

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

**IDENTIFICACIÓN DE METALOPROTEINASAS DE
Tritrichomonas foetus INVOLUCRADAS EN LA
INTERACCIÓN CON LAS CÉLULAS MDBK.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS

P R E S E N T A:

VIANEY CAROLINA JIMENO TRONCOSO

D I R E C T O R A

Dra. MARÍA ELIZBETH ÁLVAREZ SÁNCHEZ

POSGRADO EN
CIENCIAS
GENÓMICAS

Ciudad de México, enero de 2020

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. Minerva Camacho Nuez, UACM.

Secretario: Dra. María Elizbeth Álvarez Sánchez, UACM.

Vocal: Dr. Jonathan Puente Rivera, UNAM.

PLANTEL DEL VALLE, UACM.

DIRECTORA

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

COMITÉ TUTORAL

DIRECTORA

Dra. María Elizbeth Álvarez Sánchez
Profesora investigadora. Programa de Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

ASESORES

Dra. Minerva Camacho Nuez
Profesora investigadora. Programa de Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dr. Mauricio Castañón Arreola
Profesor investigador. Programa de Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dr. Jonathan Puente Rivera
Posdoctoral. Instituto de Ecología UNAM
Departamento de Ecología Funcional

Agradecimientos

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 1 del posgrado de ciencias genómicas de la UACM. Agradezco a la Dra. Elizabeth Álvarez Sánchez por haberme permitido trabajar en su laboratorio y ser parte de su equipo de trabajo, así mismo agradezco a la M. en C. Laura Vázquez por todo su apoyo en la parte técnica.

En la estancia en el posgrado los amigos fueron una parte esencial en cada momento gracias por estar siempre unidos Allan, Andy, Fabricio, Toño y Marco.

El apoyo incondicional de la familia siempre fue el motor para seguir adelante y terminar este proyecto en mi vida, gracias.

Índice	
ÍNDICE DE TABLAS	6
ÍNDICE DE FIGURAS	7
INTRODUCCIÓN	12
1.1 Características de <i>Tritrichomonas foetus</i>	13
1.2 Ciclo de vida y patogenia.....	14
1.3 Prevalencia y diagnóstico	16
1.4 Mecanismos de virulencia.....	18
1.5 Metaloproteinasas	23
ANTECEDENTES PARTICULARES	28
HIPÓTESIS.....	43
JUSTIFICACIÓN.....	43
OBJETIVO GENERAL.....	44
OBJETIVOS PARTICULARES.....	44
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL.....	45
MATERIALES Y MÉTODOS	46
Análisis <i>in silico</i>	46
Cultivo de <i>Tritrichomonas foetus</i>	46
Cultivo de <i>Trichomonas vaginalis</i> (CNCD 147).....	46
Cultivo de Células MDBK.....	46
Cultivo de células HeLa	47
Fijación de células MDBK y HeLa	47
Extracción de proteasas por DOC- Sacarosa.....	47
Ensayo de ligando proteasas.....	48
Inhibidores.....	48
Extracción de RNA.....	48
Síntesis de cDNA.....	49
Diseño de oligonucleótidos	49
RT-PCR.....	49
RESULTADOS.....	51
DISCUSIÓN.....	72
CONCLUSIÓN	77
REFERENCIAS.....	78
ANEXO	84

ÍNDICE DE TABLAS

- I. Clasificación de las metaloproteinasas por sustrato.
- II. Familias de metaloproteinasas presentes en *T. vaginalis* y *T. foetus*.
- III. Características de las familias de metaloproteinasas de *T. foetus*.
- IV. Péptidos identificados por espectrometría de masas.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de *T. foetus*.

Figura 2. Ciclo de vida de *T. foetus*.

Figura 3. Mecanismos de patogenia de *T. foetus*.

Figura 4. Dominios estructurales de las metaloproteinasas.

Figura 5. Mecanismos de acción de las carboxipeptidasas.

Figura 6. Activación de metaloproteinasas

Figura 7. Perfil proteolítico de extractos totales de *T. foetus*.

Figura 8. Zimograma de sobrenadantes de cultivos de *T. foetus*.

Figura 9. Ensayo de citotoxicidad de *T. foetus* con las líneas celulares MDBK, HeLa y Vero.

Figura 10. Zimograma de la actividad proteolítica de *T. foetus*.

Figura 11. Zimograma de metaloproteinasas de *N. fowleri*.

Figura 12. Zimograma de la actividad de las metaloproteinasas GP63 de *L. mexicana* y *T. cruzi*.

Figura 13. Zimograma de la actividad de las metaloproteinasas de *T. brucei* a diferentes pH.

Figura 14. Zimograma de la actividad de las metaloproteinasas de *T. brucei* a diferentes temperaturas.

Figura 15. Zimograma de la inhibición de las metaloproteinasas de las formas de *T. brucei*.

Figura 16. Actividad de proteinasas de diferentes especies de tricomonas.

Figura 17. Zimograma de proteinasas de *T. vaginalis* tratadas con inhibidores.

Figura 18. Gel 2D del aislado de bovino.

Figura 19. Clasificación por familias de las metaloproteinasas de *T. foetus*.

Figura 20. Actividad de proteinasas totales de *T. foetus* a 4°C.

Figura 21. Actividad de proteinasas totales de *T. foetus* a 37°C

Figura 22. Actividad de proteinasas en interacción con células MDBK y HeLa.

Figura 23. Inhibición de la actividad de las proteinasas totales de *T. foetus*.

Figura 24. Inhibición de la actividad de las proteinasas totales de *T. foetus* en interacción con células MDBK.

Figura 25. Inhibición de la actividad de las proteinasas totales de *T. foetus* en interacción con células HeLa

Figura 26. Zimograma de proteinasas de *T. foetus* en interacción con células MDBK y HeLa para análisis de masas.

Figura 27. Secuencia de la metaloproteinasa TF69 de *T. foetus* identificada por espectrometría de masas.

Figura 28. Análisis semicuantitativo de la expresión del gen *tf69* de *T. foetus*.

Lista de abreviaturas

°C	Grado Celsius
Ca ⁺²	Ión Calcio
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CNCD 147	Aislado de <i>Trichomonas vaginalis</i> obtenido de mujer
CO ₂	Bióxido de carbono
Co ²⁺	Ión Cobalto
Cu ²⁺	Ión Cobre
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	Medio Dulbecco's modificado
DOC	Deoxicolato de sodio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Deoxinucleótidos tri-fosfatados
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EFF	Endoflagelar
EGTA	Ácido etilenglicol tetraacético
Fe ²⁺	Ión Hierro
HeLa	Células de carcinoma cervical de humano
kDa	Kilodaltones
mM	Milimolar
μl	Microlitro
ml	Mililitro
Mg ²⁺	Ión Magnesio
Mn ²⁺	Ión Manganeseo
MP	Metaloproteinasas
MS	Espectrometría de masas
Ni ²⁺	Ión Níquel
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida

PBS	Amortiguador salino de fosfatos
pH	Potencial de hidrógeno
PM	Peso molecular
PSA	Persulfato de amonio
RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con retro transcriptasa
SC	Suero de caballo
TA	Temperatura ambiente
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
<i>T. foetus</i>	Tritrichomonas foetus
<i>T. vaginalis</i>	Trichomonas vaginalis
TYM	Tripticasa-extracto de levadura y maltosa
Zn ²⁺	Ión Zinc

RESUMEN

El parásito protozooario flagelado *Tritrichomonas foetus* (*T. foetus*) es el agente causal de la tricomoniasis genital bovina, los machos son asintomáticos mientras que en las vacas, la infección varía de una vaginitis leve o cervicitis, endometritis, aborto e infertilidad. La tricomonosis bovina crea pérdidas económicas significativas ya que reduce desde el 12 hasta el 50% la producción de leche y carne. *T. foetus*, para establecer la infección en el ganado, requiere adhesión celular seguida de eventos de citopatogenicidad involucrados en la degradación de las células epiteliales vaginales de la mucosa del bovino. En este segundo evento, podrían estar involucradas las proteasas, que facilitan la infección y la propagación a través de los tejidos del huésped, así como la evasión del sistema inmune. Los estudios transcriptómicos demostraron que las metaloproteinasas de *T. foetus* son las que ocupan el tercer lugar en la expresión de las proteasas totales de este patógeno. Curiosamente, no hay estudios de metaloproteinasas involucradas en la interacción con las células bovinas. El objetivo de este trabajo fue determinar las metaloproteinasas con afinidad hacia las células MDBK. Para esto, llevamos a cabo un ensayo de ligando-proteinasa utilizando lisados totales de *T. foetus* e interaccionándolo con células MDBK fijadas. La actividad proteolítica de las proteinasas en interacción con la célula blanco se analizó en geles de poliacrilamida coopolimerizadas con gelatina encontrando proteinasas con pesos moleculares entre 30-150 kDa. Con la finalidad de determinar el tipo de proteinasas con afinidad a la célula blanco se utilizaron inhibidores: 1-10 fenantrolina, EDTA y EGTA, encontrándose que la actividad proteolítica era de metaloproteinasas. Posteriormente, se identificó una de las bandas con actividad proteolítica la cual se cortó y se identificó por espectrometría de masas, correspondiendo a una metaloproteinasa de 69 kDa que llamamos TF69, perteneciente a la familia M1, la cual utiliza el ión Zn^{2+} , el sitio catalítico donde se lleva a cabo la unión con su sustrato tiene los siguientes aminoácidos HEHEY. Finalmente se analizó la expresión del transcrito del gen que codifica para TF69 encontrando que se expresa antes y durante la interacción con las células MDBK, siendo inespecífica esta afinidad dado que también se expresa al contacto con las células HeLa.

ABSTRACT

Trichomonas foetus (*T. foetus*) is a flagellated protozoan parasite that causes bovine trichomonosis, the males are asymptomatic while in cows, the infection varies from mild vaginitis or cervicitis, endometritis, abortion, and infertility. Bovine trichomonosis generates economical losses related with milk and meat productions affecting from 12 to 50%. *T. foetus*, to establish infection in cattle, requires cell adhesion followed by cytopathogenicity events involved in mucosal and bovine vaginal epithelial cells degradation. In this second event, proteases could be involved, which facilitate infection and spread through host tissues, as well as evasion of the immune system. Transcriptomic studies showed that *T. foetus* metalloproteinases are in the third place of expression from total proteases of this parasite. Interestingly, until now there are not studies of metalloproteases involved in the interaction toward to the bovine cells. The aim of this work was to identify metalloproteinases with affinity toward the target cell (MDBK). For this, we carried out the ligand-proteinase assay using total lysates in interaction with the MDBK cells. The metalloproteinase activity was analyzed by polyacrylamide gel co-polymerized with gelatin. The results showed activity bands in the molecular weight between 30-150kDa. In order to determinate the metalloproteinase type, we performed the ligand-proteinase assay in presence of the inhibitors such as : 1-10 phenanthroline, EDTA and EGTA, the data showed that the major proteolytic activity was from metalloproteinases. After, one of the bands with proteolytic activity was cut and identified by mass spectrometry, corresponding to a 69 kDa metalloproteinase, we called it TF69, belonging to the M1 family, which uses the Zn^{2+} ion, and the catalytic site for the bind to substrate has the HEHEY amino acids. Finally, the expression of the gene coding for TF69 was analyzed during the interaction with the MDBK cells, the results showed that it is expressed before and during the interaction with MDBK cells, however, this interaction is non-specific with the MDBK cells because it is also expressed to the contact with HeLa cells.

INTRODUCCIÓN

1.1 Características de *Tritrichomonas foetus*

El parásito *Tritrichomonas foetus* (*T. foetus*) es causante de la tricomoniasis genital bovina, que se transmite por contacto sexual. Este parásito tiene forma oval, mide de 12-17 × 6-11 micras. El citoesqueleto de *T. foetus* está constituido por el axostilo (formado por 10 microtubulos), que recorre las $\frac{3}{4}$ partes del parásito; también presenta una pelta, tres flagelos anteriores y un flagelo recurrente (Borchet, 1900). Debido a la plasticidad de su protoplasma adopta diversas formas según sus requerimientos fisiológicos: la forma de trofozoíto caracterizada por tener una forma elongada que constituye la mayor parte de la población de parásitos, y otra forma pseudoquística o endoflagelar (EFF), que es ovoide e inmóvil, esta forma se observa en condiciones de medio ambientales desfavorables como, temperatura a 4°C (*in vitro*), deficiencia de nutrientes y en presencia de fármacos como la Colchicina (Fig. 1) (Campero y Cobo, 2006).



Fig.1 Morfología de *T. foetus*. a) Trofozoíto de *T. foetus* en el cual se observan 3 flagelos anteriores y uno posterior; b) Forma endoflagelar ovalada de *T. foetus* en la cual no se observan sus flagelos ya que los internaliza (Pereira y cols. 2014).

