.3 (M:40.3)	1
55	A2DSV0	40.0 (M:40.0)	1
56	A2DCS2	39.7 (M:39.7)	1
57	A2F093	39.1 (M:39.1)	1
58	A2F601	38.1 (M:38.1)	1
59	A2EKF3	38.0 (M:38.0)	1
60	A2ER26	37.5 (M:37.5)	1
61	A2E2L7	37.4 (M:37.4)	1
62	A2EGT7	36.9 (M:36.9)	1
63	A2DSX4	36.4 (M:36.4)	1
64	A2F7J8	36.0 (M:36.0)	1
65	A2DGW2	35.6 (M:35.6)	1
66	A2DST7	35.0 (M:35.0)	1
67	A2D8B8	89.8 (M:89.8)	1
68	A2EBX0	77.1 (M:77.1)	1
69	A2DEJ9	76.1 (M:76.1)	1
70	A2EXW7	74.3 (M:74.3)	1
71	A2EJC2	62.2 (M:62.2)	1
72	A2E7T1	59.1 (M:59.1)	1
73	A2FCW8	58.0 (M:58.0)	1

Tabla 4. PSPs de *T. vaginalis* identificadas por espectrometría de masas.

°N	Código proteína	Proteína	kDa	pI
1	A2HXI6	Proteína no caracterizada.	32.1	4.4
2	A2FE19	TolA, putativa.	20.2	7.8
3	A2DYS0	Proteína ribosomal 40S S25	12.6	9.8
4	A2DXL4	TolA, putativa.	22.5	7.2
5	A2EBB4	Enolasa 2, putativa.	51.2	5.8
6	A2DI06	Proteína ribosomal ácida 60s	10.9	4.5
7	A2ER97	Proteína ribosomal 40S S25;	12.6	9.8
8		Proteínas ribosomales eucariotas P1/P2.	10.8	4.4
	A2EIR1			
9		Proteína ribosomal 40S S5, putativa	21.6	9.3
	A2FPT8			
10		Proteína de choque térmico citoplasmática 70	71.3	5.2
	A2EQB9			
11	A2G5X6	Proteína ribosomal 40S S7	18.7	9.6
12		Proteína ribosomal L13e, putativa.	24.5	10.3
	A2EYN3			
13	A2HNG1	Actina	40.2	5.3
14	A2DVQ8	Proteína no caracterizada.	1014.3	5.2
15		Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.	39.2	7
	A2FNQ3			
16	A2FPV1	Proteína ribosomal ácida 60s	10.9	4.5
17	A2DY95	Proteína ribosomal ácida 60s	10.8	4.2
18		Proteína no caracterizada.	10	10.4
	A2EJJ0			
19	A2DQN8	Proteína no caracterizada.	7.6	10.2
20		Proteína ribosomal L13e, putativa.	21.9	10.6
	A2DKF7			
21		Inhibidor putativo de la iniciación de la traducción.	13.4	6.1
	A2DAL5			
22	A2FC65	Proteína no caracterizada.	11.4	5.7
23		Proteína ribosomal S10p/S20e, putativa.	13.8	9.6
	A2DGQ4			
24		Proteína de unión a actina, putativa.	36.2	5.3
	A2FNW2			
25		Proteína de la familia de la caja HMG.	11.4	6.6
	A2EUN9			
26	A2FKH3	Cadena ligera de dineína	10.4	6.8
27	A2EW20	Cadena alfa de tubulina	27.3	5.1

28	A2F0E3	Ferredoxina 4.	11.7	5.2
29	A2FXW1	Proteína ribosomal L6 60S, putativa	16	9.6
30	A2EKE3	Adhesina AP65-1.	63.2	7.2
31	A2EHA7	Proteína no caracterizada.	59.7	9.4
32	A2E5A4	Ferredoxina putativa.	10.7	4.7
33	A2F2J0	Proteína ribosomal L32, putativa	16.6	10.8
34	A2DB09	Proteína ribosomal L12 60S, putativa	15.2	9.8
35	A2DD88	Factor de elongación 1 alfa	17.2	9
36	A2FZS0	Proteína que contiene el dominio C2.	27.9	5.8
37	A2E6Z8	Proteína ribosomal L8, putativa.	144.2	10.5
38	A2D8B6	Proteína que contiene el dominio C2.	26.9	6
39	A2DTU7	Nucleósido difosfato quinasa.	33.3	6.1
40	A2F5G9	Tiorredoxina	12	5
41	A2FB71	Subunidad beta del complejo asociado al polipéptido naciente.	15.1	7.8
42	A2ENX0	Proteína de la familia de las flavodoxinas.	14.8	6.3
43	A2FJ82	Proteína Hsp90	28.9	4.8
44	A2FJ30	Malato deshidrogenasa, putativa.	35.7	6
45	A2E8J5	Proteína no caracterizada.	15.2	8.3

8.4 Interactoma de las proteínas solubles en ácido perclórico

El interactoma obtenido en la plataforma STRING (figura 8) muestra las 45 proteínas solubles en ácido perclórico de *T. vaginalis* representadas por los nodos, y un total de 226 aristas o interacciones. Un coeficiente de agrupamiento local de 0.573. Nuestro interactoma muestra una red condensada, lo que nos indica que las proteínas están muy relacionadas en procesos y/o funciones celulares. Nuestra red parece tener una topología característica de una red libre de escala, donde se observan unos pocos nodos que tienen un gran número de conexiones, mientras que la gran mayoría de los nodos presentan pocas conexiones. Para corroborar la topología de la red se analizó la distribución de grados mediante un diagrama de frecuencias realizado en Python (figura 9). La distribución de grados indica una tendencia lineal decreciente, y no una

tendencia típica de la ley de potencias que es característica de una red libre de escala, sin embargo, dada la poca cantidad de proteínas analizadas en esta red, no podemos asegurar o negar un comportamiento de red libre de escala. Esto nos indica que las proteínas están muy interconectadas entre sí y concuerda con la condensación de la red.

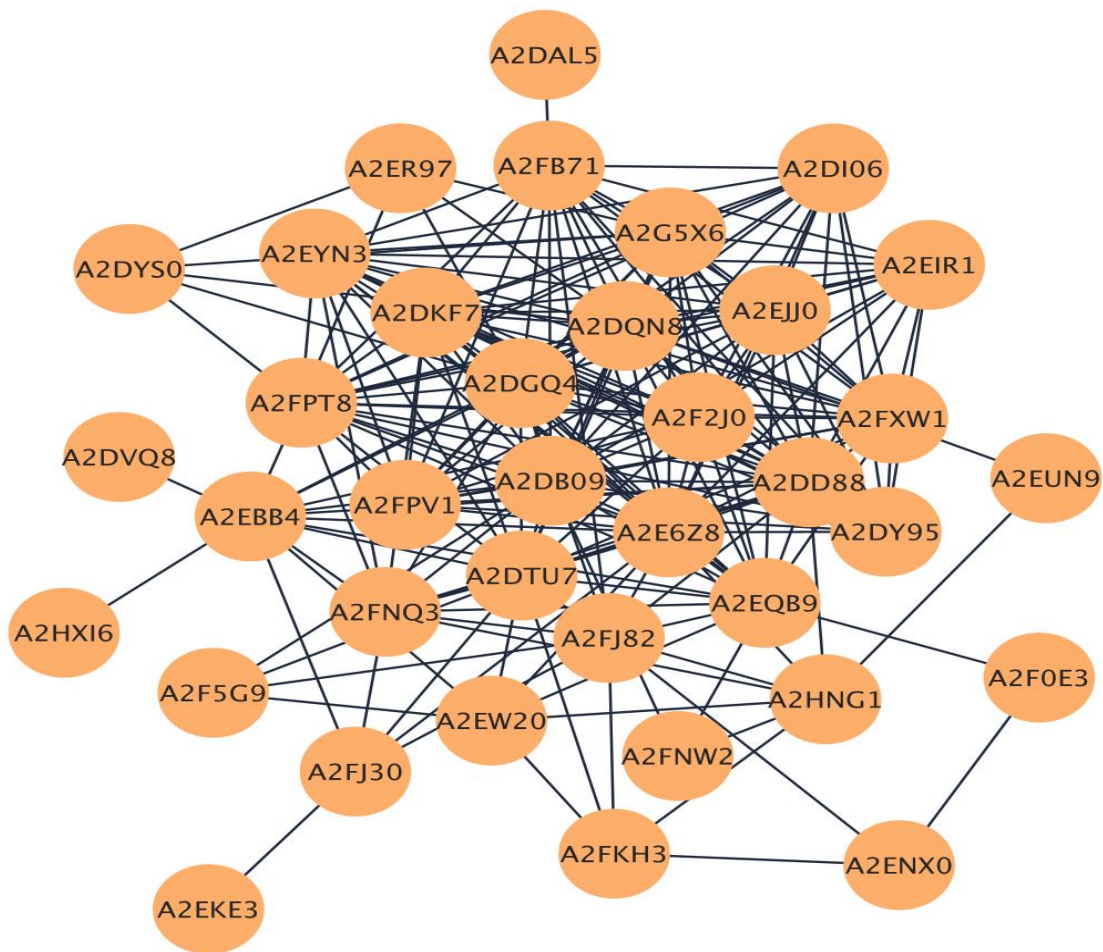


Figura 8. Interactoma de las PSPs de *T. vaginalis* identificadas. Interactoma obtenido mediante la herramienta de STRING.

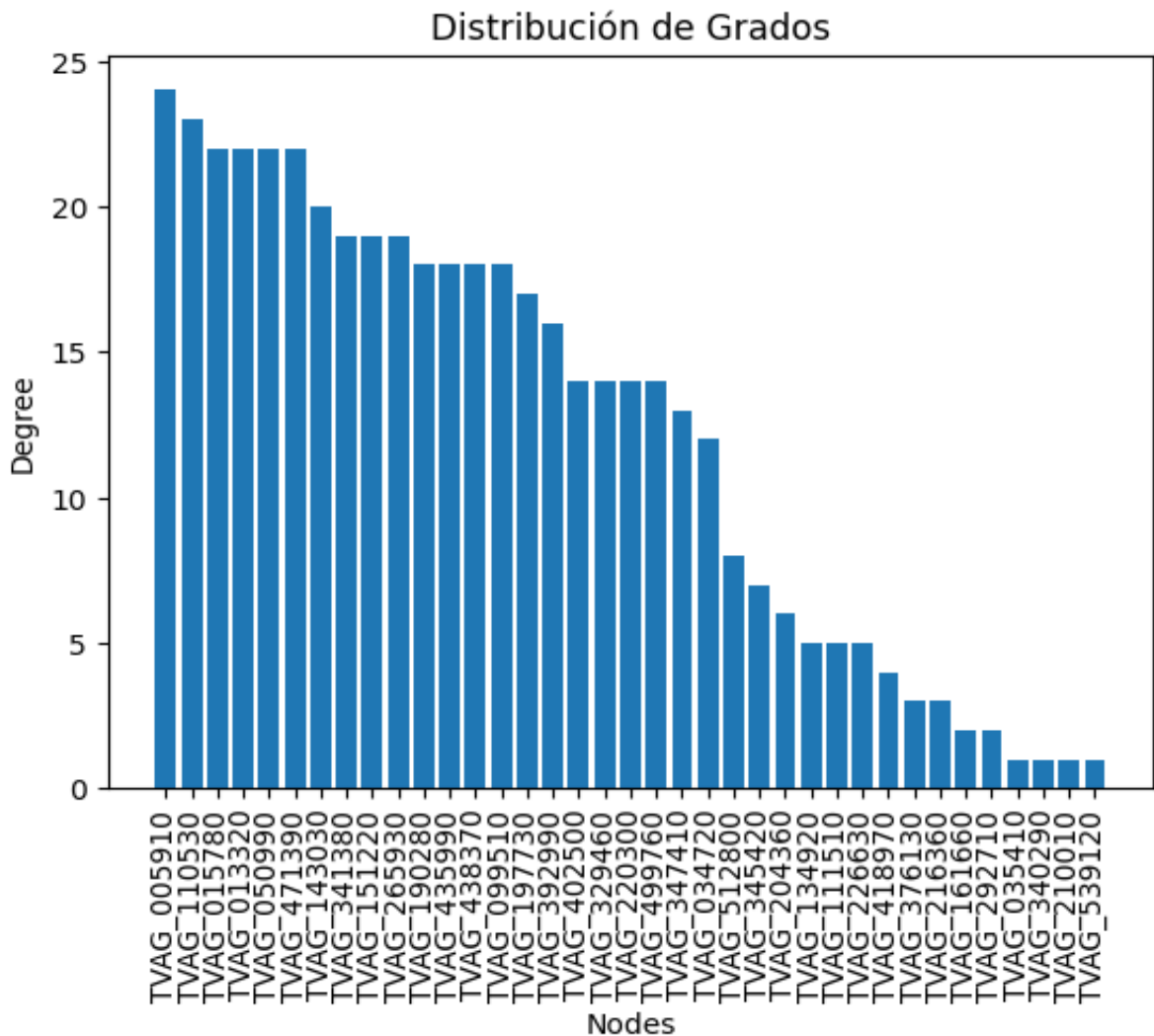


Figura 9. Distribución de grados de las proteínas obtenido en Phyton. Se interpretó con esta gráfica cómo están distribuidas las proteínas y a la red que corresponden, la cual es una red libre de escala ya que hay muchos nodos interconectados.