Este parásito al igual que *T. vaginalis* no posee mitocondrias, pero tiene hidrogenosomas que son organelos electrodensos que contienen enzimas como la piruvato deshidrogenasa y la ferredoxina, que realizan la glicólisis y producción de ATP anaeróbica del piruvato y malato que constituyen una parte integral del metabolismo energético de *T. foetus*, sin embargo este organelo no presenta DNA como la mitocondria (Benchimol y cols. 1996).

El genoma de *T. foetus* se secuenció a partir del aislado de la cepa “K” (aislado de un toro de Brasil), se encuentra distribuido en 5 pares de cromosomas (Dong y cols., 1998), su tamaño se estimó de 161, 213,455 pb. En las secuencias se identificó que el 72% de los marcos de lectura abiertos (ORF) son homólogos a los de *T. vaginalis* y las secuencias únicas de *T. foetus* solo representan el 28% en el genoma (Benchimol et., al 2017). Presenta secuencias repetidas que representan el 62% de su genoma, estas secuencias codifican proteínas involucradas en el metabolismo del parásito tales como: Fosfofenol piruvato carboxiquinasa que presenta 4 genes diferentes, Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa con 3 repeticiones del gen, Malato oxidorreductasa se repite 2 veces el gen, Fructosa-1,6-bisfosfato también se repite 2 veces el gen, Tiorredoxina peroxidasa se presenta 3 veces el gen, Malato deshidrogenasa tiene 2 repeticiones del gen, Malato oxidoreductasa también tiene 2 repeticiones del gen, Enolasa presenta 2 repeticiones del gen. Las secuencias de genes que codifican para proteínas que participan en la estructura celular y la motilidad también presentan repetidos como la actina tiene 7 repeticiones del gen, α -tubulina se repite 7 veces el gen y β -tubulina el gen también se repite 7 veces. En el proceso de duplicación de genes, la selección natural mantiene la función original de un gen preexistente, mientras que una copia podría perder la función o adquirir una nueva función (Oyhenart y Breccia, 2014. Morin y cols 2015. Slapeta y cols. 2012).

1.2 Ciclo de vida y patogenicia

El parásito *T. foetus* tiene un solo huésped, el cual es el bovino y se transmite exclusivamente por vía sexual. Los trofozoítos se transmiten entre vacas y toros

durante el coito y permanecen en el tracto genitourinario donde se multiplican por la fusión binaria longitudinal. En condiciones de estrés, los trofozoítos internalizarán sus flagelos y se producirá la replicación de los núcleos y otras estructuras celulares, la forma endoflagelar del parásito será multinucleado; cuando las condiciones se vuelvan favorables, volverá a su forma trofozoítica (Fig. 2) (Barratt y cols. 2011).

Los signos y síntomas clínicos de la tricomoniasis bovina son, en la hembra, infertilidad, vaginitis, endometritis, mortalidad embrionaria, y ocasionalmente abortos (Campero y Cobo., 2006).

La patogenia de *T. fetus* en las hembras se caracteriza por invadir la vagina induciendo una respuesta inflamatoria leve caracterizada por proliferación de linfocitos y macrófagos, ocasionando secreciones vaginales por 13 a 28 semanas, posteriormente coloniza el cérvix y el útero generando de una moderada a una severa endometritis con presencia de agregado linfoides y células inflamatorias, estos síntomas se manifiestan entre los 63 a 74 días post infección, incrementando la severidad a partir en los 90 días asociados con la pérdida embrionaria o aborto (Campero y cols. 1993). Este proceso infeccioso, induce en la hembra una respuesta inmune a nivel sistémico y local en el tracto reproductor donde la inmunidad de mucosas cumple un rol importante, que en algunos casos elimina el protozoario antes de los 4 o 5 meses post infección. No obstante, en otros casos, la hembra permanece infectada durante más de un año (Doumec y Soto., 2012. Ondrak., 2016).

Cabe mencionar que los machos son portadores asintomáticos del parásito debido a que *T. fetus* coloniza exclusivamente los estratos superficiales de la mucosa de la cavidad prepucial, incluyendo las criptas peneanas, fornix y parte distal de la uretra, aunque puede presentar una secreción purulenta en las primeras semanas de la infección; con el tiempo se profundizan las criptas epiteliales del pene proporcionando un microambiente adecuado para el parásito, es por ello que existe una mayor frecuencia de presentación en los toros adultos y viejos, pese a ello los toros jóvenes pueden tener tricomoniasis (Owen y Crews., 2006. Campero y Ladds. 1991).

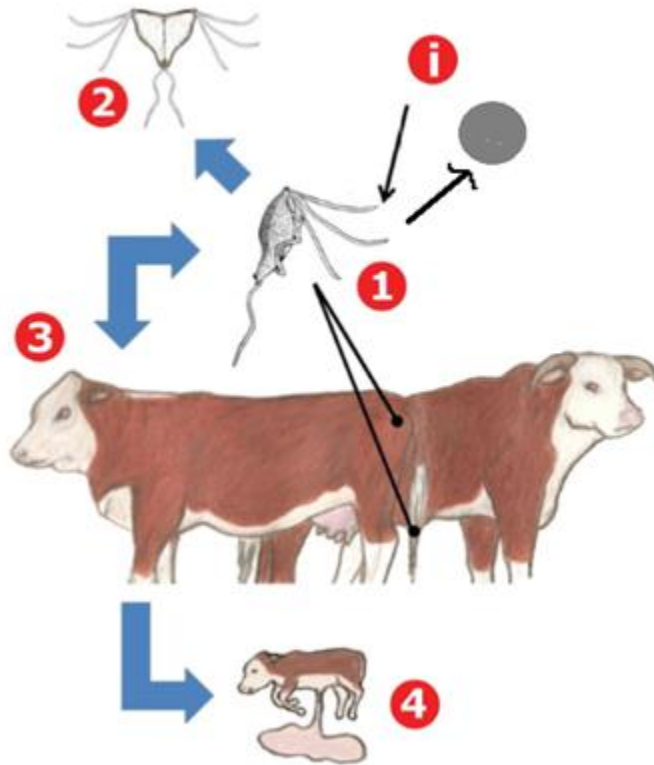


Fig.2 Ciclo de vida de *T. foetus*. El ciclo de vida de *T. foetus* inicia con 1) Transmisión por contacto sexual; i) la forma endoflagelar es persistente en condiciones de estrés; 2) reproducción por fisión binaria 3) invasión del tracto reproductivo de la hembra y 4) aborto del feto a causa de la tricomoniasis (Barratt y cols. 2011).

1.3 Prevalencia y diagnóstico

El impacto productivo de la tricomoniasis bovina radica en la pérdida de la preñez ocasionada por *T. foetus* causando pérdidas económicas severas en la producción de carne y leche, la reducción de la producción es del 12 al 50% (Campero M. 2002). Los estudios han reportado a rebaños infectados por *T. foetus* en Estados Unidos de América (California 18.8% y Florida 30.4%), Argentina (24%), Costa Rica (18%) Sin embargo, actualmente no existe un programa de monitoreo mundial para rastrear la

prevalencia y la incidencia de esta parasitosis (Michi y cols. 2015. Collantes E y cols. 2019).

En España se hizo un estudio retrospectivo en donde se llevó a cabo un muestreo en diferentes rebaños desde enero de 2011 hasta el 2015 y la prevalencia fue, en toros del 12.8% y en los rebaños del 20.8%. Debido a que los toros son portadores asintomáticos se ha estudiado la prevalencia y se vio que los toros jóvenes menores de tres años son portadores transitorios ya que permanecen infectados solo por breves períodos; además al remplazar por toros de dos años en un ganado por los toros de ocho años que representaban el 47% de prevalencia de la tricomoniasis, después de un año la prevalencia se redujo al 1%. Al muestrear al mismo grupo después de dos años la prevalencia aumento al 4% y después de cuatro años la prevalencia aumento un 13% lo que significa que el aumento de la prevalencia se correlaciona con el aumento de la edad de los toros. El control de la tricomoniasis se puede realizar previniendo la entrada de machos y hembras infectadas comprando solo vaquillas, evitar el pastoreo comunitario de diferentes ganados, tener a los toros del rebaño jóvenes (Owen y Crews., 2006. Gómez y cols. 1998).

El diagnóstico de la tricomoniasis bovina se puede realizar por microscopia haciendo un raspado en el prepucio, así como con la toma de muestra de líquido prepucial, espermatozoides, y esmegma. En las hembras se toma una muestra del moco cervicouterino, piometrias, de fetos abortados y placenta. Las muestras se pueden observar directamente al microscópio y además deben ser inoculadas en medio de cultivo, incubadas a 37°C durante 7 días y finalmente, la identificación de *T. foetus* al microscopio óptico se basa en el tamaño y forma del protozoo, la existencia de sus tres flagelos anteriores y uno posterior, la membrana ondulante (BonDurant y cols. 2003. Campbell B y Gajadhar A. 1999). El diagnóstico por microscopia se puede confirmar por medio de una PCR, la cual consiste en amplifica el gen del rRNA de la subunidad 5.8s (Jacobs y cols., 1998. Felleisen R. 1997)

1.4 Mecanismos de virulencia

La adhesión de *T. foetus* al epitelio vaginal es importante para la colonización del tracto reproductor bovino, este evento es específico y complejo, en donde están implicadas moléculas del parásito y del hospedero. La superficie celular del hospedero, es decir, epitelio del tracto reproductor es rico en glicoconjugados, como es el caso del ácido siálico, el cual participa en el reconocimiento celular, comunicación con las células del sistema inmune y mantener la integridad de la mucosa (Tolbert y Gookin., 2016)

Las células del epitelio vaginal bovino presentan cargas negativas y la superficie de las tricomonas también por lo que, en primer lugar hay un reconocimiento a través de las adhesinas y luego hay un cambio electrostático de membrana en el cual intervienen las neuraminidasas las cuales promueven el contacto parásito-célula disminuyendo la electronegatividad y permitiendo la proximidad de ambas células. Las neuraminidasas hidrolizan la unión glicosídica entre los glicoconjugados superficiales y el ácido sálico dejando al descubierto glicoconjugados celulares internos, los cuales posteriormente serán degradados por otras enzimas del parásito. La presencia de neuraminidasa endógena como la fosfolipasa de *T. foetus* se ha relacionado con la capacidad de contacto de los parásitos a la superficie de la célula epitelial a distancias por debajo de 30nm (López y cols., 2000).

La matriz extracelular del tracto urogenital de los bovinos está compuesta de una compleja variedad de glicoproteínas y proteoglicanos como las lamininas (LMN) y las fibronectinas (FN) las cuales proporcionan un marco estructural para los tejidos. *T. foetus* reconoce a la LMN a través de una manosa y el parásito adopta la forma ameboide y cambia la conformación de la laminina-1 adhiriéndose así a las células del huésped. Para que las tricomonas puedan unirse a la LMN es esencial la presencia de Mn^{2+} mientras que la presencia de Ca^{2+} y Mg^{2+} disminuyen la afinidad, al contrario para la unión a la FN la presencia de Ca^{2+} y Mg^{2+} son esenciales para aumentar la afinidad de los receptores de las tricomonas (Barreiros y cols., 2008; López y cols., 2000).

Las adhesinas de *T. foetus* son componentes superficiales de la membrana citoplasmática del protozoario, la más abundante es el lipoglucopeptido (Lpg) Tf190, otra adhesina es la glicoproteína Tf1.17 de 50-70 kDa de 190kDa, estos en conjunto con otras proteínas como las neuraminidasas y las Cisteinproteinasas (CPs), llevan a cabo la citoadherencia y la citotoxicidad (Fig.3) (Kennetta y Hook., 2002).

Las CPs de *T. foetus* tienen una función importante en la patogenia debido a que degradan varias proteínas del hospedero como fibrinógeno, fibronectina, albúmina y lactoferrina, ayudan a *T. foetus* en la adquisición de hierro, en la adhesión celular, en la desintegración de la matriz extracelular epitelial (Doumec y Soto., 2013).

La actividad de las CPs ha sido analizada a partir de geles de sustrato con gelatina y se han observado con distintos pesos moleculares que van desde 20 kDa hasta 120 kDa (Lockwood y cols., 1987. Mallinson y cols., 1995). En el genoma de este parásito se han identificado 9 genes que codifican para algunas CPs de *T. foetus*, la expresión de los genes de las CPs pueden confirmarse por análisis del transcriptoma y se han reportado 15 transcritos de CP (TfCP05, TfCP08, TfCP09, TfCP10, TfCP11, TfCP12., TfCP13, TfCP14, TfCP15, TfCP16, TfCP17, TfCP18, TfCP19, TfCP20 y TfCP21), de los cuales el transcrito de la CP8 presenta una mayor expresión en *T. foetus*, seguido de CP16 y CP13 (Yang y cols., 2013). Singh y colaboradores en 2004 demostraron que la proteasa CP30 participa en la citotoxicidad e induce apoptosis en células BVEC (células epiteliales vaginales de bovino) debido a la lesión celular que provocan estas enzimas se sugirió que esta acción también podría afectar al tejido placentario; por otro lado por otro lado, las CPs al producir hidrólisis sobre la fibronectina y fibrinógeno también alteran el mecanismo de eliminación del protozoario al impedir la unión parásito-neutrófilo o macrófago, esta etapa es necesaria para que se lleve a cabo la fagocitosis. Las CPs más importantes de *T. foetus* son la CP30 y la CP8, estas proteasas producen citotoxicidad en líneas celulares y se las asocia con la inducción de apoptosis de células epiteliales vaginales y uterinas, dicho mecanismo de apoptosis pareciera ser por la activación de la caspasa 3 (Lucas y cols., 2008).

Las CPs también le permiten al parásito evadir la respuesta inmune, esto es debido a la degradación de inmunoglobulinas, principalmente IgA e IgG, localizada en vagina y útero respectivamente. Las CPs también pueden degradar el complemento la fracción C3 del complemento inhibiendo la formación de C3b y la cascada de activación del complemento (Kania y cols. 2001).

La forma del trofozoíto de *T. foetus* presenta diferentes mecanismos de virulencia como ya se describió anteriormente, sin embargo la forma endoflagelar también se puede adherir a las células epiteliales Pereira y colaboradores en 2012 evaluaron el efecto citotóxico que ejercen los pseudoquistes sobre las células MDCK, observaron que hay una disrupción de la monocapa celular de manera dependiente al tiempo y también hay un daño en las vellosidades de las células ya que se disminuyeron. En comparación con el trofozoíto, estos ocasionaron la disrupción de las células a partir de 2.5 horas y los parásitos en forma endoflagelar ocasionaron un daño a partir de 1.5 horas de co-incubación. Otras características de daño celular fueron mitocondrias hinchadas y pérdida de la electrodensidad de la matriz mitocondrial, lo que conyeba a la reducción de la viabilidad de las células MDCK. Los mecanismos de los efectos citotóxicos ocasionados a partir de la forma de pseudoquiste no se han estudiado, como es el caso de los trofozoítos, sin embargo tampoco se ha aclarado completamente las moléculas que participan en la virulencia.

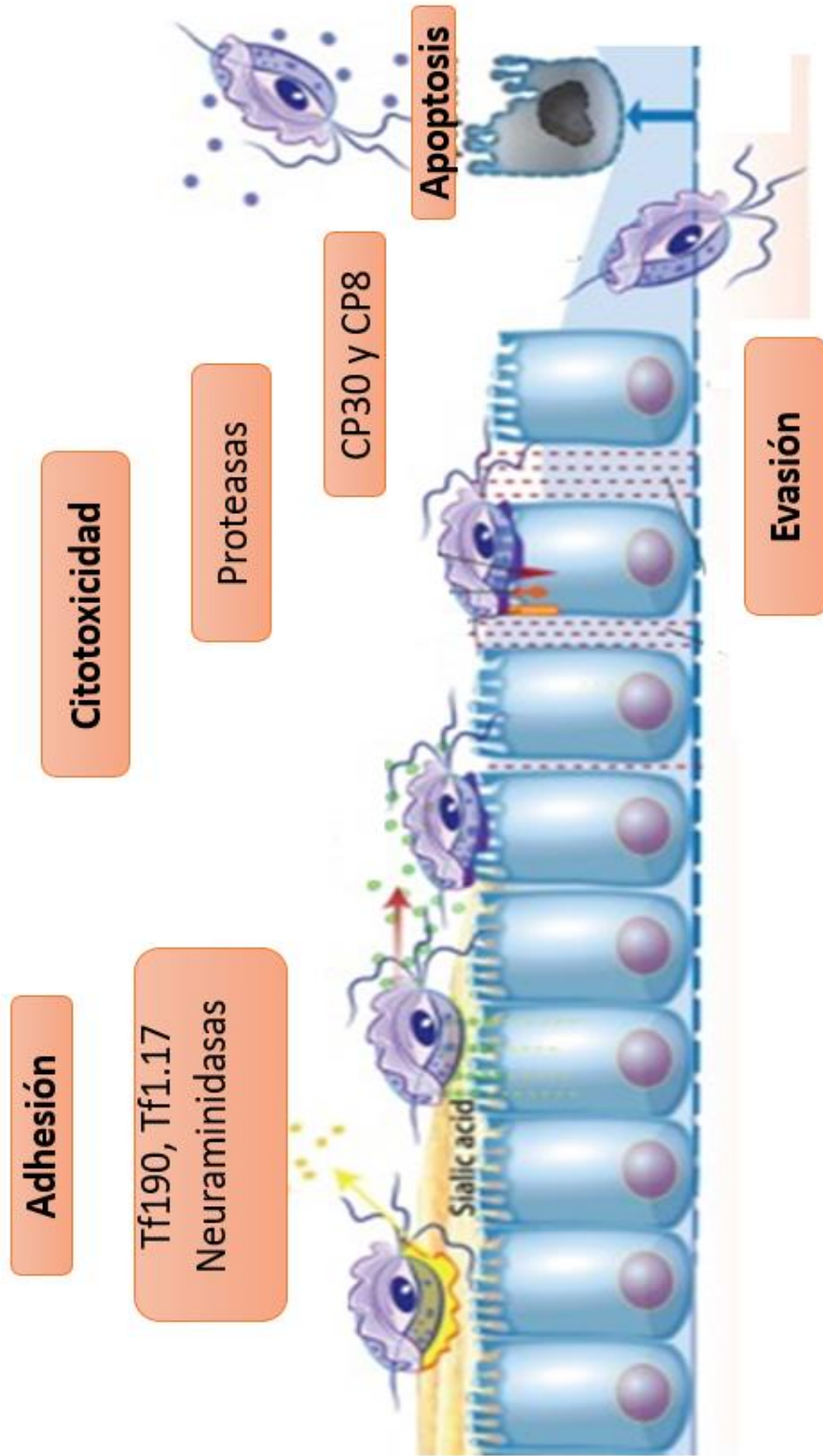


Fig.3 Mecanismos de patogenia de *T. foetus* (tomada y modificada de Tolbert y Gookin., 2016). En primer lugar el parásito se debe adherir al epitelio vaginal lo cual lo lleva a cabo por las adhesinas Tf190, Tf1.17 y neuraminidasas, posteriormente con ayuda de proteasas como la CP30 y CP8 degrada componentes de la matriz extra celular e induce apoptosis a las células epiteliales.

1.5 Metaloproteinasas

Las metaloproteinasas son una familia de endopeptidasas (actúan internamente en la cadena polipéptica) y exopeptidasas (escinden en los extremos amino o carboxilo terminal) que tienen múltiples funciones en la remodelación y degradación de tejidos de varias proteínas de la matriz extra células (ECM), en el desarrollo embrionario, morfogénesis, adhesión celular, apoptosis celular, angiogénesis, entre otras (Auld, 2013. Nagase y Woessner., 1999).

Las metaloproteinasas se clasifican en función de sus sustratos y en la organización de sus dominios como colagenasas, gelatinasas, estromelisin, matrilisin, de membrana y otras, las cuales se dividen en familias como se muestra en la tabla 1 (Visse y Nagase., 2003).

Tabla I. Clasificación de las metaloproteinasas por sustratos.

Tipo	Familia	MW zimógeno/activa	Sustratos de colágeno
COLAGENASAS	M1	55/45	I, II, III, VII, VIII, X, gelatina
	M8	75/55	I, II, III, V, VII, VIII, X, gelatina
	M13	60/48	I, II, III, IV, IX, X, XIV gelatina
	M18	70/53	I, II, III, gelatina
GELATINASAS	M2	72/63	I, II, III, IV, V, VII, X, XI, gelatina
	M9	92/86	III, IV, V, VII, IX, X, XIV, gelatina
ESTROMELISINAS	M3	57/45	II, III, IV, IX, X, XI, gelatina
	M10	57/44	III, IV, V, gelatina
	M11	51/44	Gelatina,
MATRILISINAS	M7	29/20	IV, X, gelatina, elastina, colágeno
	M26	28/19	IV, gelatina, fibrinógeno
OTRAS	M12	54/45	IV, gelatina
	M14	66/56	I, II, III, gelatina

M15	72/50	I, gelatina
M16	64/52	I
M17	57/53	Gelatina
M19	54/45	I,IV, gelatina
M20	54/22	V, gelatina
M21	62/49	
M22	51/51	Gelatina
M23	28/19	Gelatina
M24	57/53	Gelatina
M25	34/28	IV, gelatina
M28	56/45	

Los dominios estructurales de las metaloproteinasas (Fig.4) son: 1) el propéptido de aproximadamente 80 aminoácidos, tiene la secuencia $\text{PR}\underline{\text{C}}\text{G}$, la cual presenta una cisteína conservada que une al metal manteniendo a la proenzima inactiva. 2) El dominio catalítico contiene el motivo (HEHGH) de unión al Zn^{+2} es de aproximadamente 170 aminoácidos, y consiste en cinco láminas- β y tres α -hélices; además del Zn^{2+} tiene de dos a tres iones de Ca^{2+} . 3) El dominio péptido señal que le permite la ubicación celular a la proteína, principalmente es hidrofóbico. 4) El dominio hemopexina tiene alrededor de 210 aminoácidos consiste en cuatro laminas- β y una α -hélice rica en prolina que interactúa con la EMC para determinar la especificidad del sustrato. En los dominios hay algunas variaciones por ejemplo las gelatinasas tienen tres repeticiones de fibronectina de unión a colágeno tipo II en el dominio catalítico y las matrilisinas no tienen una región bisagra ni hemopexina, tienen una secuencia (RKRR) al final del propéptido que les permite ser activadas por furina (Nagase, 1999) (Prakash., 2012) (Cuin N y cols. 2017).

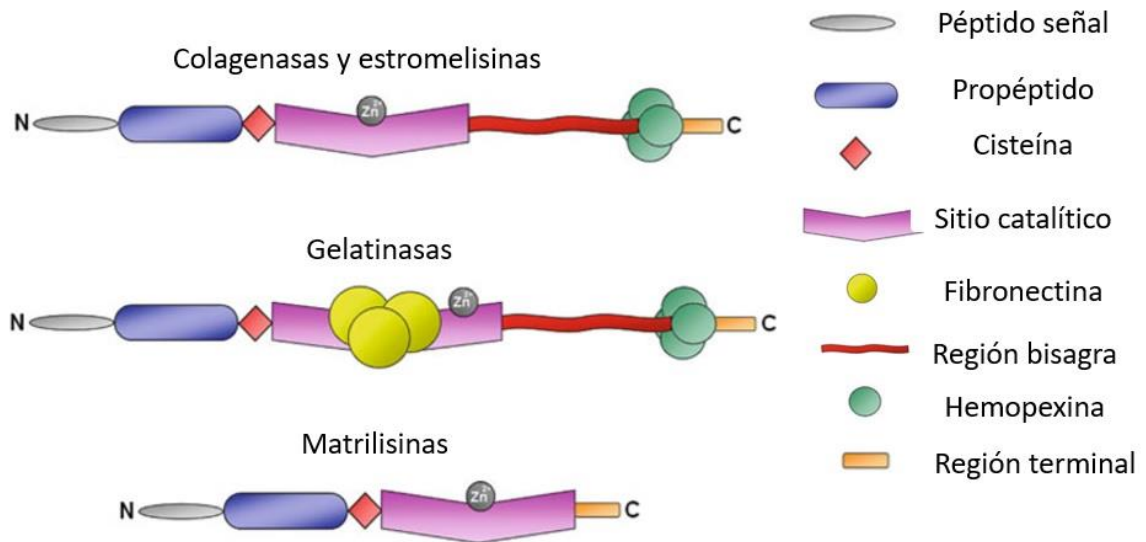


Fig.4 Dominios estructurales de las metaloproteinasas. En general constan de un péptido señal, un propéptido seguido de una cisteína, un dominio catalítico, una región bisagra. Las diferencias son que las gelatinasas en el dominio catalítico también tienen fibronectina (en amarillo) y las matrilisinas no tienen una región bisagra.

Las metaloproteinasas contienen un ión metálico divalente en el sitio activo, el ión es usualmente coordinado por tres aminoácidos (His, Asp, Glu) y es necesaria una molécula de agua para llevar a cabo la hidrólisis de los enlaces peptídicos. El metal que se encuentra con mayor frecuencia es el Zn^{2+} , sin embargo también pueden encontrarse en el sitio activo el Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} o el Fe^{2+} .