8.5 Grados de los nodos

Posteriormente, obtuvimos el top 5 de las proteínas más interconectadas (degree) y debido también a la distribución de grados (Figura 9) que nos muestra que las primeras 5 proteínas o nodos tienen el mayor número de conexiones y al hacer este top 5 tenemos un comportamiento más específico de las proteínas con mayor número de conexiones y así conocer cuáles son las proteínas más conectadas de la red y el número de conexiones que tiene con otros nodos. Las proteínas dentro de nuestro top 5 son: Proteína ribosómica 40S S5, factor de elongación 1 alfa, proteína ribosómica putativa L8, proteína ribosómica putativa 60S L12 y proteína ribosómica

putativa S10p/S20e (figura 10). Estas proteínas tienen relevancia ya que en su mayoría son proteínas ribosomales, las cuales están implicadas en la síntesis de proteínas, aunque una de estas que es Proteína ribosómica L8, putativa se ha visto que participa en la oncogénesis y generación de tumores y no solamente en procesos ribosomales, al igual que en Factor de elongación 1 alfa, la cual es una proteína que cataliza la unión GTP dependiente del ARN de transferencia de aminoacil (aa-tRNA) a los ribosomas, regulando así la fidelidad y tasa de elongación del polipéptido durante la traducción. Por lo tanto, estas proteínas son relevantes en el flujo e información y podrían estar relacionadas con la traducción proteica o la interesante proteína relacionada con la oncogénesis que podría estar relacionada con el parásito.

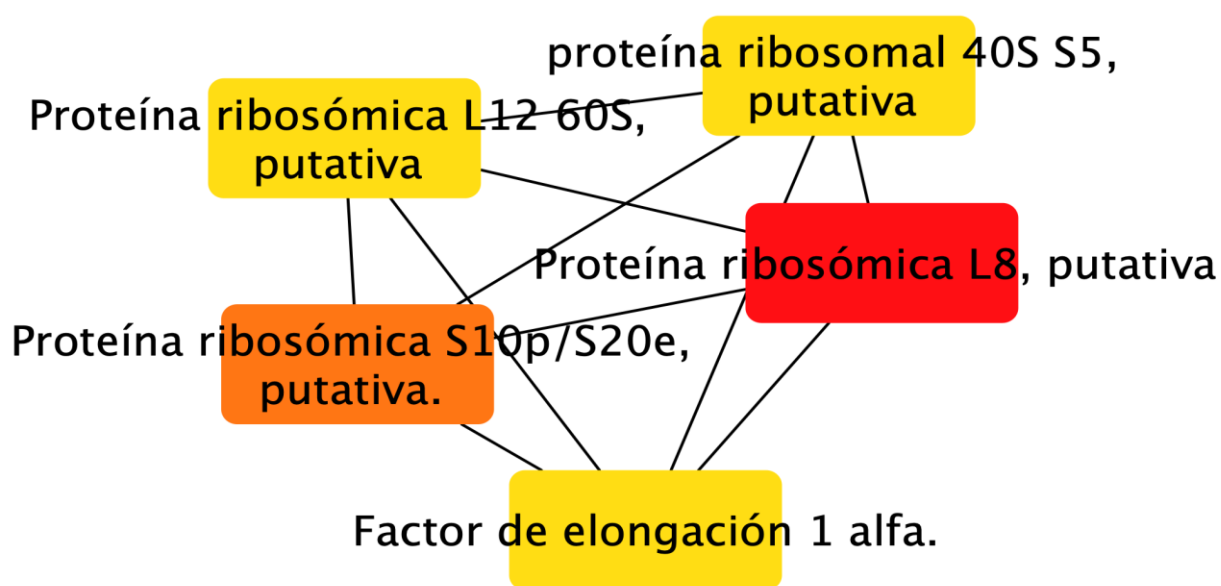


Figura 10. Interactoma representando el degree de las proteínas más interconectadas. Se obtuvo un top 5 degree obtenido en cytoscape de 5 proteínas

Tabla 5. Proteínas mas interconectadas

Proteína	Nombre de la proteína	Función biológica
A2FPT8	40S ribosomal protein S5	La proteína ribosomal RPS5 es una de las principales proteínas para combinarse con el ARN y pertenece a la familia de proteínas ribosomales conservadas. Desempeña un papel sustancial en el proceso de traducción y también tiene algunas funciones no ribosómicas (Qiu <i>et al.</i> 2023)
A2DD88	Factor de elongación 1 alfa	Catalizan la unión GTP dependiente del ARN de transferencia de aminoacil (aa-tRNA) a los ribosomas, regulando así la fidelidad y tasa de elongación del polipéptido durante la traducción. (Condeelis, 1995)
A2E6Z8	Proteína ribosómica L8, putativa	La proteína ribosómica L8 (RPL8) no sólo tiene importantes funciones reguladoras no ribosómicas sino que también participa en la oncogénesis y el desarrollo de tumores. (Xu <i>et al.</i> 2023)
A2DB09	60S ribosomal protein L12, putative	Estas proteínas ribosómicas desempeñan un papel importante en la síntesis de proteínas, se sabe que otras proteínas ribosómicas participan en la proliferación celular, la apoptosis, la regulación del desarrollo y la transformación maligna al participar en la replicación, la transcripción, el procesamiento del ARN y la reparación del ADN. (Liang <i>et al.</i> 2020)
A2DGQ4	Ribosomal protein S10p/S20e, putative.	Sin reportes previos

8.6 Cuellos de botella.

Los cuellos de botella o *bottleneck* (figura 13) son importantes, suelen ser proteínas reguladoras clave en procesos biológicos. Su función puede influir en la estabilidad y eficiencia de las interacciones en la red, afectando procesos como la señalización celular, el ciclo celular y la respuesta a estímulos externos (tabla 6). Por lo tanto, entender estas interacciones puede ayudar a identificar dianas terapéuticas para el tratamiento de la tricomoniasis.

Las proteínas que identificamos en el top 5 cuellos de botella son: La proteína de choque térmico citoplásmico 70; proteína hsp90, factor de elongación 1 alfa, proteína ribosómica putativa L8, y proteína ribosomal 40S S28. De estas proteínas encontramos dos proteínas dentro de la familia de chaperonas que están implicadas en la homeostasis de las proteínas dentro de las células, además de que se sabe que son proteínas multifuncionales por lo que es relevante dentro de este interactoma al saber que tienen funciones relevantes dentro del parásito cruciales para su supervivencia y la función que rigen estas proteínas también han tenido relación a las PSPs. Volvimos a encontrar proteínas de tipo ribosomal que participan en mecanismos de traducción y síntesis de proteínas como la proteína ribosómica putativa L8, la cual también está presente en el top de las proteínas más interconectadas, lo que tiene relevancia ya que esta proteína no solamente tiene funciones ribosómicas sino también funciones no ribosómicas, la cual se ha visto implicada en la oncogénesis y desarrollo de tumores y en este top cuellos de botella volvemos a encontrar a la factor de elongación 1 alfa que en este topo es la proteínas que controla el mayor flujo de la información de nuestra red y que como ya se describió previamente tiene funciones importantes en la elongación de los péptidos durante la traducción y que al tener este flujo de información podría ser importante para el parasito debido a que está implicada en la maquinaria de la traducción al igual que en otros organismos como en *Giardia intestinalis* y *Saccharomyces cerevisiae*.

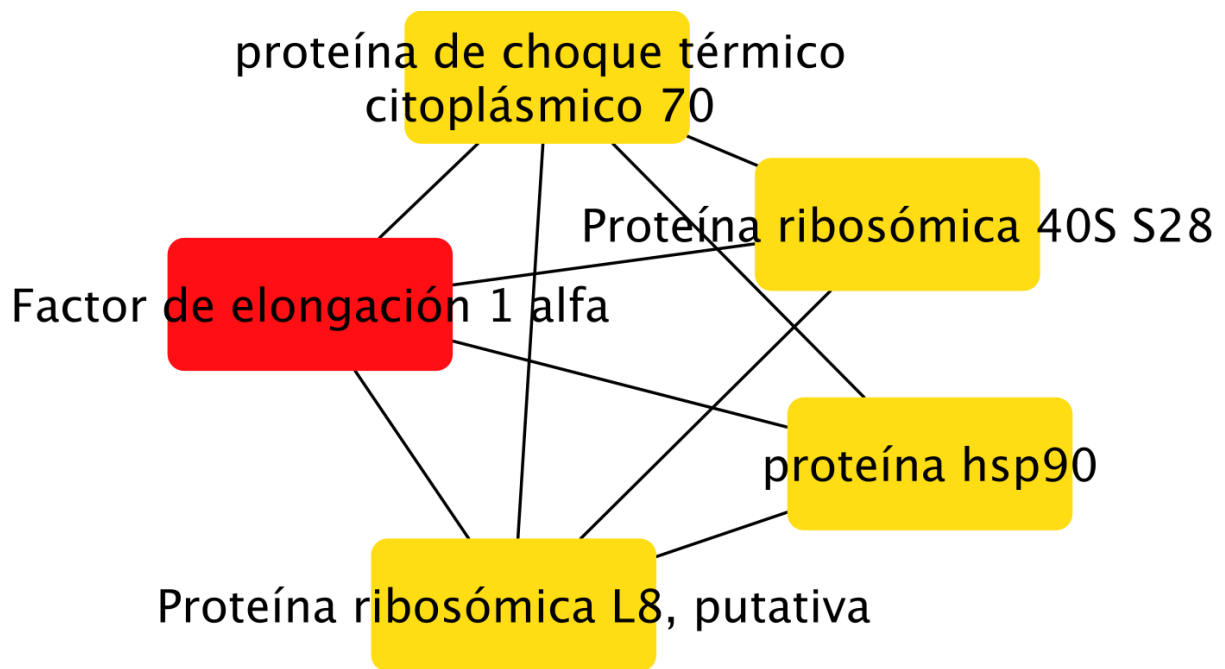


Figura 11. Interactoma cuellos de botella. Interactoma representando a las cinco proteínas PSP siendo los cuellos de botella obtenidos en cytoscape.