En el sitio catalítico el Zn^{2+} forma complejos con donantes de Nitrógeno (His) y oxígeno (Glu y Asp), los ligandos del Glu y Asp reducen la carga del metal y el agua unida al metal se ioniza y el ataque nucleofílico en el enlace peptídico es mediado por la molécula de agua (fig5) (Nagase, 2001. Auld, 2013).

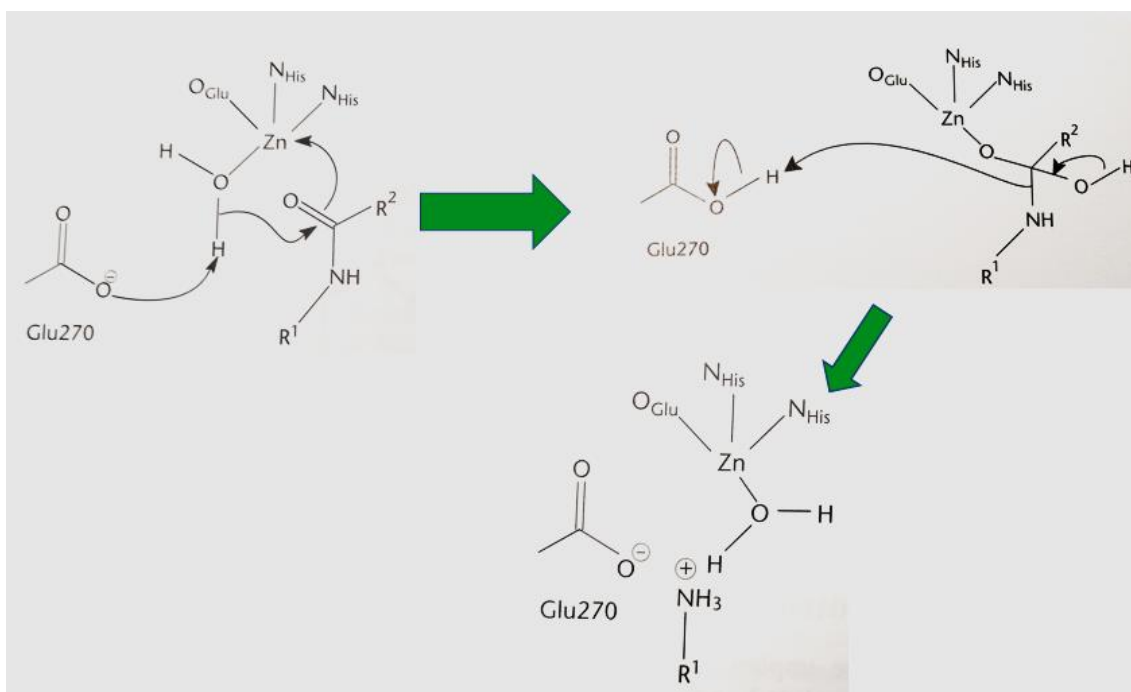


Fig.5 Mecanismos de acción de las Carboxipeptidasas A (figura tomada y modificada de Cox M y Phillips G. 2007). El Zn^{2+} está coordinado por dos Nitrógenos de las Histidinas, el Oxígeno del Glutámico, una molécula de agua y el carbonilo del sustrato. El glutámico actúa como base eliminando un protón del agua unido al metal facilitando el ataque nucleofílico. Posteriormente el glutámico actúa como ácido al donar un protón a la amina saliente del sustrato y el agua se vuelve a unir al metal.

Las MMP se sintetizan como pre-proMMP, el péptido señal se elimina tras la traducción para generar proMMP, estos zimógenos o proMMP en el dominio del propéptido tiene la firma PRCGXPD en donde la Cisteína funciona como interruptor al coordinar al Zn^{2+} para mantener inactivo al proMMP (Cui y cols. 2018).

Las MMP se pueden activar *In vitro* por proteinasas o por agentes químicos como acetato de 4-aminofenilmercurio, HgCl_2 , glutatión oxidado, SDS, agentes caotrópicos,

pH y el tratamiento térmico también pueden conducir a la activación. Estos agentes pueden actuar en la interacción de la Cisteína con el Zn^{2+} . La escisión inicial ocurre dentro del propéptido (intramolecular), la eliminación del resto del propéptido se lleva de forma intermolecular de los intermediarios generados. El ataque proteolítico ocurre en una región o bucle expuesta y al eliminar una parte del propéptido, probablemente desestabiliza el resto del propéptido que permite el procesamiento intermolecular. Un paso final podría deberse a la plasmina generada a partir del plasminógeno y su activador la uroquinasa unido al receptor específico de la superficie celular (Visse y Nagase. 2003).

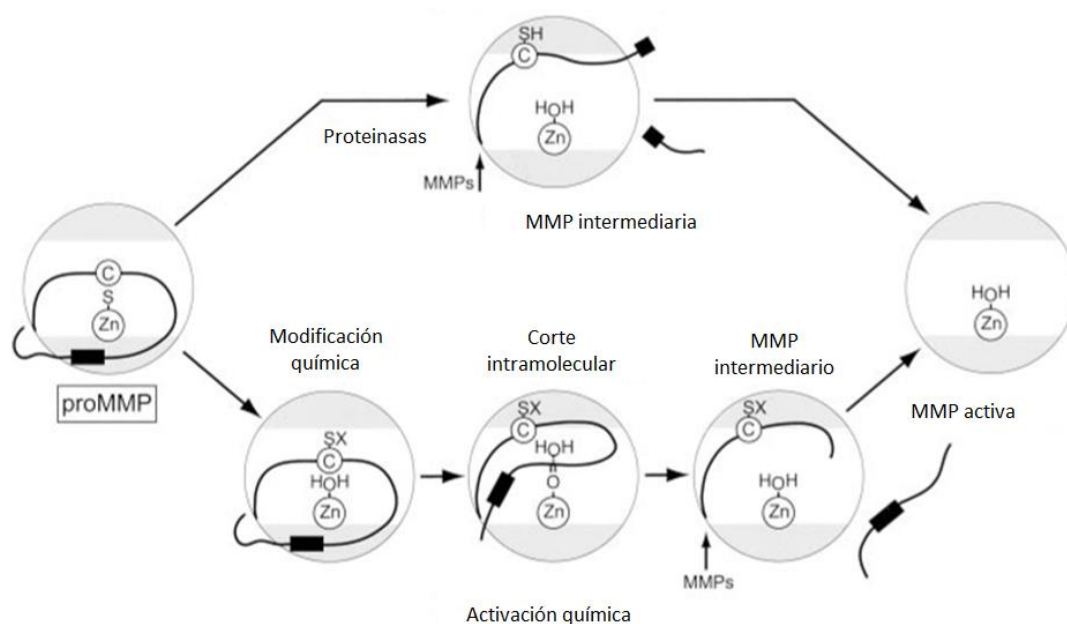


Fig. 6 Activación de Metaloproteinasas (figura tomada y modificada de Visse y Nagase. 2003). El dominio catalítico es el círculo gris, con la hendidura del sitio activo en blanco que contiene el Zn . El propéptido se muestra como una línea negra y el interruptor de Cisteína. La activación química se basa en la modificación del interruptor, lo que resulta en la escisión intramolecular del propéptido y finalmente en la activación total.

Los inhibidores de las proteasas son útiles para la caracterización de las metaloproteinasas y para la inhibición de la proteólisis no deseada, los que pueden fungir como inhibidores terapéuticos. Los agentes quelantes como el EDTA y 1-10 fenantrolina se usan para el bloqueo de la inhibición de forma in vitro. Los inhibidores sintéticos se han diseñado para detener la actividad de metaloproteinasas específicas, que generalmente contienen un quelante unido a otros grupos para interactuar de manera específica (Wiley y Sons. 2001).

ANTECEDENTES PARTICULARES

T. foetus interactúa con las células epiteliales urogenitales, en la interacción células-parásitos, los parásitos destruyen a las células, esto parece depender de la expresión de moléculas específicas como las proteasas; las proteasas de *T. foetus* pueden ser tanto intracelulares como extracelulares, y están directamente involucradas en la citotoxicidad ejercida a las células, ya que degradan componentes de la EMC. La actividad de las proteasas intracelulares se obtuvo a partir de un zimograma, en donde se extrajeron las proteasas totales de la cepa K y cinco subcepas de *T. foetus*. La actividad se observa en dos regiones de alto peso molecular y una fuerte actividad de bajo peso molecular (Fig. 7), sin embargo, no se observa diferencia de la actividad de las proteasas entre las subcepas (Da Rocha y cols. 2005).

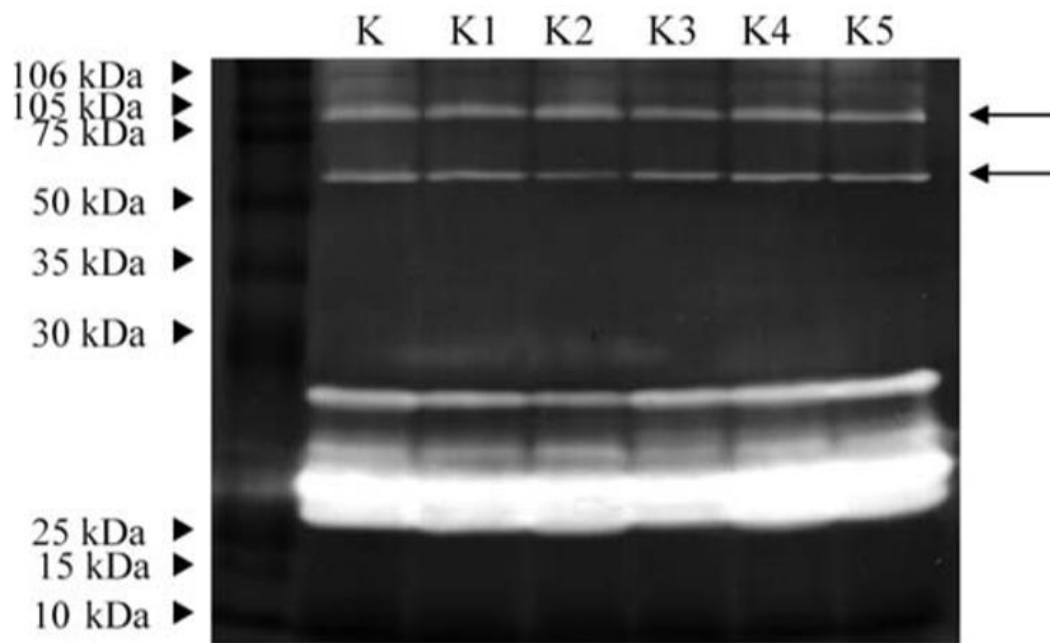


Fig.7 Perfil proteolítico de extractos totales de *T. foetus* en un gel de acrilamida al 12% con gelatina al 0.2%. Las flechas marcar la actividad de alto peso molecular.

Da Rocha y colaboradores analizaron la actividad de las proteasas totales pero también las que están presentes en los sobrenadantes de los medios de cultivo de la cepa K y 5 subcepas (fig 8). Las diferencias que encontraron en los secreciones fue una banda de bajo peso molecular la cual tiene una actividad diferencial en la subcepa K2, mientras las cepas de K3, K4 y K5 presentaron una actividad similar y finalmente los productos de la cepa parenteral K y K1 mostraron una actividad proteolítica débil con respecto a las otras subcepas..

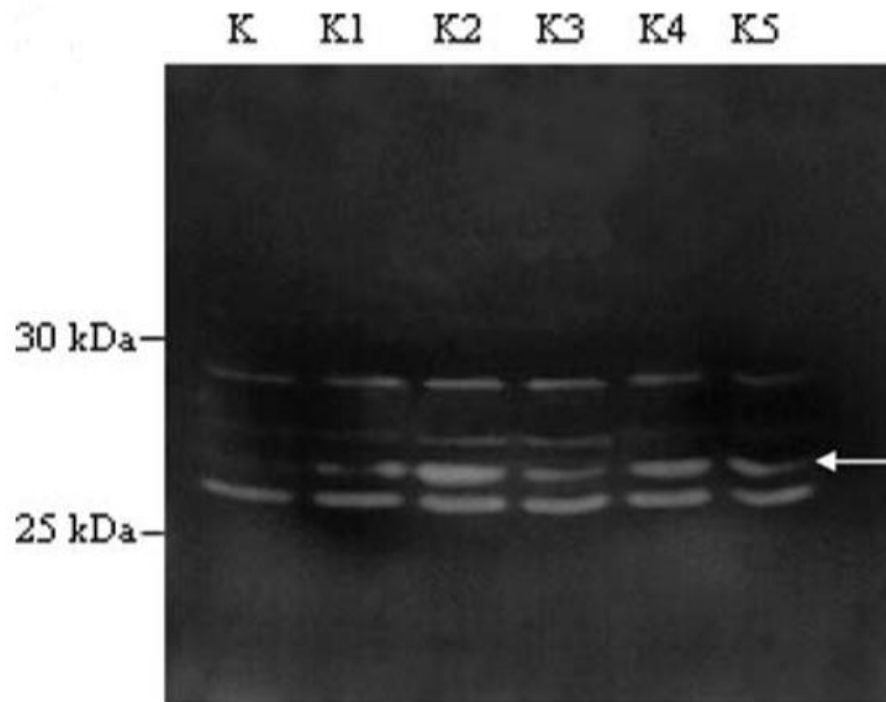


Fig.8 Zimograma de sobrenadantes de cultivo de *T. foetus* con sustrato de gelatina al 2%. La flecha indica una banda de bajo peso molecular que presenta actividad diferencial entre las diferentes cepas.