Tabla 6. Cuellos de botella del interactoma de las proteínas solubles en ácido perclórico.

Proteína	Nombre de la proteína	Función biológica
A2EQB9	Proteína de choque térmico citoplásmico 70	Funcionan prácticamente en todas las etapas de la vida de las proteínas, desde la síntesis hasta la degradación y, por lo tanto, son cruciales para mantener la homeostasis de las proteínas, con implicaciones directas para la salud humana. (Rosenzweig <i>et al.</i> , 2019)
A2DD88	Factor de elongación 1 alfa	Catalizan la unión GTP dependiente del ARN de transferencia de aminoacil (aa-tRNA) a los ribosomas, regulando así la fidelidad y tasa de elongación del polipéptido durante la traducción. (Condeelis, 1995)
A2E6Z8	Proteína ribosómica putativa L8,	La proteína ribosómica L8 (RPL8) no sólo tiene importantes funciones reguladoras no ribosómicas sino que también participa en la oncogénesis y el desarrollo de tumores. (Xu <i>et al.</i> 2023)

A2FJ82	Proteína hsp90	Desempeña un papel esencial en muchos procesos celulares, incluido el control del ciclo celular, la supervivencia celular, las hormonas y otras vías de señalización. (Jackson 2013)
A2DQN8	Proteína ribosomal 40S S28	S28E puede controlar el empalme y el recambio del ARN precursor en el proceso de maduración del ARNm.

8.7 Análisis de GO de las proteínas solubles en ácido perclórico de *T. vaginalis*

En análisis de GO es un marco estandarizado utilizado para describir las funciones biológicas de los genes y las relaciones entre ellos, se utiliza ampliamente en el análisis de enriquecimiento funcional para identificar las funciones biológicas que están sobrerrepresentadas en un conjunto de genes o proteínas. A partir del interactoma de las proteínas solubles en ácido perclórico de *T. vaginalis*, se identificó que, a partir del valor de la fortaleza obtenido por *string*, el cual es una medida que describe qué tan grande es el efecto de enriquecimiento basado en Es la relación entre i) la cantidad de proteínas en su red que están anotadas con un término y ii) la cantidad de proteínas que esperamos que estén anotadas con este término en una red aleatoria del mismo tamaño).

Primeramente, para los procesos biológicos el primer valor de fortaleza fue de (2.68) en la elongación traduccional citoplasmática. Este proceso está involucrado en la adición sucesiva de residuos de aminoácidos a una cadena polipeptídica en crecimiento durante la biosíntesis de proteínas en el citoplasma este valor se fortaleza alta podría sugerir una relevancia significativa en la traducción que es fundamental para la síntesis de proteínas. El valor de fortaleza de (2.17) en el proceso de Alargamiento es similar al anterior por lo que podría seguir siendo relevante para el proceso de síntesis de proteínas. La traducción citoplasmática cuyo valor fue de (2.02) el cual es un proceso que implica vías que conducen a la formación de proteínas en el citoplasma mediadas por los ribosomas, a pesar de ser un valor de fortaleza menos específico que los anteriores sigue abarcando procesos enfocados a la traducción (tabla 7).

Los procesos con valores más altos como los antes descritos son fundamentales para la biosíntesis de proteínas y tienen cierto impacto en el contexto de la traducción mientras que los valores más bajos en otros procesos como los procesos metabólicos del malato tienen una relación en procesos metabólicos esenciales.

Tabla 7. Procesos biológicos en los que participan las proteínas solubles en ácido perclórico de *T. vaginalis*.

<i>Termino GO</i>	<i>Descripción</i>	<i>recuento de genes observado</i>	<i>de recuento de genes de fondo</i>	<i>fortaleza</i>
GO:0002182	Elongación traduccional citoplasmática	3	7	2.68
GO:0006414	Alargamiento traduccional	5	38	2.17
GO:0002181	Traducción citoplasmática	6	64	2.02
GO:0006108	Proceso metabólico del malato	2	33	1.83
GO:0042274	Biogénesis de subunidades pequeñas ribosómicas.	2	41	1.74
GO:0006165	Fosforilación de nucleósidos difosfato	3	70	1.68
GO:0006412	Traducción	15	358	1.67
GO:0009205	Proceso metabólico del trifosfato de ribonucleósido de purina	3	81	1.62
GO:0006090	Proceso metabólico del piruvato	3	87	1.59
GO:0006091	Generación de metabolitos precursores y energía.	4	118	1.58
GO:0044271	Proceso biosintético de compuestos de nitrógeno celular	16	714	1.4
GO:1901566	Proceso biosintético de compuestos organonitrogenados.	16	781	1.36
GO:0019752	Proceso metabólico del ácido carboxílico.	4	323	1.14
GO:0034641	Proceso metabólico del compuesto de nitrógeno celular.	18	1716	1.07
GO:0044281	Proceso metabólico de moléculas pequeñas.	5	742	0.88
GO:1901564	Proceso metabólico de compuestos organonitrogenados	19	3127	0.83
GO:0044237	Proceso metabólico celular	22	4303	0.76
GO:0008152	Procesos metabólicos	23	5218	0.69
GO:0071840	Organización de los componentes celulares o biogénesis.	7	1598	0.69
GO:0071704	Proceso metabólico de sustancias orgánicas.	21	4861	0.68
GO:0044238	Proceso metabólico primario	19	4546	0.67
GO:0009987	Procesos celulares	35	11188	0.54

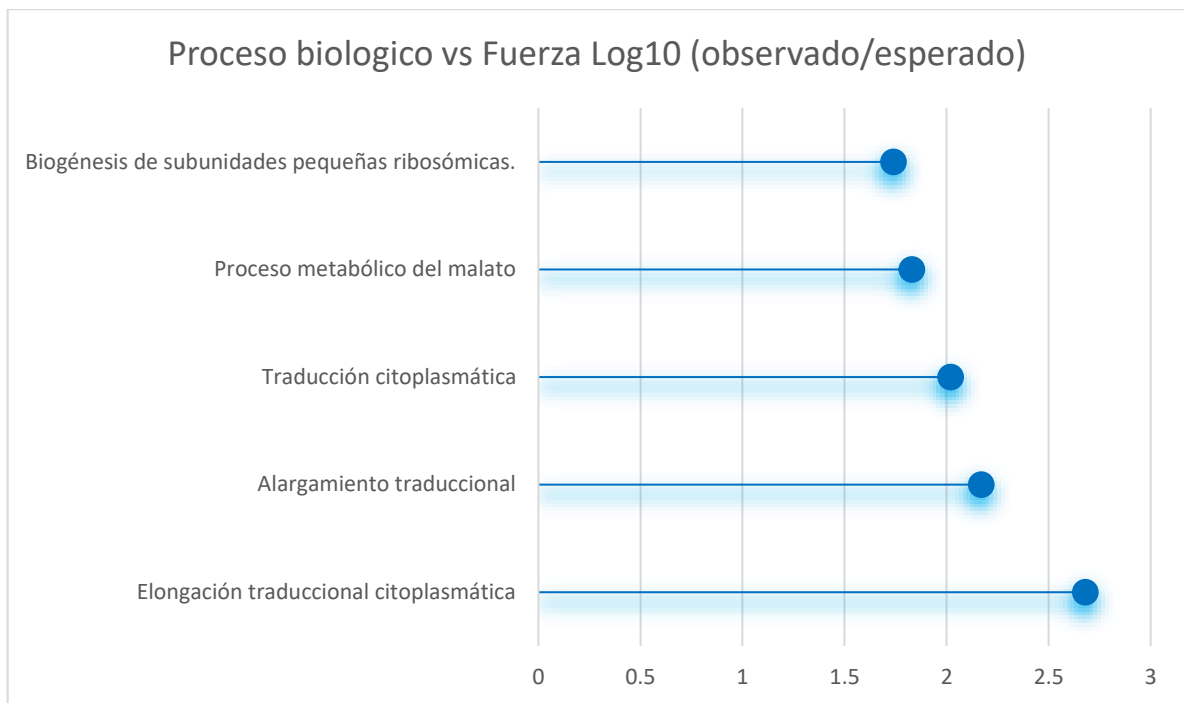


Figura 12. Análisis de GO por proceso biológico. Proteínas solubles en ácido perclórico de *T. vaginalis*. Gráfico de *lollipop* con la distribución de las (PSP) clasificadas por proceso biológico top 5 obtenidas mediante el interactoma de STRING.

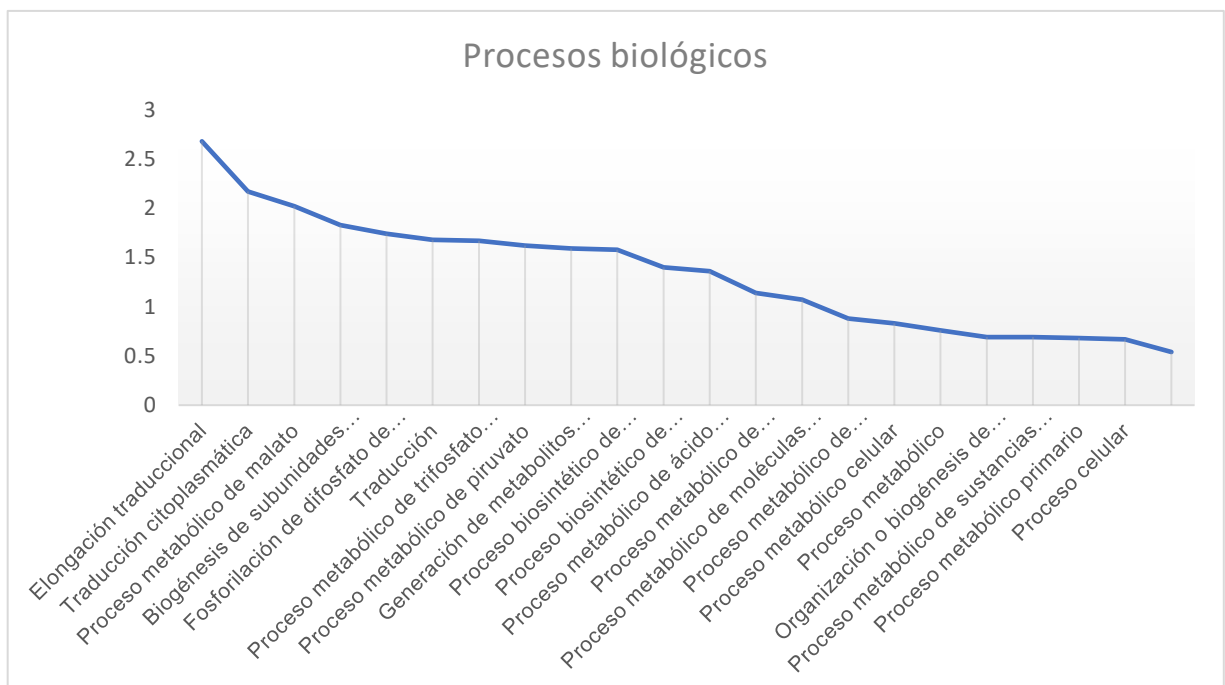


Figura 13. Gráfico de los procesos biológicos. Se muestran todos los procesos biológicos obtenidos de STRING de las proteínas solubles en ácido perclórico.