Los protozoarios parásitos como las tricomonas causan un daño a las células del hospedero a través de un efecto citotóxico por mecanismos contacto dependiente o independiente, en este último podrían estar involucradas enzimas que son capaces de degradar componentes de la EMC como el colágeno. *T. foetus* tiene la capacidad de dañar diferentes líneas celulares de mamíferos como son las células Vero (células epiteliales de riñón de mono), células HeLa (células de cáncer cervical de humano) y células MDBK (células epiteliales de riñón de bovino). El daño que ocasiona este parásito a las células blanco se investigó usando cuatro diferentes cepas del parásito (685, 685.2, CA y UT) observándose (Fig. 9) que cuatro de cepas de *T. foetus* ocasionan daño a las células HeLa, mientras que solo las cepas 685 y 685.2 son citotóxicas para las células MDBK, mientras que no se observó citotoxicidad

significativa en las células Vero con ninguna de las cepas. Además, cabe resaltar que la citotoxicidad de *T. foetus* contra las células HeLa se vio a las 16h, mientras que para las MDBK fue hasta las 20h de inoculación (Burgess y cols. 1990).

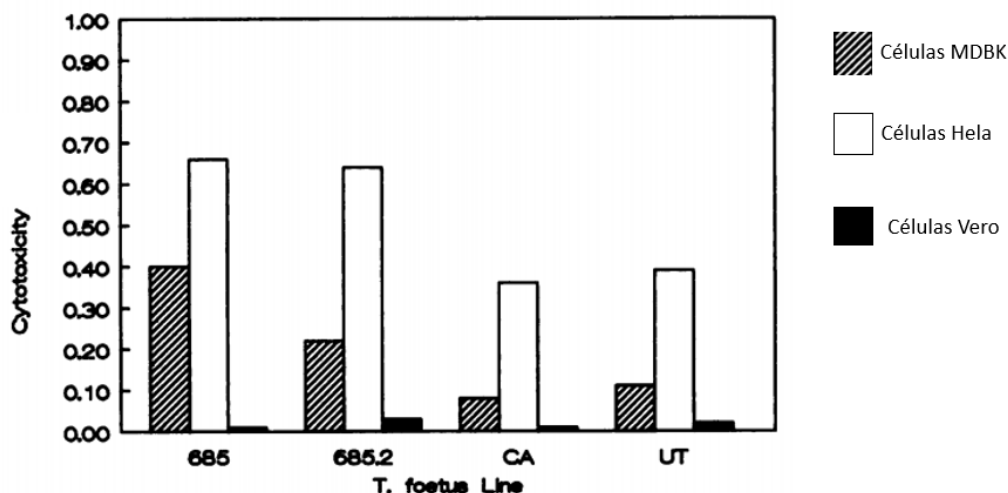


Fig.9 Ensayo de citotoxicidad con las líneas celulares MDBK (barras rayadas), HeLa (barras blancas) y Vero (barras negras) con las cepas de *T. foetus* 685 y 685.2 (Montana), CA (California) y UT (Utah).

T. foetus posee una gran cantidad de proteasas, Borges y cols. 1990 evaluaron la capacidad citotóxica en base a la actividad proteolítica de estas proteasas sobre un sustrato; esto se analizó en geles de acrilamida copolimerizados con gelatina al 0.1%, teniendo pesos moleculares por debajo de los 24 kDa y por arriba de los 60 kDa, además se utilizaron inhibidores como Leupeptina y PSMF (Fluoruro de fenilmetilsulfonilo) como se muestra en la figura 10.

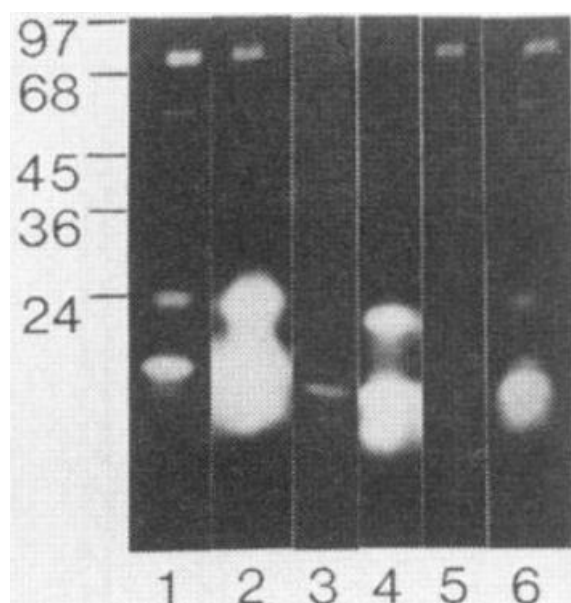


Fig.10 Zimograma de actividad proteolítica de *T. foetus*. En el gel de acrilamida al 12.5% con sustrato de gelatina muestra en el carril 1 control; 2 parásitos más 5mM de DTT; 3 parásitos con PMSF 1mM; 4 parásitos con PMSF 1mM más 5mM de DTT; 5 parásitos más 1mM de leupeptina y 6 parásitos más 1mM de leupeptina y 5mM de DTT.

T. foetus se adhiere a las células epiteliales vaginales bovinas provocando inflamación e invadiendo el tejido placentario bovino. Se han hecho algunos experimentos de este parásito en interacción con la línea celular MDCK (epiteliales de riñón de perro). Los parásitos se adhirieron del flagelo posterior hacia el axostilo, y después de cuatro días de interacción ocasionaron una disrupción en la monocapa de las células MDCK (Filho y Souza. 1988).

Para estudiar la tricomoniasis bovina se han utilizado células BVEC (células epiteliales vaginales de bovino), se pusieron a interaccionar con *T. foetus* y por aparte con *T. vaginalis*, en donde también *T. foetus* se adhirió a partir del flagelo posterior hacia el axostilo y algo interesante es que *T. vaginalis* no se unió fuertemente lo que sugirió que las interacciones de *T. foetus* a estas células son específicas. *T. foetus* causó una disrupción en la monocapa a partir de las 48h (Singh B y cols. 2004).

Las metaloproteinasas en algunos parásitos protozoarios confieren la capacidad de degradar proteínas y esto facilita la infección y la diseminación de los mismos a través de los tejidos del hospedero. También estas proteinasas participan en la evasión del sistema inmune del huésped (Cuevas y cols. 2003. Geurts N. y cols. 2012).

En el parásito protozoario *Naegleria fowleri* (*N. fowleri*) por medio de un Zimograma con sustrato de gelatina al 1% se observó que la actividad de las metaloproteinasas está en la región de 100 a 250 kDa. La actividad se verificó a las 6 y 18 horas, en donde a las 18 horas se ve una mejor actividad que a las 6 horas, además se pusieron los inhibidores de metaloproteinasas EDTA y 1,10 Fenantrolina y se observa (Fig.11) que hay una disminución de la actividad en comparación con los controles en donde se adicionó DMSO y agua. Las metaloproteinasas de este parásito le permiten degradar la EMC en el sistema nervioso central, por lo que contribuyen a la patogenicidad (Lam C y cols. 2017).

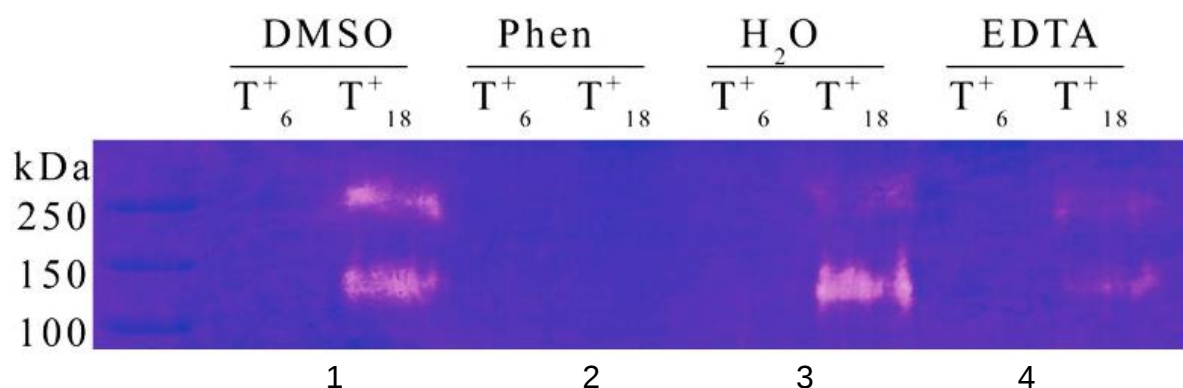


Fig.11 Zimograma de metaloproteinasas de *N. fowleri*. Se muestra en el carril 1 control con DMSO, en donde se ve la actividad a 6 y 18 h; carril 2 metaloproteinasas con el inhibidor 1,10 Fenantrolina, carril 3 control positivo con agua y carril 4 metaloproteinasas con el inhibidor EDTA (Lam C y cols. 2017).

En *Leishmania* se ha caracterizado la metaloproteinasa GP63 o leishmanolisina, la cual es una metaloproteinasa dependiente de Zn^{2+} que se encuentra en la superficie del parásito tiene una amplia gama de sustratos que incluyen caseína, gelatina, albúmina, hemoglobina y fibrinógeno (Oliver y cols., 2012). En el dominio catalítico tiene la firma HExxHxxGxxH lo cual indica que esta Metaloproteinasa es dependiente de Zn^{2+} . Los genes que codifican para GP63 en *Leishmania* son variables (7 a 18) se agrupan en repeticiones en tándem, generalmente ubicadas en un solo cromosoma, y se pueden dividir en clases según su patrón de expresión durante el desarrollo del parásito. Esta GP63 desempeña diferentes roles en las interacciones huésped-parásito y se ha propuesto como un factor de virulencia, el papel principal de la actividad proteolítica de GP63 está relacionado con la escisión de las macromoléculas de la célula del huésped, para la protección, o para proporcionar nutrición de los parásitos o para invadir las células del huésped. Otro papel para la GP63 es la unión del promastigote a los receptores de la superficie de la célula huésped, como el receptor de fibronectina, además, interactúa con el sistema del complemento (Oliver y cols., 2012).

La metaloproteinasa GP63 de *Trypanosoma cruzi* se encuentra en la membrana del parásito, predominantemente en promastigote y en amastigote en *Leishmania*, tiene una masa molecular teórica de 54 kDa, la firma presente en el sitio catalítico es HEXXH característico de metaloproteinasas dependientes de Zn^{2+} . Para ver la actividad de la metaloproteinasas GP63 de los parásitos *T. cruzi* y *Leishmania* se analizó la actividad en geles de acrilamida con sustrato de gelatina al 0.2% a pH de 8, utilizaron extractos de epimastigotes de *T. cruzi* y promastigotes de *L. mexicana mexicana* (fig. 12) se muestra una mejor actividad en *L. mexicana* debido a que se sabe que constituye el 1% de la proteína membranal, la actividad fue inhibida con 1-10 fenantrolina, lo que indica que esta actividad corresponde a una metaloproteinasa (Cuevas y cols. 2003).

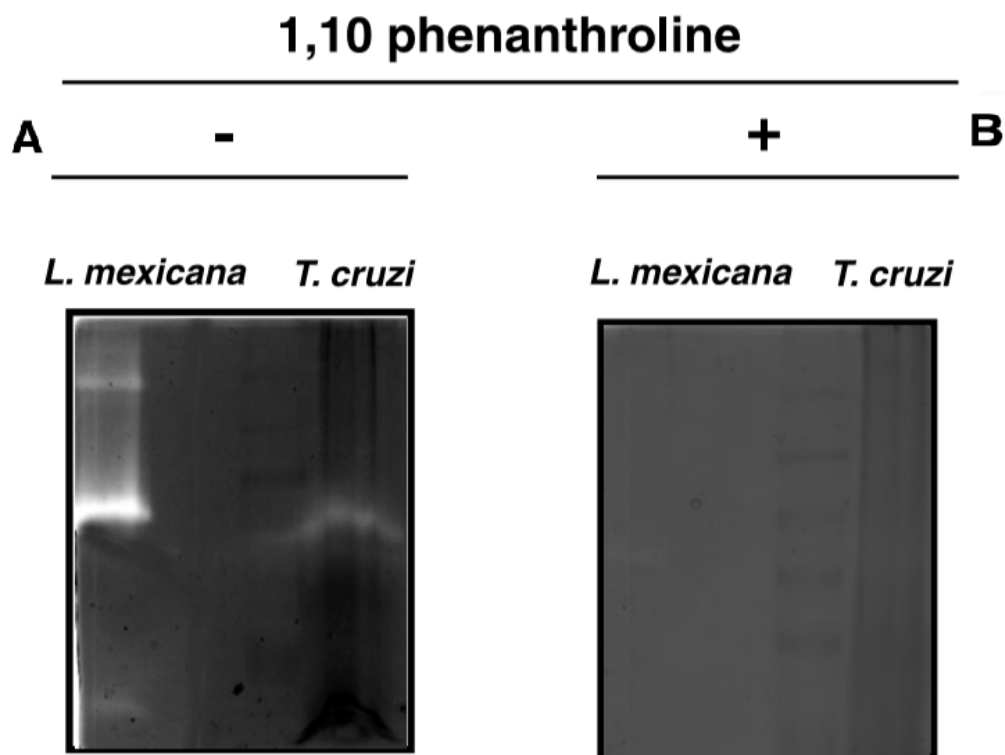


Fig.12 Zimograma de la actividad de la metaloproteinasa GP63 de *L. mexicana* y *T. cruzi*. El gel de acrilamida con sustrato de gelatina se incubo a 37°C por 72h, la actividad proteolítica se ve como una banda blanca en el panel A, que desaparece con el inhibidor específico 1-10 Fenantrolina panel B.

En el parásito *Trypanosoma brucei* también se ha determinado la actividad de las metaloproteinasas en geles de poliacrilamida con gelatina al 0.2%, usando los quelantes EDTA, EGTA y 1-10 fenantrolina, la actividad proteolítica se observa en la región de 40kDa siendo la única actividad visible, la visualización de la actividad se obtuvo bajo diferentes condiciones de pH ácido de 5, alcalino de 9 y neutro de pH 7 en donde el único pH en donde se presentó actividad proteolítica fue en pH 7 (figura 13). También se probaron diferentes temperaturas a 18°C, 37°C y 50°C, en donde la estabilidad de la actividad solo se vio a la temperatura de 37°C (Fig. 14) (Pires K y cols. 2010).

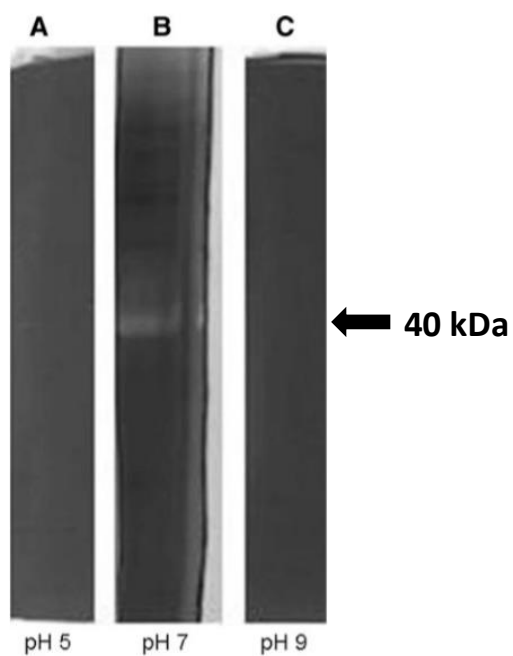


Fig.13 Zimograma de la actividad de las metaloproteinasas de *T. brucei brucei*. Zimograma con gelatina al 0.2% en diferentes condiciones de pH. carril A) pH 5; carril B) pH 7; carril C) pH9.

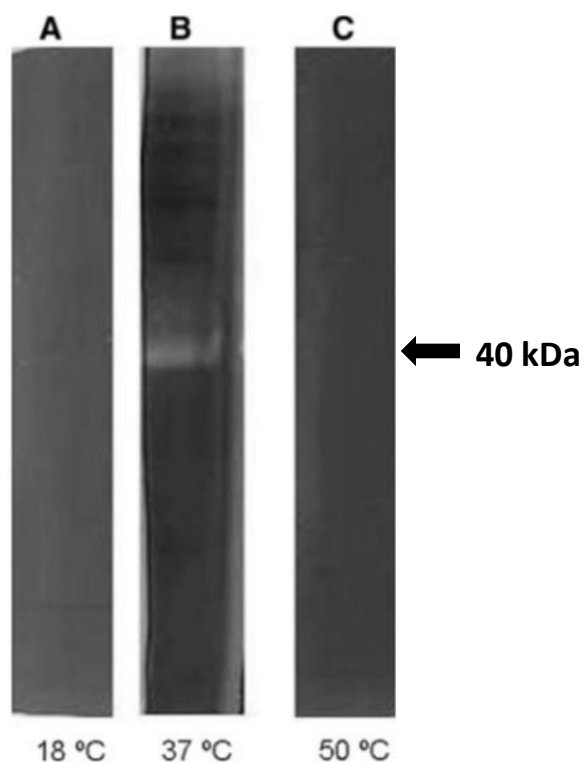


Fig14. Zimograma de la actividad de las metaloproteinasas de *T. brucei brucei*.
Zimograma con gelatina al 0.2% en diferentes condiciones de temperatura. Carril A) 18°C; carril B) 37°C; carril C) 50°C.

Al utilizar inhibidores como PMSF (10mM), Tetraciclina (50mM), EDTA (100mM), EGTA (150mM), doxiciclina (1μM) y 1-10 fenantrolina (2mM) se inhibe la actividad en la región de 40 KDa como se muestra en figura 15 (Pires K y cols. 2010)

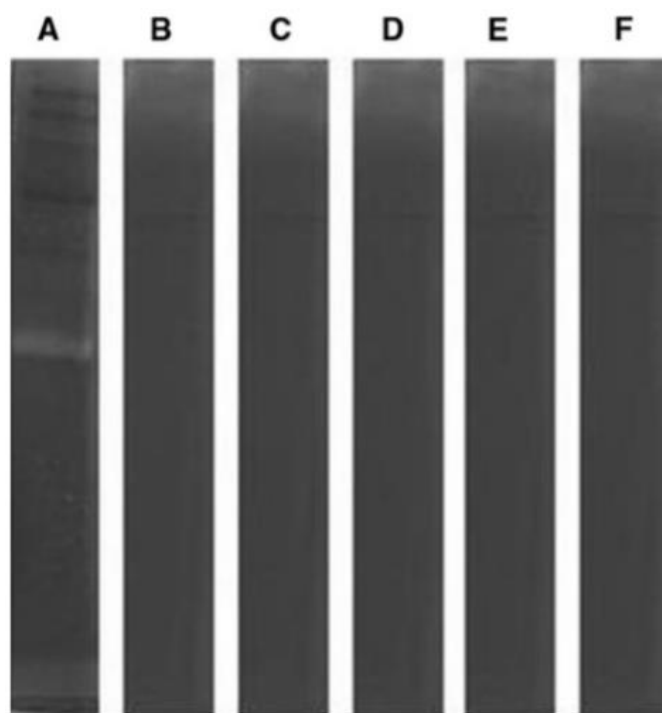


Fig.15 Zimograma de inhibición de las metaloproteinasas de las formas de *Trypanosoma brucei brucei*, incubadas con un PMSF 10 mM; b EDTA 100 mM; c EGTA 150 mM; d tetraciclina 50 mM; e 1 IM doxiciclina; y f 2 mM de fenantrolina

Por otro lado también se han hecho experimentos para ver la actividad proteolítica de las proteasas de diferentes tricomonas como *Pentatrichomonas hominis*, *Tritrichomonas batrachorum*, *T. vaginalis*, y *T. foetus*, en donde a partir de un gel de acrilamida polimerizado con gelatina al 2%, se obtuvo la diferencia de actividad en el patrón de bandeo para las cuatro diferentes especies como se muestra en la figura 16. En *P. hominis* la actividad de las proteasas se observa en la región de 32 a 60 kDa, en *T. batrachorum* se observa en la región de 32 a los 84 kDa, en *T. foetus* la actividad es desde <20 a 120 kDa y finalmente en *T. vaginalis* es de <20 a 110 kDa, también se apreció a partir de la primera hora la actividad de las proteasas de *T. foetus* y *T. vaginalis* que de los parásitos intestinales *P. hominis* y *T. batrachorum* (Lockwood B y cols. 1987).

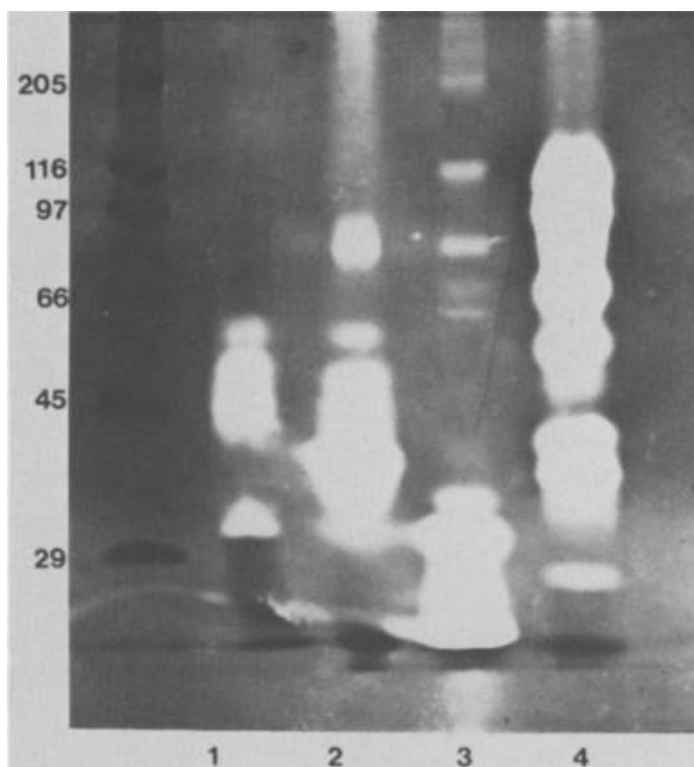


Fig. 16 Actividad de proteinasas de diferentes especies de tricomonas. El gel se incubó a pH 5 durante 24h. Carril 1 *P. hominis*; carril 2 *T. batrachorum*; carril 3 *T. foetus* y carril 4 *T. vaginalis* (Lockwood B y cols. 1987).

El parásito *T. vaginalis* tiene 122 metaloproteinasas distribuidas en 13 familias, (Bozner y cols. 2014). La GP63 de *T. vaginalis* está en la membrana, la cual podría sugerirse que podría estar participando en la citotoxicidad a las células del hospedero, su actividad se evaluó con los inhibidores 1-10 fenantrolina y con EDTA siendo la 1-10 fenantrolina más eficiente, lo que sugiere que las metaloproteinasas pueden ser diferencialmente inhibidas por los diferentes quelantes (Ma y cols. 2011).

Otra metaloproteinasa que se ha caracterizado es de ~47 kDa la cual se encuentra en el hidrogenosoma, la subunidad β contiene el motivo del sitio de unión al Zn HxxExxE y es inhibida con el quelante EDTA (Brown y cols. 2007).

La Metaloproteinasa de 50kDa (TvMP50) se caracterizó y se determinó que es un factor de virulencia debido a que ocasiona daño citotóxico a las células DU145. La TvMP50 pertenece a la subfamilia M24B, se localiza en el citoplasma y además puede ser secreta. Por medio de zimogramas se determinó que la actividad proteolítica de esta metaloproteinasa, la actividad se observó en la región de 50kDa, así como también en las regiones de 30,39 y 65 kDa (Puente y cols., 2017).

Para determinar la actividad de la metaloproteinasa se utilizaron inhibidores de metaloproteinasas como el EDTA, EGTA Y 1-10 Fenantrolina (5mM); si se vio una reducción en la región de los 50 kDa y 71 kDa, lo que demuestra que la actividad en esta región es por MP (fig.17). Por lo que se concluyó que esta MP es activa tanto en el parásito como en secreciones y también es citotóxica en las monocapas de células DU145 (Puente y cols., 2017).