Posteriormente para el análisis de componente celular en la subunidad ribosómica grande citosólica tuvimos un valor de (1.84), la cual es la parte de del ribosoma ubicada en el citosol, donde se encuentra el sitio activo que cataliza la formación del enlace peptídico. Este valor de fortaleza que fue el más alto podría indicar la importancia crítica de esta subunidad en la síntesis proteica al llevarse aquí la reacción principal. Para las subunidades ribosómicas obtuvimos un valor de (1.83) y esto se refiere a cualquiera de las dos subunidades del ribosoma que son esenciales para la síntesis de proteínas y también este valor refleja la importancia en la función ribosómica general. Para la subunidad ribosómica pequeña se obtuvo un valor de fortaleza de (1.83) la cual es la subunidad ribosómica que se encarga de enlazar el ARNt durante la síntesis proteica y al igual que en el componente de subunidad ribosómica tuvimos el mismo valor y nos indica una función crucial en la traducción teniendo importancia la interacción de los ARNm y los ARNt. (tabla 8) En este apartado los valores de fortaleza reflejan la importancia de cada componente en el proceso de síntesis proteica, por lo que estos componentes son esenciales para el proceso de traducción y el correcto funcionamiento celular.

Tabla 8. Componentes celulares en los que participan las proteínas solubles en ácido perclórico de *T. vaginalis*.

<i>Termino GO</i>	<i>Descripción</i>	<i>recuento de genes observado</i>	<i>recuent o de genes de fondo</i>	<i>fortaleza</i>
GO:0022625	Subunidad ribosómica grande citosólica	8	130	1.84
GO:0044391	Subunidad ribosómica	12	200	1.83
GO:0015935	Subunidad ribosómica pequeña	4	66	1.83
GO:0022626	Ribosoma citosólico	10	171	1.81
GO:0005840	ribosoma	14	259	1.78
GO:0022627	Subunidad ribosómica pequeña citosólica	2	41	1.74
GO:0043232	Organelo intracelular no delimitado por membrana	19	1241	1.23
GO:0005739	mitocondria	3	215	1.19

GO:0005829	citosol	14	1103	1.15
GO:0005856	citoesqueleto	4	536	0.92
GO:0032991	Complejo que contiene proteínas	14	2166	0.86
GO:0005737	Citoplasma	29	6573	0.69
GO:0043229	Organelo intracelular	28	6702	0.67
GO:0043226	Organelo	30	8117	0.62
GO:0005622	Estructura anatómica intracelular	36	10925	0.57
GO:0110165	Entidad anatómica celular	37	12791	0.51

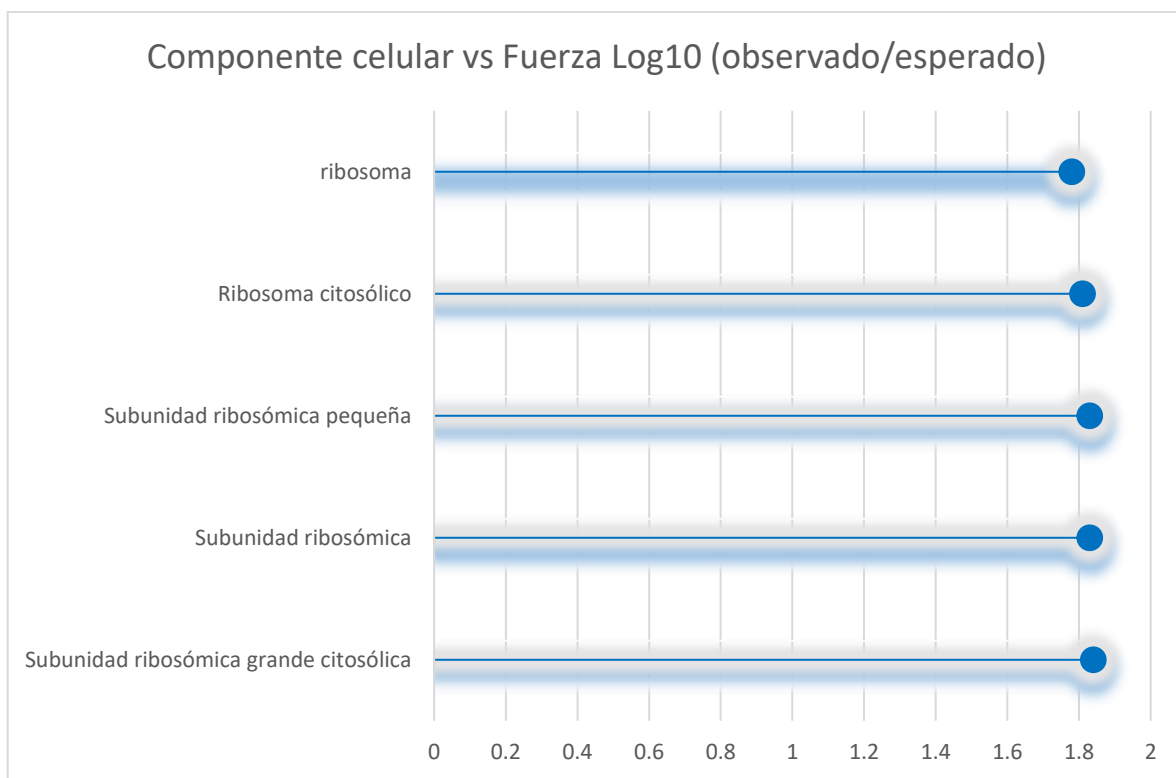


Figura 14. Análisis de GO por componente celular. Proteínas solubles en ácido perclórico de *T. vaginalis*. Gráfico de *lollipop* con la distribución de las (PSP) clasificadas por componente celular top 5.

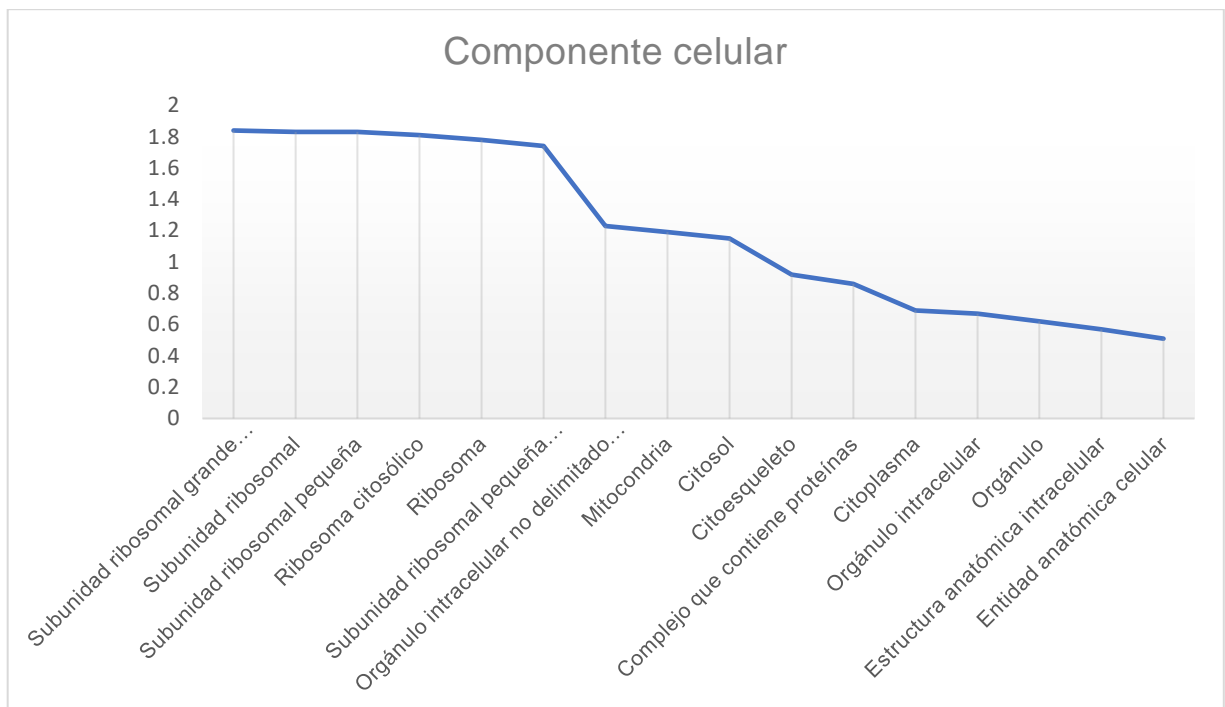


Figura 15. Gráfico de los componentes celulares. Se muestran todos los componentes celulares obtenidos de STRING de las proteínas solubles en ácido perclórico.

Para el análisis de función molecular el primer valor fue para las uniones NADP el cual fue de (2.01), este proceso implica uniones de nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato (NADP), la cual es una coenzima importante en las reacciones redox y biosintéticas. Seguido de la actividad malato deshidrogenasa con un valor de fortaleza de 1.83 la cual está implicada en la catálisis de la conversión reversible del piruvato y oxalacetato en malato. Para el constituyente estructural del ribosoma obtuvimos un valor de fortaleza de (1.81) y esta función se refiere a la acción de una molécula que contribuye a la integridad estructural del ribosoma (tabla 9). Finalmente, estos valores de fortaleza tienen importancia en cada función molecular ya que se pudo obtener funciones críticas como uniones a coenzimas y actividades enzimáticas clave que en conjunto tienen una interconexión en las funciones moleculares de las células.

Tabla 9. Funciones moleculares en las que participan las proteínas solubles en ácido perclórico de *T. vaginalis*.

<i>Termino GO</i>	<i>Descripción</i>	<i>recuento de genes observado</i>	<i>recuento de genes fondo</i>	<i>fortaleza de</i>
GO:005066 1	Unión NADP	2	22	2.01
GO:001661 5	Actividad malato deshidrogenasa	2	33	1.83
GO:000373 5	Constituyente estructural del ribosoma	14	242	1.81
GO:000519 8	Actividad de la molécula estructural.	15	332	1.7
GO:001649 1	Actividad oxidorreductasa	6	318	1.32
GO:000372 3	Unión de ARN	6	633	1.02
GO:000367 6	Unión de ácidos nucleicos	9	1542	0.81
GO:190136 3	Unión de compuestos heterocíclicos	16	3948	0.66
GO:009715 9	Unión de compuestos cíclicos orgánicos	16	3955	0.65
GO:004316 7	Unión de iones	12	3618	0.57
GO:000548 8	Uniones	27	8352	0.56

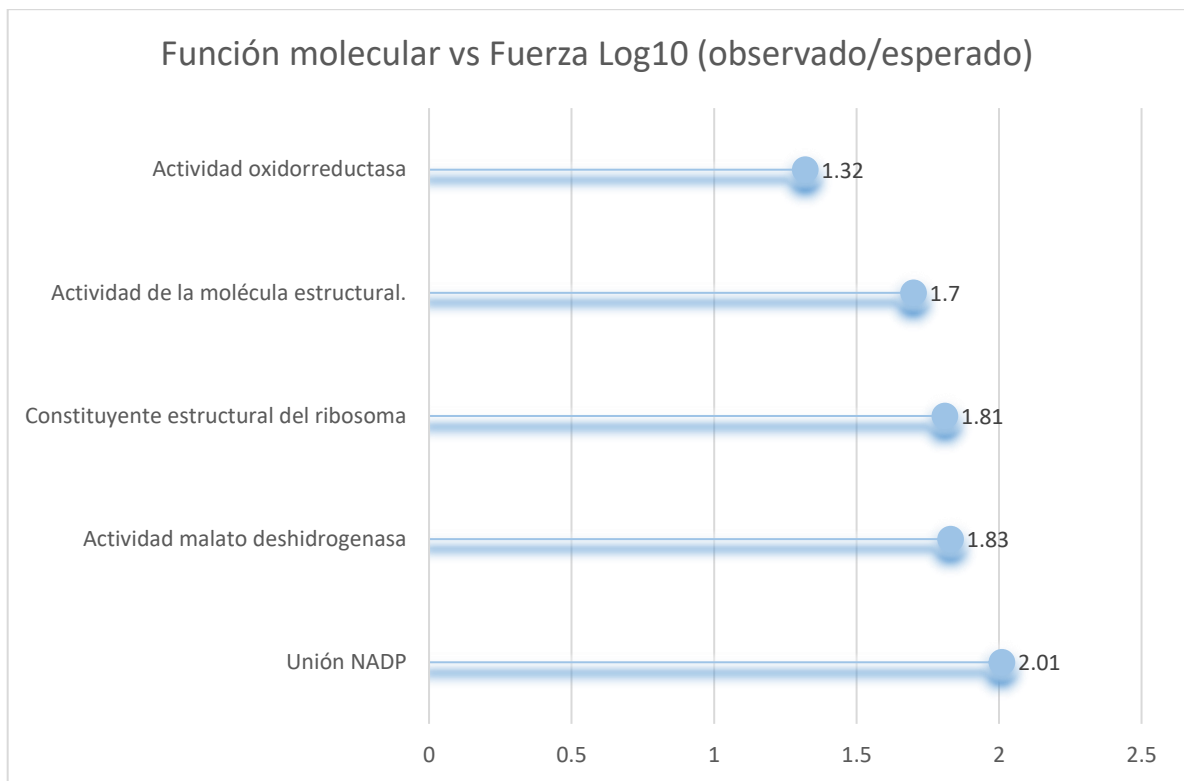


Figura 16. Análisis de GO por función molecular. Proteínas solubles en ácido perclórico de *T. vaginalis*. Gráfico de *loli pop* con la distribución de las (PSP) clasificadas por función molecular top 5.