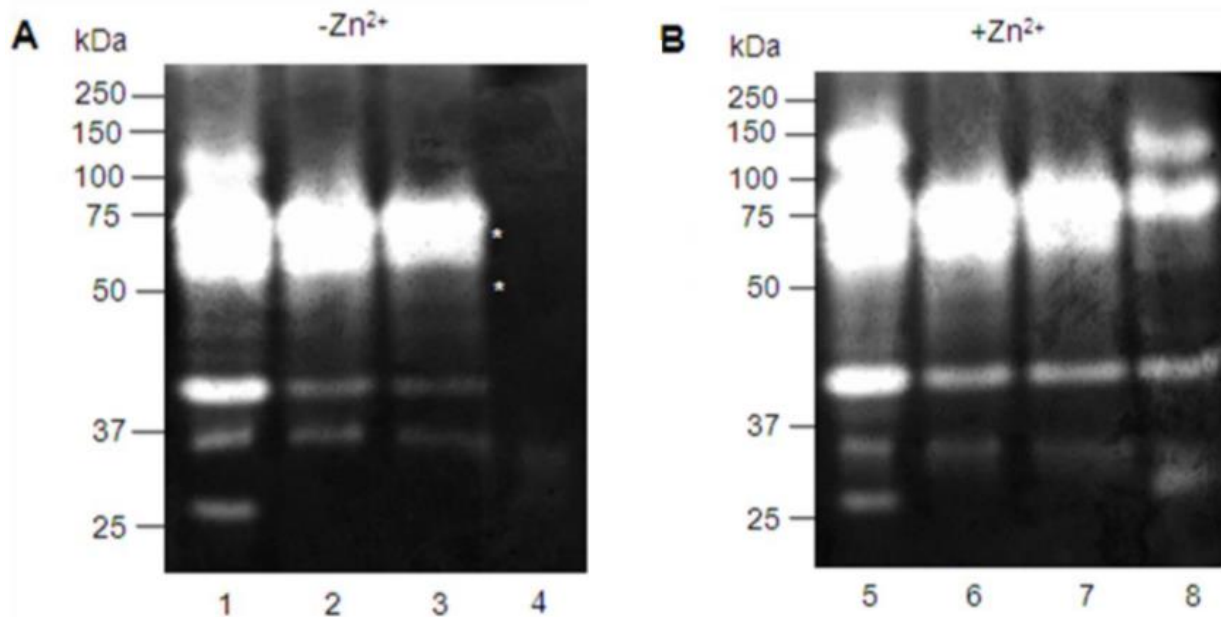


Fig.17 Zimograma de proteinasas de *T. vaginalis* tratadas con inhibidores. En el panel a) zimograma de parásitos cultivados sin Zn^{2+} carril 1 sin inhibidor carril 2 con EDTA; carril 3 con EGTA y carril 4 con 1-10 fenantrolina. Panel b) zimograma de parásitos cultivados con Zn^{2+} ; carril 5 sin inhibidor; carril 6 EDTA; carril 7 EGTA y 8 1-10 fenantrolina (Puente y cols., 2017)

En *T. foetus* se realizó un proyecto de transcriptoma comparativo por Morin V y cols. 2014, a partir de un asilado de *T. foetus* bovino (BP-4) y felino (Sydney G-10), ambos fenotipos se cultivaron en medio TYM a 37°C a pH 7.2 y se extrajo el RNA a partir de 1×10^7 parásitos. En este estudio se determinaron las proteasas, las cuales se pueden clasificar en cuatro categorías funcionales basadas en el residuo principal que ocupa el sitio activo como aspártico, cisteína, glutámico, serina, treonina y metalo. Las proteasas totales del aislado felino fueron de 463 proteasas de las cuales 249 son cisteinproteinasas, 95 son serinproteinasas, 88 metaloproteinasas, 22 treoninproteinasas 9 asparticoproteinasas, por otro lado para el aislado de bovino se obtuvieron un total de 503 proteasas de las cuales 285 son cisteinproteinasas, 99 serinproteinasas, 88 metaloproteinasas, 22 treoninproteinasas y 9 asparticoproteinasas. El grupo más grande de proteasas encontradas son las CP para

ambos aislados ocupando un 65.08% en aislado bovino y 40.47% del aislado felino, sin embargo se encontró que la CP8 es la más transcrita en el aislado bovino y CP7 en el aislado felino, esto es debido a que los nichos en los hospederos son diferentes. Con respecto a las proteasas que tienen el mismo número como es el caso de las metaloproteinasas, treoninproteinasas y asparticoproteinasas sugiere que los genotipos poseen un funcionamiento basal similar.

En un estudio de Proteómica comparativa en donde se utilizaron los mismos aislados de genotipos de *T. foetus* (bovino BP-4 y felino Sydney G-10) se utilizaron 1×10^6 parásitos para la extracción de proteínas las cuales se resolvieron por un gel 2D en donde se observó que la mayoría de las proteínas estaban en un rango de 17 a 100 kDa en un punto isoeléctrico de 4.3 a 7.8, En el gel se pudieron resolver 370 proteínas para el aislado bovino (Fig. 18) y 380 para el aislado felino El proteoma de ambos aislados finalmente se identificaron por espectrometría de masas. En la identificación de las proteínas se obtuvieron proteínas de metabolismo como la fructosa 1-6 bifosfato, gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa, enolasa, malato deshidrogenasa y el factor de virulencia CP8, cabe mencionar que también se identificaron 2 metaloproteinasas una aminopeptidasa y una dipeptidilpeptidasa III.

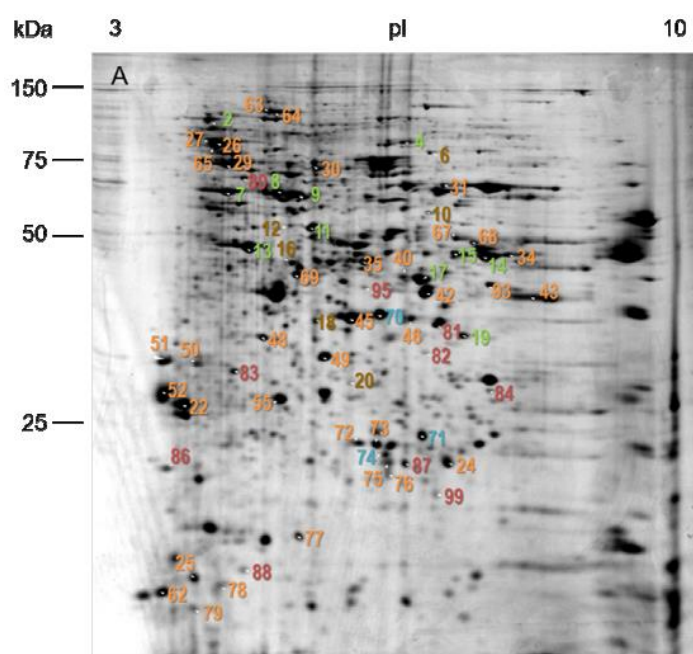


Fig. 18 Gel 2D del aislado bovino. En naranja se muestran las 50 manchas proteicas más abundantes del genotipo bovino, los números rojos representan más de cuatro puntos de proteína diferencialmente abundantes; los números marrones representan las manchas de proteínas con una relación 1: 1 con el aislado felino.

Por medio de zimogramas también se determinó la actividad enzimática de *T. foetus* en donde se muestra que las proteasas del aislado bovino se encuentran en un rango de 10-25 kDa y con un PI de 3-4.5, mientras que las del aislado felino se encontraron en un rango de 15-37 kDa, y dentro de un rango más amplio de pi de 3.5-5. Aproximadamente el 75% de las proteínas más abundantes fueron comunes en ambos genotipos, así como, el pi y el peso molecular son comparables, lo que sugiere hay pocos cambios genómicos (Stround y cols. 2016).

HIPÓTESIS

Tritrichomonas foetus posee una metaloproteinasa que interacciona con las células blanco MDBK.

JUSTIFICACIÓN

T. foetus produce la tricomoniasis bovina que afecta al ganado bovino produciendo infertilidad y abortos lo cual ocasiona grandes pérdidas económicas en muchos países del mundo. Por tal motivo es importante llevar a cabo el estudio de moléculas de este parásito que pudieran estar involucradas en la virulencia de este parásito a la célula blanco para en un futuro proponerlas como marcadores para el diagnóstico de la tricomoniasis bovina. A través de estudios de transcriptómica, se conoce que las metaloproteinasas son moléculas que ocupan el tercer lugar dentro de las proteasas expresadas en *T. foetus*, sin embargo hasta el momento no existe ningún reporte de metaloproteinasas de *T. foetus* que interaccionen con las células blanco que pudieran estar participando en propiedades de virulencia. Por lo que este trabajo aportará conocimientos básicos en la biología del parásito y se podrán proponer moléculas blanco para el tratamiento de la tricomoniasis bovina.

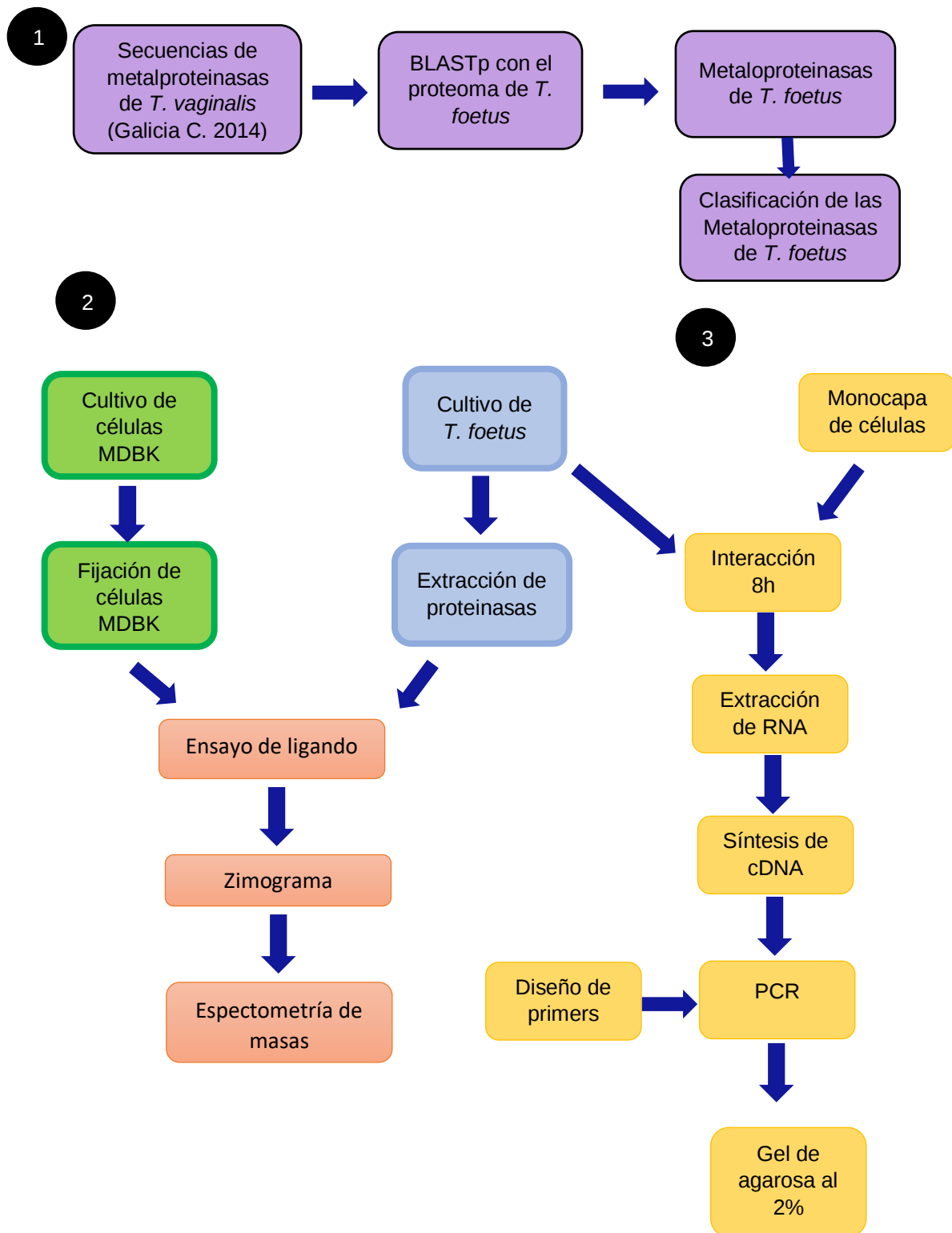
OBJETIVO GENERAL.

Identificación de una metaloproteinasa de *Tritrichomonas foetus* involucrada en la interacción con las células blanco (MDBK).