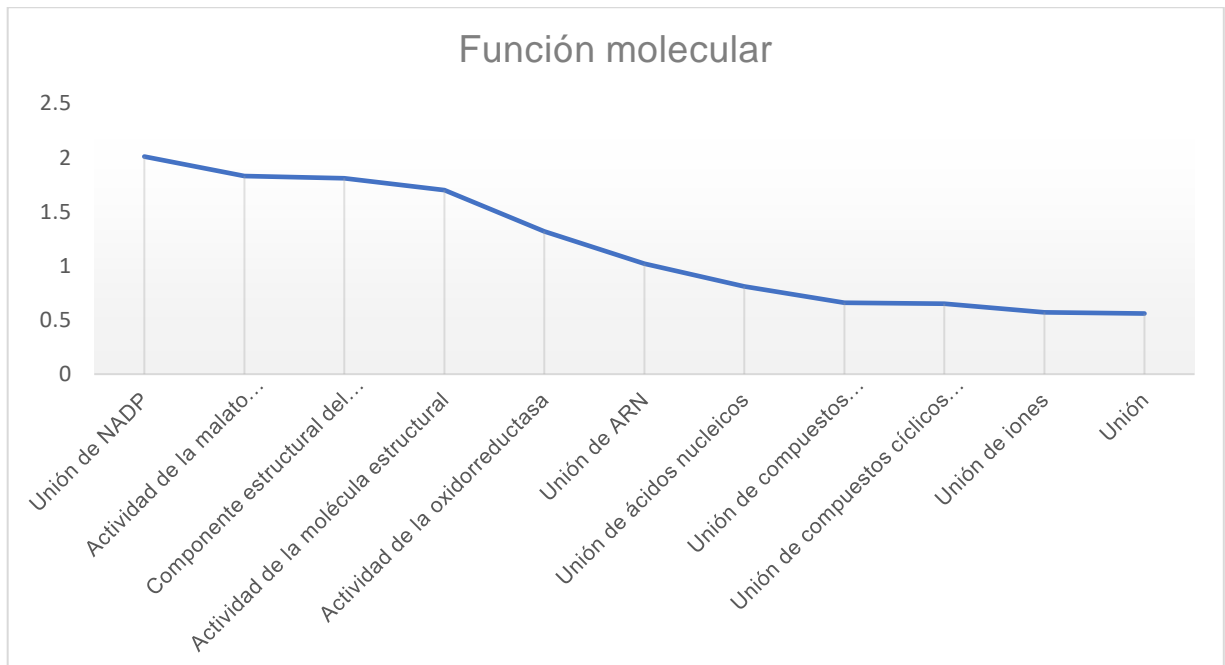


Figura 17. Gráfico de las funciones moleculares. Se muestran todas las funciones moleculares obtenidos de STRING de las proteínas solubles en ácido perclórico.

Posteriormente se determinó si las proteínas solubles en ácido perclórico reportadas previamente si contenían marcadores de secuencia expresada (EST), esto debido a que la proteína Tv-PSP1 se expresaba en condiciones normales de cultivo y para la proteína Tv-PSP3 que se expresa en bajas concentraciones de hierro (Villalobos-Osnaya et al., 2018). Por consiguiente, se buscó en la base de datos TrichDB los ESTs de estas 45 proteínas para determinar si existen reportes de las condiciones en las que se expresan estas proteínas solubles en ácido perclórico de *T. vaginalis*. Se encontró que, de las 45 proteínas 3 de estas no tenían ningún EST (TVAG_539120, TVAG_335380 y TVAG_134920) y con un total de 1793 ESTs la condición mayor reportada fue en condiciones normales de cultivo, seguido de condiciones bajas en glucosa (**Tabla 11**). Este resultado se esperaba ya que fueron las condiciones en las que se trabajó sobre estas proteínas, pero también era interesante saber si existían otros reportes de otras condiciones diferentes a las normales de cultivo para saber si estas proteínas también se expresan bajo ciertas condiciones que después podrían ser de interés ya que el parásito es capaz de sobrevivir a diferentes condiciones adversas, las cuales también aprovecha para su supervivencia o virulencia y mediante este análisis también resulta de interés conocer otras condiciones en las que estas proteínas podrían estar presentes.

Previamente, las proteínas PSP ya identificadas con nombre Tv-PSP1 ha sido reportada que se expresa en condiciones normales de cultivo Y Tv-PSP3 en condiciones bajas de glucosa, lo que también podría significar una característica de estas proteínas ya que este análisis (**Tabla 12**)

Tabla 11. Número de los EST de los genes de las proteínas solubles en ácido perclórico obtenido de TrichDB

<i>Gen ID</i>	<i>N° EST</i>
TVAG_539120	0
TVAG_470120	55
TVAG_111510	41
TVAG_411090	208
TVAG_329460	24

TVAG_402500	93
TVAG_226630	64
TVAG_499760	13
TVAG_471390	31
TVAG_151220	22
TVAG_143030	27
TVAG_438370	34
TVAG_512800	86
TVAG_210010	36
TVAG_347410	85
TVAG_220300	165
TVAG_392990	20
TVAG_197730	7
TVAG_050990	17
TVAG_190280	34
TVAG_035410	58
TVAG_335380	0
TVAG_110530	6
TVAG_376130	99
TVAG_161660	8
TVAG_134920	0
TVAG_345420	48
TVAG_292710	22
TVAG_099510	26
TVAG_340290	528
TVAG_333110	95
TVAG_003900	200
TVAG_265930	48
TVAG_015780	19
TVAG_013320	129
TVAG_485580	30
TVAG_005910	78

TVAG_072120	76
TVAG_341380	232
TVAG_418970	36
TVAG_435990	92
TVAG_216360	20
TVAG_034720	65
TVAG_204360	1427
TVAG_410350	172

Tabla 12. Análisis *in silico* de ESTs obtenidos de la base de datos TrichDB.

Condiciones	N°
Pseudoquiste inducido por frío (TvCS)	117
Biblioteca de ADNc T1 normalizada Cot1000	13
Biblioteca de ADNc T1 normalizada Cot6	11
Citoadherencia mediada por fibronectina (TvFN)	95
Trofozoíto G2/M (TvG2M)	142
Biblioteca de ADNc C1 HMW	1
Biblioteca	33
Cultivo con bajo contenido de glucosa (TvLG)	163
Cultivo con bajo contenido de hierro (TvLI)	75
Biblioteca de ADNc no normalizada de trofozoítos de <i>Trichomonas vaginalis</i> cultivados <i>in vitro</i> (fase logarítmica media)	31
Biblioteca de ADNc T1 no normalizada	580
Cultivo normal no sincronizado (TvEST)	115
Biblioteca de ADNc normalizada de trofozoítos de <i>Trichomonas vaginalis</i> cultivados <i>in vitro</i> (fase logarítmica media)	12
Biblioteca de ADNc TO16 TvF de <i>Trichomonas vaginalis</i>	95
Biblioteca de trofozoítos de fase logarítmica de <i>Trichomonas vaginalis</i> (TvE)	56
ADNc Tv30236_PT Biblioteca	22
TvC	120
Citoadherencia mediada por VEC (TvVEC)	82
Total	1763

9. Discusión

T. vaginalis a lo largo de la evolución ha presentado eventos de duplicación de genes que le permite desarrollarse y sobrevivir a diferentes ambientes lo que podría justificar la presencia de genes muy parecidos entre sí en el parásito y ejemplo de estos genes son los que codifican a la familia de proteínas YER057c/Yigf/Uk114 que presentan distintas funciones como ribonucleasas, inhibidores de la carcinogénesis y chaperonas, las cuales se encuentran al menos dentro de 23 especies como: arqueobacterias, procariontas y eucariotas (Carlton, et al. 2007; Oka et al. 1995).

Las proteínas solubles en ácido perclórico (PSP) han mostrado desempeñar un papel crucial en el metabolismo y mantenimiento del ADN mitocondrial (Kim et al., 2001). Una característica distintiva de las PSP, junto con las proteínas de la familia HGM, es su solubilidad en soluciones de ácido perclórico, lo cual se refleja en la presencia de bandas de diferentes tamaños durante la electroforesis SDS en nuestro gel, esta propiedad sugiere una posible relación en su función y localización dentro del parásito.

La caracterización de los puntos isoeléctricos de estas PSP dentro de nuestro análisis de espectrometría de masas, mostro un promedio de pH de 6.68, lo cual refuerza su solubilidad en ácido perclórico, por lo que es relevante para entender su comportamiento en diferentes condiciones experimentales. La implicación de algunas de estas proteínas en procesos biológicos fundamentales, como la traducción y el metabolismo celular, pone en claro su importancia en la fisiología del parásito que nos mostró la ontología de genes.

A partir de nuestros análisis *in silico* como la realización de nuestros interactomas, como lo fueron nuestros top 5 cu4llos de botella y nuestro top 5 de las proteínas más interconectadas, nos permitieron identificar proteínas de gran interés por la funcionalidad que presentaron. En particular, el Factor de elongación 1 alfa, se ha destacado como un cuello de botella en varios procesos metabólicos, afectando potencialmente el flujo de información génica que podría ser crucial para la supervivencia del parásito.

Por otro lado y de manera similar, la proteína de choque térmico Hsp70, que tiene un papel esencial en el plegamiento y translocación de proteínas, sugiere que las

interacciones ARN-proteína son vitales para la regulación post-transcripcional en *T. vaginalis* (Figueroa-Angulo et al., 2015) y esto debido a su interacción específicamente con las horquillas similares a IRE de *T. vaginalis* y puede ayudar a mediar la expresión génica regulada por hierro tal como se ha sugerido de igual forma la proteína Tv-PSP1.

Por otro lado, la proteína hsp90, está implicada en procesos celulares básicos y esta misma pertenece a la familia de proteínas HSP90 de los mamíferos es un grupo de moléculas altamente conservadas que participan en innumerables procesos celulares. Su distribución en varios compartimentos celulares subraya sus funciones esenciales en la homeostasis celular. HSP90 y sus co-chaperonas orquestan procesos fisiológicos cruciales como la supervivencia celular, el control del ciclo celular, la señalización hormonal, así como la apoptosis (Hoter et al., 2018). La proteína Hsp90 se ha mostrado como una proteína clave para la supervivencia del parásito, al estar involucrada en la regulación de procesos celulares fundamentales. La inhibición de Hsp90 resulta letal para *T. vaginalis*, lo que subraya su relevancia en la adaptación del parásito a su entorno (Singh et al., 2018).

Las proteínas ribosómicas, como la proteína 40S S28 y RPL8, también han mostrado ser significativas en la traducción y regulación del metabolismo celular. Estudios previos han sugerido que RPL8 puede influir en la expresión génica y el desarrollo tumoral, lo que plantea la posibilidad de que esta proteína y otras PSP podrían tener un rol en la progresión de enfermedades como el cáncer (Xu et al., 2023).

El análisis de ESTs en condiciones no normalizadas, como se ha documentado para la proteína Tv-PSP1 y Tv-PSP3 en condiciones de baja de hierro (Oyhenart y Breccia, 2014), indica que estas proteínas son reguladas por factores ambientales, lo que resalta su adaptabilidad. Además, el análisis *in silico* ha permitido identificar su localización en varias subunidades ribosómicas y organelos como el retículo endoplásmico y mitocondrias (Kanouchi et al., 2000; Kim et al., 2001), sugiriendo un papel multifuncional en procesos celulares, dado que *T. vaginalis* no cuenta con mitocondrias, pero sí con un organelo similar que es el hidrogenosoma por lo que podría tener relación con esta localización celular.

Para la parte de vías KEGG, el servidor *string* mostro el código tva03010, el cual se asoció a la biosíntesis de los ribosomas, por lo que es de destacar ya que tiene relación con las proteínas de tipo ribosomal que obtuvimos, debido a que al ser de tipo

ribosomal podrían tener principalmente relación en las subunidades de los ribosomas y procesos de síntesis de proteínas como lo ha mostrado el mismo servidor.

Finalmente, la multifuncionalidad de las PSPs resalta la necesidad de continuar investigando su papel en la supervivencia, virulencia y adaptación de *T. vaginalis* a su microambiente. La comprensión de estas interacciones y funciones podría abrir nuevas vías para el desarrollo de estrategias terapéuticas frente a las infecciones causadas por este parásito.

10. Conclusiones

T. vaginalis tiene proteínas solubles en ácido perclórico y mediante análisis *in silico* se encontró que éstas están involucradas en la síntesis de proteínas, la maduración del ARN, la carcinogénesis y en la supervivencia de este parásito.

11. Perspectivas

- Determinar la presencia de otras PSPs en otras condiciones de cultivo.
- Realizar predicciones de interacción y dinámicas con alguna proteína de interés dentro del parásito en mecanismos de traducción.
- Realizar estudios experimentales para validar las funciones predichas de estas proteínas en el contexto biológico de *T. vaginalis*.

Bibliografía

1. Alvarez-Sánchez, M.E. *et al.* (2000) 'A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity', *Microbial Pathogenesis*, 28(4), pp. 193–202. Available at: <https://doi.org/10.1006/MPAT.1999.0336>.
2. Antonenkov, V.D. *et al.* (2007) 'UK114, a YjgF/Yer057p/UK114 family protein highly conserved from bacteria to mammals, is localized in rat liver peroxisomes', *Biochemical and biophysical research communications*, 357(1), pp. 252–257. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2007.03.136>.
3. Arroyo, R., Engbring, J. and Alderete, J.F. (1992) 'Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*', *Molecular microbiology*, 6(7), pp. 853–862. Available at: <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.1992.TB01536.X>.
4. Asagi, K. *et al.* (1998) 'Purification, characterization and differentiation-dependent expression of a perchloric acid soluble protein from rat kidney', *Nephron*, 79(1), pp. 80–90. Available at: <https://doi.org/10.1159/000044996>.
5. Benchimol, M. (2009) 'Hydrogenosomes under microscopy', *Tissue & cell*, 41(3), pp. 151–168. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.TICE.2009.01.001>.
6. Boletín Epidemiológico, E. (no date) 'Índice 2 Vigilancia Epidemiológica Semana 52, 2023'. Available at: <http://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/direccion-general-> (Accessed: 31 March 2024).
7. Burman, J.D. *et al.* (2007) 'The crystal structure of *Escherichia coli* TdcF, a member of the highly conserved YjgF/YER057c/UK114 family', *BMC structural biology*, 7. Available at: <https://doi.org/10.1186/1472-6807-7-30>.
8. Carlton, J.M. *et al.* (2007) 'Draft Genome Sequence of the Sexually Transmitted Pathogen *Trichomonas vaginalis*', *Science (New York, N.Y.)*, 315(5809), p. 207. Available at: <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1132894>.
9. Catterall, R.D. (1972) 'Trichomonal Infections of the Genital Tract', *Medical Clinics of North America*, 56(5), pp. 1203–1209. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0025-7125\(16\)32345-8](https://doi.org/10.1016/S0025-7125(16)32345-8).
10. CDC - DPDx - Trichomoniasis (2017). Available at: <https://www.cdc.gov/dpdx/trichomoniasis/index.html> (Accessed: 19 March 2024).
11. Chong, C.L. *et al.* (2008) 'Decreased Expression of UK114 Is Related to the Differentiation Status of Human Hepatocellular Carcinoma', *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 17(3), pp. 535–542. Available at: <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-07-0506>.
12. Costamagna, S.R. *et al.* (2008) 'Parasitosis regionales Compiladores'.
13. Dunne, R.L. *et al.* (2003) 'Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*', *Cell Research*, 13(4), pp. 239–249. Available at: <http://www.cell-research.com> (Accessed: 2 January 2024).
14. Durel, P., Couture, J. and Bassoullet, M.T. (1967) 'The rapid detection of metronidazole in urine', *The British journal of venereal diseases*, 43(2), pp. 111–113. Available at: <https://doi.org/10.1136/STI.43.2.111>.

15. *Especialista en tricomoniasis en Monterrey - Dr. Antonio Acuña* (no date). Available at: <https://urologojuanantonioacuna.com.mx/especialista-en-tricomoniasis-en-monterrey/> (Accessed: 19 May 2024).
16. Fanfair, R.N. and Workowski, K.A. (2014) 'Clinical update in sexually transmitted diseases-2014', *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 81(2), pp. 91–101. Available at: <https://doi.org/10.3949/ccjm.81a.13090>.
17. Farkas, A. *et al.* (2004) 'DUK114, the Drosophila orthologue of bovine brain calpain activator protein, is a molecular chaperone', *The Biochemical journal*, 383(Pt 1), pp. 165–170. Available at: <https://doi.org/10.1042/BJ20040668>.
18. Fernández-Martín, K.G. *et al.* (2017) 'Genome-wide identification, in silico characterization and expression analysis of ZIP-like genes from *Trichomonas vaginalis* in response to Zinc and Iron', *Biometals: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 30(5), pp. 663–675. Available at: <https://doi.org/10.1007/S10534-017-0034-X>.
19. Figueroa-Angulo, E.E. *et al.* (2012) 'The effects of environmental factors on the virulence of *Trichomonas vaginalis*', *Microbes, and infection*, 14(15), pp. 1411–1427. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.MICINF.2012.09.004>.
20. Figueroa-Angulo, E.E. *et al.* (2015) 'RNA-Binding Proteins in *Trichomonas vaginalis*: Atypical Multifunctional Proteins', *Biomolecules*, 5(4), pp. 3354–3395. Available at: <https://doi.org/10.3390/BIOM5043354>.
21. Fiori, P.L., Rappelli, P. and Addis, M.F. (no date) 'The flagellated parasite *Trichomonas vaginalis*: new insights into cytopathogenicity mechanisms.
22. Da Fonseca Pires, S. *et al.* (2014) 'Identification of virulence factors in *Leishmania infantum* strains by a proteomic approach', *Journal of proteome research*, 13(4), pp. 1860–1872. Available at: <https://doi.org/10.1021/PR400923G>.
23. Ford, L.C. *et al.* (1987) 'Determination of estrogen and androgen receptors in *Trichomonas vaginalis* and the effects of antihormones', *American journal of obstetrics and gynecology*, 156(5), pp. 1119–1121. Available at: [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(87\)90122-0](https://doi.org/10.1016/0002-9378(87)90122-0).
24. Forna, F. and Gülmezoglu, A.M. (2003) 'Interventions for treating trichomoniasis in women', *Cochrane Database of Systematic Reviews* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD000218/FULL/ES>.
25. Galego, G.B. and Tasca, T. (2023) 'Infinity war: *Trichomonas vaginalis* and interactions with host immune response', *Microbial cell (Graz, Austria)*, 10(5), pp. 103–116. Available at: <https://doi.org/10.15698/MIC2023.05.796>.
26. Garber, G.E., Lemchuk-Favel, L.T. and Rousseau, G. (1991) 'Effect of beta-estradiol on production of the cell-detaching factor of *Trichomonas vaginalis*', *Journal of clinical microbiology*, 29(9), pp. 1847–1849. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.29.9.1847-1849.1991>.
27. Gibney, E.R. and Nolan, C.M. (2010) 'Epigenetics and gene expression', *Heredity*, 105(1), pp. 4–13. Available at: <https://doi.org/10.1038/HDY.2010.54>.
28. Heyworth, P.G., Gutteridge, W.E. and Ginger, C.D. (1982) 'Purine metabolism in *Trichomonas vaginalis*', *FEBS letters*, 141(1), pp. 106–110. Available at: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(82\)80026-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(82)80026-4).
29. Hobbs, M.M. and Seña, A.C. (2013) 'Modern diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection', *Sexually transmitted infections*, 89(6), pp. 434–438. Available at: <https://doi.org/10.1136/SEXTRANS-2013-051057>.

30. Hoter, A., El-Sabban, M.E. and Naim, H.Y. (2018) 'The HSP90 Family: Structure, Regulation, Function, and Implications in Health and Disease', *International journal of molecular sciences*, 19(9). Available at: <https://doi.org/10.3390/IJMS19092560>.
31. Huang, K.Y. *et al.* (2009) 'A proteome reference map of *Trichomonas vaginalis*', *Parasitology research*, 104(4), pp. 927–933. Available at: <https://doi.org/10.1007/S00436-008-1274-Z>.
32. Huang, K.Y. *et al.* (2019) 'Metabolic reprogramming of hydrogenosomal amino acids in *Trichomonas vaginalis* under glucose restriction', *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi*, 52(4), pp. 630–637. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.JMII.2017.10.005>.
33. Ibáñez-Escribano, A. and Gómez-Barrio, A. (2017) 'Trichomonas vaginalis: The versatility of a tenacious parasite Title in Spanish: Trichomonas vaginalis: la versatilidad de un parásito tenaz', *Corresponding Author: alexandraibanez@ucm.es An Real Acad Farm*, 83, pp. 10–47.
34. Juan Manuel Ospina Diaz Nelly Esperanza Ariza Riaño (2008) *Vista de TEMA DE REVISION: TRICHOMONAS VAGINALIS*. Available at: <https://agenf.org/ojs/index.php/shs/article/view/115/113> (Accessed: 3 January 2024).
35. Kim, J.M., Yoshikawa, H. and Shirahige, K. (2001) 'A member of the YER057c/yjgf/Uk114 family links isoleucine biosynthesis and intact mitochondria maintenance in *Saccharomyces cerevisiae*', *Genes to cells: devoted to molecular & cellular mechanisms*, 6(6), pp. 507–517. Available at: <https://doi.org/10.1046/J.1365-2443.2001.00443.X>.
36. Kim, Y.S. *et al.* (2006) 'Hydrogenosomal activity of *Trichomonas vaginalis* cultivated under different iron conditions', *The Korean journal of parasitology*, 44(4), pp. 373–378. Available at: <https://doi.org/10.3347/KJP.2006.44.4.373>.
37. Kissinger, P. and Adamski, A. (2013) 'Trichomoniasis and HIV interactions: a review', *Sexually transmitted infections*, 89(6), p. 426. Available at: <https://doi.org/10.1136/SEXTRANS-2012-051005>.
38. Kochan, P., Pietrzyk, A. and Dercon, K. (2021) 'Atlas temático: *Trichomonas vaginalis* ¿Qué debe un médico saber exactamente sobre *Trichomonas vaginalis*?'
39. De Koning, A.P. *et al.* (2000) 'Lateral Gene Transfer and Metabolic Adaptation in the Human Parasite *Trichomonas vaginalis*', *Molecular Biology and Evolution*, 17(11), pp. 1769–1773. Available at: <https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.MOLBEV.A026275>.
40. Kulda, J. (1999) 'Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance', *International journal for parasitology*, 29(2), pp. 199–212. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(98\)00155-6](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00155-6).
41. Lambrecht, J.A., Flynn, J.M. and Downs, D.M. (2012) 'Conserved YjgF protein family deaminates reactive enamine/imine intermediates of pyridoxal 5'-phosphate (PLP)-dependent enzyme reactions', *The Journal of biological chemistry*, 287(5), pp. 3454–3461. Available at: <https://doi.org/10.1074/JBC.M111.304477>.
42. Lilia, D. *et al.* (2003) 'La enfermedad perinatal y la prematuridad pertenecen a un síndrome clínico multifactorial: Participación de la herencia de enfermedad vascular, la flora microbiana vaginal y el estado nutricional', 64.

43. Lindström, M.S. (2009) 'Emerging functions of ribosomal proteins in gene-specific transcription and translation', *Biochemical and biophysical research communications*, 379(2), pp. 167–170. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2008.12.083>.
44. Lizarraga, A. *et al.* (2021) 'Toward incorporating epigenetics into regulation of gene expression in the parasite *Trichomonas vaginalis*', *Molecular Microbiology*, 115(5), pp. 959–967. Available at: <https://doi.org/10.1111/MMI.14704>.
45. Lossick, J.G., Miller, M. and Gorrell, T.E. (1986) 'In vitro drug susceptibility and doses of metronidazole required for cure in cases of refractory vaginal trichomoniasis', *The Journal of infectious diseases*, 153(5), pp. 948–955. Available at: <https://doi.org/10.1093/INFDIS/153.5.948>.
46. Lushbaugh, W.B. *et al.* (1989) 'Characterization of a Secreted Cytoactive Factor from *Trichomonas Vaginalis*', *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 41(1), pp. 18–28. Available at: <https://doi.org/10.4269/AJTMH.1989.41.1.TM0410010018>.
47. Makszin, L. *et al.* (2019) 'Microchip gel electrophoretic analysis of perchloric acid-soluble serum proteins in systemic inflammatory disorders', *Electrophoresis*, 40(3), pp. 447–454. Available at: <https://doi.org/10.1002/ELPS.201800378>.
48. Mallo, N., Lamas, J. and Leiro, J.M. (2013) 'Hydrogenosome Metabolism Is the Key Target for Antiparasitic Activity of Resveratrol against *Trichomonas vaginalis*', *Antimicrobial Agents, and Chemotherapy*, 57(6), p. 2476. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.00009-13>.
49. Manjasetty, B.A. *et al.* (2004) 'Crystal structure of Homo sapiens protein hp14.5', *Proteins*, 54(4), pp. 797–800. Available at: <https://doi.org/10.1002/PROT.10619>.
50. Meites, E. *et al.* (no date) 'A Review of Evidence-Based Care of Symptomatic Trichomoniasis and Asymptomatic *Trichomonas vaginalis* Infections'. Available at: <https://doi.org/10.1093/cid/civ738>.
51. Mestecky, J. and Fultz, P.N. (1999) 'Mucosal immune system of the human genital tract', *The Journal of infectious diseases*, 179 Suppl 3(SUPPL. 3). Available at: <https://doi.org/10.1086/314806>.
52. Mielczarek, E. and Blaszkowska, J. (2016) 'Trichomonas vaginalis: pathogenicity and potential role in human reproductive failure', *Infection*, 44(4), pp. 447–458. Available at: <https://doi.org/10.1007/S15010-015-0860-0>.
53. Millán-Pacheco, C. *et al.* (2023) 'A Putative New Role of Tv-PSP1 Recognizes IRE and ERE Hairpin Structures from *Trichomonas vaginalis*', *Pathogens*, 12(1). Available at: <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS12010079/S1>.
54. Mirasol-Meléndez, E. *et al.* (2018) 'Characterization of multiple enolase genes from *Trichomonas vaginalis*. Potential novel targets for drug and vaccine design', *Parasitology international*, 67(4), pp. 444–453. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.PARINT.2018.04.003>.
55. Morris Sheldon R. (2023) *Tricomonirosis - Infecciones - Manual MSD versión para público general*. Available at: <https://www.msdmanuals.com/es-mx/hogar/infecciones/enfermedades-de-transmisi%C3%B3n-sexual-ets/tricomonirosis> (Accessed: 18 March 2024).
56. Muller, M. (1993) 'The hydrogenosome', *Journal of general microbiology*, 139(12), pp. 2879–2889. Available at: <https://doi.org/10.1099/00221287-139-12-2879>.

57. Muñoz-Ramírez, A. *et al.* (2018) 'Prevalence of *Trichomonas vaginalis* and Human papillomavirus in female sex workers in Central Veracruz, Mexico', *Revista Argentina de Microbiología*, 50(4), pp. 351–358. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.RAM.2017.11.004>.
58. *My Strategies* (no date). Available at: <https://trichdb.org/trichdb/app/workspace/strategies/327923473/433220473> (Accessed: 16 April 2024).
59. Oka, T. *et al.* (1995) 'Isolation and characterization of a novel perchloric acid-soluble protein inhibiting cell-free protein synthesis', *The Journal of biological chemistry*, 270(50), pp. 30060–30067. Available at: <https://doi.org/10.1074/JBC.270.50.30060>.
60. Ongay, S. *et al.* (2010) 'Development of a fast and simple immunochromatographic method to purify alpha 1-acid glycoprotein from serum for analysis of its isoforms by capillary electrophoresis', *Analytica Chimica Acta*, 663(2), pp. 206–212. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2010.01.054>.
61. Oxelmark, E. *et al.* (2000) 'Mmf1p, a novel yeast mitochondrial protein conserved throughout evolution and involved in maintenance of the mitochondrial genome', *Molecular and cellular biology*, 20(20), pp. 7784–7797. Available at: <https://doi.org/10.1128/MCB.20.20.7784-7797.2000>.
62. Oyhenart, J. and Breccia, J.D. (2014) 'Evidence for repeated gene duplications in *Trichomonas foetus* supported by EST analysis and comparison with the *Trichomonas vaginalis* genome', *Veterinary parasitology*, 206(3–4), pp. 267–276. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2014.09.024>.
63. Pachano, T. *et al.* (2017) 'Epigenetics regulates transcription and pathogenesis in the parasite *Trichomonas vaginalis*', *Cellular microbiology*, 19(6). Available at: <https://doi.org/10.1111/CMI.12716>.
64. Patil, M.J., Nagamoti, J.M. and Metgud, S.C. (2012) 'Diagnosis of *Trichomonas Vaginalis* from Vaginal Specimens by Wet Mount Microscopy, In Pouch TV Culture System, and PCR', *Journal of global infectious diseases*, 4(1), pp. 22–25. Available at: <https://doi.org/10.4103/0974-777X.93756>.
65. Pereira-Neves, A., Ribeiro, K.C. and Benchimol, M. (2003) 'Pseudocysts in trichomonads--new insights', *Protist*, 154(3–4), pp. 313–329. Available at: <https://doi.org/10.1078/143446103322454095>.
66. Quon, D.V.K., Delgadillo, M.G. and Johnson, P.J. (1996) 'Transcription in the early diverging eukaryote *Trichomonas vaginalis*: an unusual RNA polymerase II and alpha-amanitin-resistant transcription of protein-coding genes', *Journal of molecular evolution*, 43(3), pp. 253–262. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF02338833>.
67. Ramírez, A.M. *et al.* (2010) 'Palabras clave: Empiema pleural, empiema', *tricomonas. Rev. Chilena de Cirugía*, 62, pp. 276–278.
68. Rodríguez, M.A. *et al.* (2010) 'Regulation of Gene Expression in Protozoa Parasites', *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, p. 24. Available at: <https://doi.org/10.1155/2010/726045>.
69. Rosenzweig, R. *et al.* (2019) 'The Hsp70 chaperone network', *Nature reviews. Molecular cell biology*, 20(11), pp. 665–680. Available at: <https://doi.org/10.1038/S41580-019-0133-3>.
70. Sangeeta Kundu (2007) *Structural considerations for designing adenosine analogs as selective inhibitors of Trichomonas sp. glyceraldehyde-3- phosphate*

- dehydrogenase* - *PubMed*. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18467771/> (Accessed: 12 March 2024).
71. Sherrard, J. *et al.* (2014) 'United Kingdom National Guideline on the Management of *Trichomonas vaginalis* 2014', *International journal of STD & AIDS*, 25(8), pp. 541–549. Available at: <https://doi.org/10.1177/0956462414525947>.
 72. Siculella, L. *et al.* (2021) 'Evidence for a Negative Correlation between Human Reactive Enamine-Imine Intermediate Deaminase A (RIDA) Activity and Cell Proliferation Rate: Role of Lysine Succinylation of RIDA', *International journal of molecular sciences*, 22(8). Available at: <https://doi.org/10.3390/IJMS22083804>.
 73. Simhan, H.N. *et al.* (2007) 'Host immune consequences of asymptomatic *Trichomonas vaginalis* infection in pregnancy', *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 196(1), pp. 59.e1-59. e5. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2006.08.035>.
 74. Singh, M. *et al.* (2018) 'A secreted Heat shock protein 90 of *Trichomonas vaginalis*', *PLoS neglected tropical diseases*, 12(5). Available at: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0006493>.
 75. Stark, J.R. *et al.* (2009) 'Prospective Study of *Trichomonas vaginalis* Infection and Prostate Cancer Incidence and Mortality: Physicians' Health Study', *jnci.oxfordjournals.org JNCI | Article*, 1. Available at: <https://doi.org/10.1093/jnci/djp306>.
 76. Tachezy, J., Kulda, J. and Tomková, E. (1993) 'Aerobic resistance of *Trichomonas vaginalis* to metronidazole induced in vitro', *Parasitology*, 106 (Pt 1) (1), pp. 31–37. Available at: <https://doi.org/10.1017/S0031182000074783>.
 77. Thin, R.N. *et al.* (1979) 'Double-blind comparison of a single dose and a five-day course of metronidazole in the treatment of trichomoniasis', *The British journal of venereal diseases*, 55(5), pp. 354–356. Available at: <https://doi.org/10.1136/STI.55.5.354>.
 78. *Tricomoniasis - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud* (no date). Available at: <https://www.paho.org/es/temas/tricomoniasis> (Accessed: 9 April 2024).
 79. Vaňáčová, Š. *et al.* (2005) 'Spliceosomal introns in the deep-branching eukaryote *Trichomonas vaginalis*', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(12), p. 4430. Available at: <https://doi.org/10.1073/PNAS.0407500102>.
 80. Villalobos, A. (2009) *Caracterización de un posible inhibidor de TveIF-5A de Trichomona vaginalis*.
 81. Villalobos-Osnaya, A. *et al.* (2018) 'Identification of a perchloric acid-soluble protein (PSP)-like ribonuclease from *Trichomonas vaginalis*', *Parasitology research*, 117(11), pp. 3639–3652. Available at: <https://doi.org/10.1007/S00436-018-6065-6>.
 82. Villalobos, A. (2019) *Caracterización de la proteína Tv-PSP1 y su posible participación en la degradación del RNAm de tvcp39 en Trichomonas vaginalis*.
 83. Warring, S.D. *et al.* (2021) 'Small RNAs Are Implicated in Regulation of Gene and Transposable Element Expression in the Protist *Trichomonas vaginalis*', *mSphere*, 6(1). Available at: <https://doi.org/10.1128/MSPHERE.01061-20>.
 84. Wiese, W. *et al.* (2000) 'A meta-analysis of the Papanicolaou smear and wet mount for the diagnosis of vaginal trichomoniasis', *The American journal of*

- medicine*, 108(4), pp. 301–308. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(99\)00466-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(99)00466-0).
85. Winzler, R.J. *et al.* (1948) 'STUDIES ON THE MUCOPROTEINS OF HUMAN PLASMA. I. DETERMINATION AND ISOLATION', *Journal of Clinical Investigation*, 27(5), p. 609. Available at: <https://doi.org/10.1172/JC1102006>.
 86. Wiringa, A.E. *et al.* (2020) 'Trichomonas vaginalis, endometritis and sequelae among women with clinically suspected pelvic inflammatory disease', *Sexually transmitted infections*, 96(6), pp. 436–438. Available at: <https://doi.org/10.1136/SEXTRANS-2019-054079>.
 87. World Health Organization (2023) *Trichomoniasis*. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/trichomoniasis> (Accessed: 1 January 2024).
 88. Wu, B. *et al.* (2003) 'Solution structure of ribosomal protein S28E from *Methanobacterium thermoautotrophicum*', *Protein science: a publication of the Protein Society*, 12(12), pp. 2831–2837. Available at: <https://doi.org/10.1110/PS.03358203>.
 89. Xu, L. *et al.* (2023) 'Ribosomal protein L8 regulates the expression and splicing pattern of genes associated with cancer-related pathways', *Turkish journal of biology = Turk biyoloji dergisi*, 47(5), pp. 313–324. Available at: <https://doi.org/10.55730/1300-0152.2666>.
 90. Zubáčová, Z., Cimbůrek, Z. and Tachezy, J. (2008) 'Comparative analysis of trichomonad genome sizes and karyotypes', *Molecular and biochemical parasitology*, 161(1), pp. 49–54. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.MOLBIOPARA.2008.06.004>.

12. Apendice

Soluciones

Solución de lavado EtoH 5%

Etanol al 100% 10 ml

Agua destilada 240 ml

Se siseuelven y se lleva a 250 ml

Solucion de impregnación

AgNO₃ 0.5 gr

Formaldehido al 37 % 100 ul

Disolverlo y llebvarlo a 250 ml

Solucion de revelado

Na₂CO₃ 7.5 gr

Na₂SO₂O₃ 0.001 gr

Formaldehido al 37% 100 ul

Disolverlo y llevarlo a 250 ml

Solucion de pretratamiento

Na₂SO₂O₃ 0.05gr

Disolver con agua destilada y llevarlo a 250 ml

Solucion de paro

Acido acetico 10% 10 ml

Agua destilada 240 ml

Disolver y llevar a 250 ml

Solucion de fijación

Etanol 500 ml

Acido acetico 70 ml

Agua destilada 430 ml

Disolver para 1 lt

PBS 1X pH 7.0

NaCl 8 gr

KCl 8 gr

Na₂HPO₄ 0.65gr

KH₂PO₄ 0.2gr

Se ajusta el pH a 7.0 y se afora a 1 litro de agua destilada.

Acrilamida al 30%/ bisacrilamida al 0.8%

Acrilamida 29.2 gr

Bisacrilamida 0.8 gr

Se disuelve en 40 ml de agua destilada, una vez disuelto se afora a 100 ml, se filtra con papel filtro "Whatman" No.1 y se almacena a 4°C protegido de la luz.

Persulfato de amonio al 10% (PSA)

Se pesa 10 mg (0.01gr) de PSA en un mililitro de agua destilada.115

Solución colorante de proteínas

Metanol 500 ml

Ácido acético glacial 100 ml

Agua destilada 400 ml

Azul de Comassie 0.5gr

Disolver toda la noche, filtrar con papel filtro "Whatman" no. 1. Almacenar a temperatura ambiente.

Solución decolorante de geles de poliacrilamida

Metanol 165 ml

Ácido acético glacial 50 ml

Agua destilada 785 ml

Disolver y almacenar a temperatura ambiente.

4X Tris-Cl/ SDS pH 6.8 (Geles PAGE)

Tris base 6.055 gr

Se disuelve en 60 ml de H₂O destilada, se ajusta el pH a 6.8 y se lleva a 100 ml.

4X Tris-Cl/ SDS pH 8.8

Tris base 18.165 gr

SDS 0.4 gr

Se disuelve en 60 ml de H₂O destilada, se ajusta el pH a 8.8 y se lleva a 100 ml.

Amortiguador de transferencia

Trizma-base 25 mM

Glicina 190 mM

Metanol 20 %

Disolver primero el Trizma y Glicina. Posteriormente se agrega metanol, se afora con 1 litro de H₂O destilada. Enfriar a 4°C hasta su uso.

Amortiguador M3

Tris base 50 mM

NaCl 150 mM

EDTA 1mM

DTT 1mM

Se ajusta el pH 7.5 y se afora a 1litro, se guarda a 4°C

13. Anexos

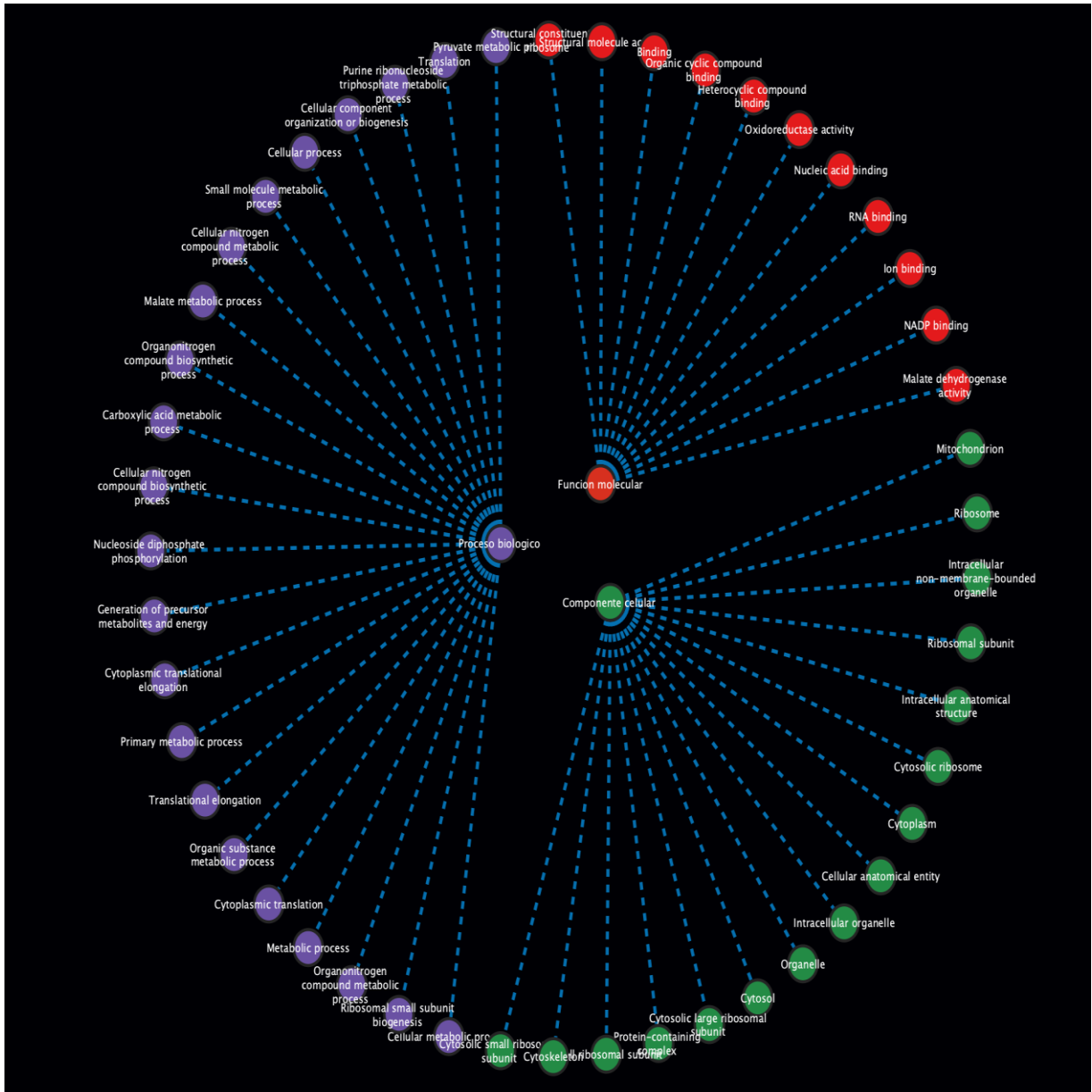


Figura 20. Interactoma completo del Gene Ontology (GO). Interactoma obtenido a partir de los datos de STRING graficado en el software cytoscape dividido por procesos biológicos, funciones moleculares y componente celular.



SOCIEDAD
MEXICANA DE
BIOQUÍMICA, A.C.

Otorga la presente

CONSTANCIA a:

Laura Isabel Vázquez Carrillo

Por su asistencia y presentación del trabajo titulado:

Identification of perchloric acid-soluble proteins from *Trichomonas vaginalis*

Por:

Laura Isabel Vázquez Carrillo, Daniel Agustín Bravata Alcantara, Héctor Quezada Pablo,
Ana Laura Guzmán Ortiz, Marcos Morales Reyna, María Elizabeth Álvarez-Sánchez

En la modalidad de cartel durante el XXXIV Congreso Nacional de Bioquímica
20 - 25 de octubre de 2024, en la Ciudad de Mazatlán, Sin. México

Atentamente
Comité Organizador

Dr. Agustín Guerrero Hernández
Presidente

Dra. Libia Vega Loyo
Vice-Presidente

Dra. María de Lourdes Girard Cuesy
Secretaría-Tesorera

Dra. Irma Romero Álvarez
Sub-Secretaría-Tesorera



SEDENA
SECRETARÍA DE LA
DEFENSA NACIONAL



D.G.E.M. y R.U.D.E.F.A.



C.E.M.I.C.S.A



ESC. MIL. GDOS. SND.

Otorgan la presente:

Constancia

A: *Daniel Agustín bravata Alcantara*

Por su participación como asistente a las “Jornadas de acercamiento a las **Ciencias Biomédicas y su impacto en el cuidado de la salud**”, organizado por la Escuela Militar de Graduados de Sanidad en el Centro Militar de Ciencias de la Salud, realizado los días 4 y 5 de abril de 2024, con un total de 10 horas.

“SUPERACIÓN Y VERDAD, HONOR Y LEALTAD”

El General Brigadier Médico Cirujano
Director del Plantel

Humberto Carrasco Vargas
(B-3763615)

Lomas de Sotelo, Ciudad de México, jueves 05 de abril de 2024.

La Universidad Autónoma de la Ciudad de México
y el Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" del ISSSTE

otorgan la presente

CONSTANCIA

a: **BRAVATA ALCANTARA DANIEL AGUSTIN**

Por su participación en el Simposio Internacional
Genómica: de lo molecular a lo traslacional.

24 y 25 de Septiembre del 2024


Dra. Elizabeth Alvarez Sanchez
Coordinadora del Simposio UACM


Mtro. César Enrique H. Montes Hernández
Coordinador Académico UACM


Dr. Arnaldo Paul Esparza Avila
Subdirector de Enseñanza e Investigación


Dra. Sofia Lizeth Alcaraz Estrada
Jefa de División de Medicina Genómica