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Obtener *in silico* las secuencias de las metaloproteinasas de *Tritrichomonas foetus*.
- Identificar las metaloproteinasas de *Tritrichomonas foetus* en interacción con células blanco MDBK y HeLa.
- Determinar la expresión de una de las metaloproteinasas que interacciona con las células MDBK y HeLa.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL



MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis *in silico*.

Las secuencias de las metaloproteinasas de *T. vaginalis* reportadas en la tesis de Carlos Alberto García Silva 2014 fueron utilizadas para hacer un BLASTp en la base de datos NCBI con respecto al proteoma de *T. foetus* y obtener los accesos de las metaloproteinasas de este parásito. Los números de acceso de las metaloproteinasas encontradas fueron utilizadas para analizar en la base de datos UniProt y se obtuvieron las características de cada una de las metaloproteinasas de *T. foetus* tales como familia, longitud de proteína, peso molecular; además se confirmó el dominio catalítico en la base de datos Pfam y se hizo un alineamiento de las metaloproteinasas por familia para obtener los aminoácidos conservados del dominio catalítico. Esta información se organizó y clasificó para ser utilizada posteriormente (Tabla suplementaria S1).

Cultivo de *T. foetus*.

Los parásitos se cultivaron en medio TYM (Trypticaseína y extracto de levadura-maltosa) por 24h y con 10% de suero de caballo (SC) a 37°C y se obtuvieron los parásitos en fase logarítmica.

Cultivo de *T. vaginalis* (CNCD 147)

Los parásitos se cultivaron en medio TYM (Trypticaseína y extracto de levadura-maltosa) por 24h y con 10% de SC a 37°C y se obtuvieron los parásitos en fase logarítmica.

Cultivo de Células MDBK.

Las células MDBK (epiteliales de riñón de bovino) se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor a 56°C por 30min, penicilina al 1% y también 1% de estreptomicina, a 37°C y 5% de CO₂ durante 48 h para obtener una monocapa del 80%.

Cultivo de células HeLa

Las células HeLa (carcinoma de cérvix de humano) se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor a 56°C por 30min, 250µl de penicilina y 500µl de estreptomicina, a 37°C y 5% de CO₂ durante 48 h para obtener una monocapa del 80%.

Fijación de células MDBK y HeLa

Las células MDBK provenientes de un cultivo de 48 h, se despegaron con 5mL de PBS-EDTA al 0.2% a 37°C y se lavaron tres veces con PBS pH 7, se cuantificaron por medio de una cámara de Neubauer y se transfirieron a un matraz siliconizado agregando glutaraldehído a una concentración 2.5% más PBS pH7. Se agitó suavemente 1h/4°C; transcurrido el tiempo se lavaron 5 veces con PBS pH7. Posteriormente se dejaron bloqueando con glicina al 0.2M en PBS pH7 1h/ TA Se lavaron 5 veces con PBS pH7 y 3 veces con TDSET y finalmente se hicieron alícuotas de 200 µL con 1×10^6 de células en tubos eppendorf siliconizados. De la misma forma se fijaron las células HeLa.

Extracción de proteasas

Aproximadamente 20×10^6 de parásitos se lavaron con PBS pH 7 y se centrifugaron a 1800 rpm/5min/4°C, el sobrenadante se decantó y a la pastilla se le adicionaron 500µl de PBS pH 8 y 50µl de DOC (Deoxicolato de Sodio), dejándolo incubar a 4°C /20 min. Posteriormente se pusieron 450µl de PBS pH 8 y 100µl de colchón de sacarosa y se centrifugó a 14000 rpm/30min/ 4°C. Los lisados se verificaron en un gel de policrilamida con sustrato de gelatina al 9%, posteriormente el gel se dejó con Tritón X-100 al 2.5% por 30 min y se incubaron con buffer de activación a pH7, pH8 y pH9 a 37°C y 4°C durante 18h. Por último se tiñó con azul de Coomassie por 4h. Se observaron las bandas claras de acuerdo a la actividad proteolítica en el gel de acrilamida teñido con Coomassie.

Ensayo de ligando proteasas.

Los parásitos en fase logarítmica (20×10^6) se lavaron 3 veces con PBS pH 7 y se resuspendieron en 500 μ L de PBS pH8, se adicionó DOC al 10% y se incubaron a 4°C/20min. Se agregaron 450 μ L de PBS pH8 y se homogenizó bien la mezcla. El lisado se colocó en un colchón de sacarosa al 10% con PBS pH8 con rojo de fenol (100 μ L en el fondo del tubo). Se centrifugó a 14000rpm/30min/4°C; el sobrenadante se recuperó y se puso a interaccionar con 1×10^6 de células MDBK fijadas durante 18h/4°C con agitación suave.

La pastilla de células MDBK se lavó 5 veces con PBS-DOC pH7 al 1% y se pusieron 20 μ L de buffer 2x, se calentó la muestra a 37°C durante 20min y se corrió en un gel de policrilamida copolimerizado con gelatina como sustrato al 2%. Después de la electroforesis los geles se dejaron con Tritón X-100 al 2.5% por 30 min y se incubaron con buffer de activación a pH7, pH8 y pH9 a 37°C durante 18h. Por último se tiñó con azul de coomassie por 4h.

Inhibidores

Para determinar que la actividad observada en los geles era por metaloproteinasas se utilizaron los agentes quelantes EDTA, EGTA y 1-10 Fenantrolina a una concentración de 50mM. Estos inhibidores se agregaron al extracto de proteasas previamente obtenidas junto con la muestra en la electroforesis.

Extracción de RNA.

La extracción de RNA se realizó a partir de parásitos recolectados del ensayo de 8h de interacción con las células MDBK y HeLa. Se utilizó el medio de interacción DEMEM-TYM en una relación 1:2 en un pH de 6.8. Los parásitos se lavaron 3 veces con PBS pH 7 y se centrifugaron a 1800 rpm, 5min, 4°C, posteriormente se adicionó 1mL de Trizol por cada 20×10^6 de parásitos. Los parásitos se lisaron y se incubaron 30min/4°C, se adicionaron 200 μ L de cloroformo, se mezcló por inversión durante 15

segundos y se centrifugaron a 10000 rpm/15min/4°C. La fase acuosa se recuperó y se adicionaron 500µL de isopropanol al 100% y se dejó durante 2h a -20°C, posteriormente se centrifugó a 10000rpm/15min/4°C, se decantó el sobrenadante y la pastilla se lavó 2 veces con 600µL de etanol al 100% centrifugando a 10000rpm/5min/4°C, se secó la pastilla a TA y finalmente se calentó agua DEPC a 65°C y se adicionaron 35 µL. La integridad del RNA se verificó en un gel de agarosa al 1% y se cuantificó en un NANODROP.

Síntesis de cDNA.

Para realizar la síntesis del cDNA se tomaron 3µg de RNA y se le dio tratamiento con 1µL de DNAsa durante 1h / 37°C, se agregó 1µL de la solución de paro y se incubó a 65°C /10minutos. Se confirmó la integridad del RNA en un gel de agarosa para posteriormente adicionar 1µL de oligo dT y agua DEPC hasta tener un volumen de 13µL, se incubó a 65°C 10min y se colocó 5 min en hielo, posteriormente se adicionaron 2µL de dNTPs, 4µL de amortiguador 5x y 0.5µL de retrotranscriptasa reversa, se incubó a 55°C por 30min y se inactivó a 85°C por 5min.

Diseño de oligonucleótidos

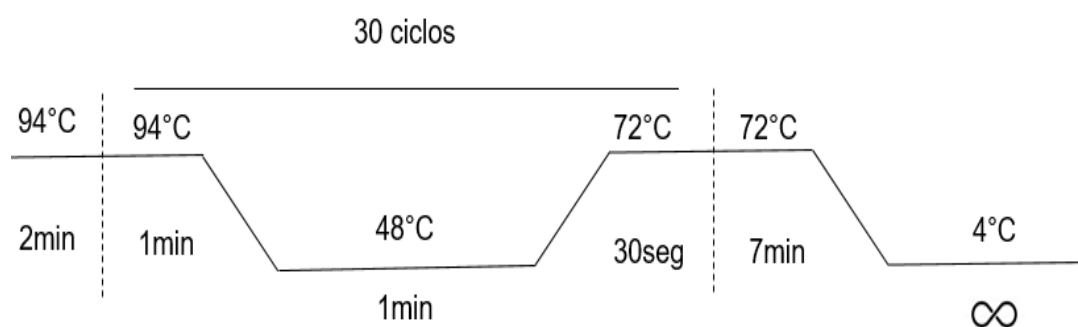
Se utilizó el gen TRFO_34863 de *T. foetus* que codifica para la metaloproteinasa A0A1J4JKM2 para hacer oligonucleótidos específicos. Se utilizó el servidor Oligo Calc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) para determinar la TM y verificar que la secuencia de los oligonucleótidos no fuera complementaria y también se utilizó la página https://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html para verificar el oligonucleótido reverso complementario.

RT-PCR

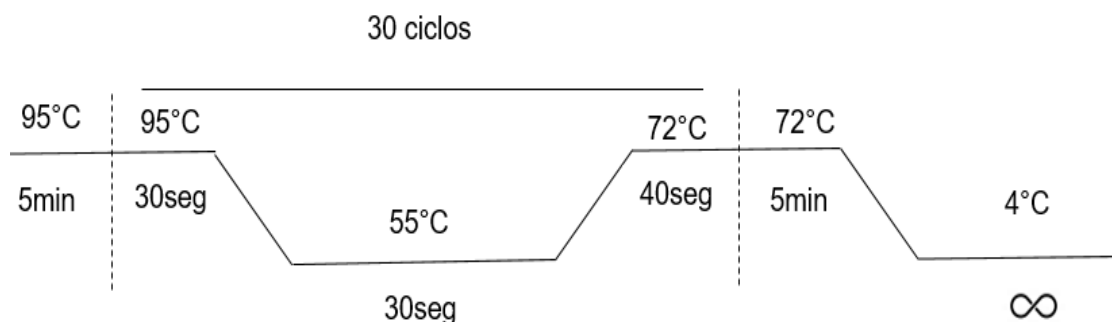
El perfil de la expresión mediante RT-PCR se obtuvo utilizando oligonucleótidos de β-tubulina (Fw 5'-CATTGATAACGAAGCTCCTTTACGAT-3') (Rv 5'GCATGTTGTGCCGGACATAACCAT-3') y se diseñaron oligonucleótidos

específicos para la proteína de *T. foetus* (FW 5'- CAATTGTGCCAAATAATCCAAACC-3') (Rv 5'- TCATATGGTTTGAATTA ACTCAATA-3'). Para la reacción se utilizó 0.5 de primers, 2µL de cDNA, 6µL de master mix con Taq polimerasa Kappa. Las condiciones de amplificación para cada uno de los genes fueron los siguientes:

B-tubulina



mp69



Cada uno de los productos de PCR se resolvió en geles de agarosa al 1% y 2% y se hizo un análisis densitométrico utilizando el programa de Image Lab (Bio-Rad).

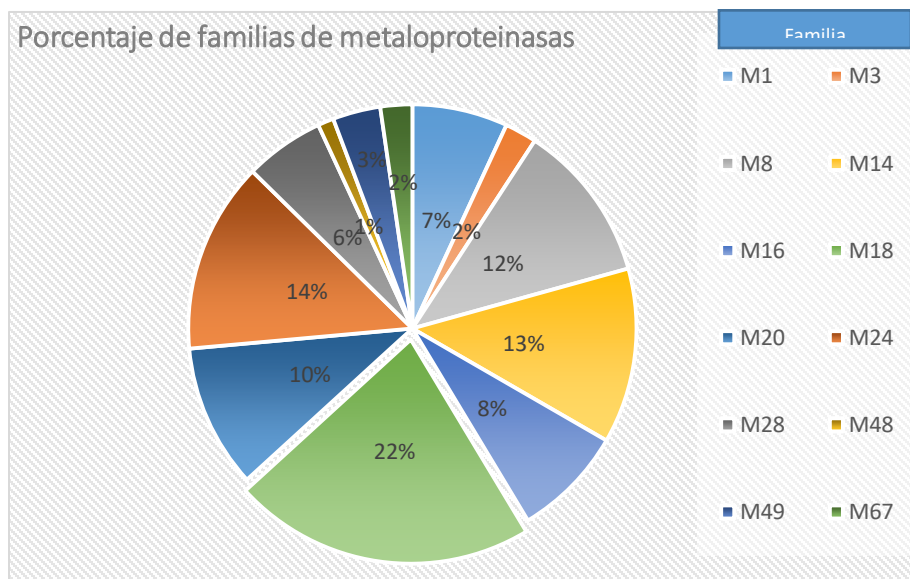
RESULTADOS

Para conocer las secuencias de las metaloproteinasas de *T. foetus*, así como su peso molecular, localización, familia a la que pertenece, etc, las secuencias homologas se obtuvieron a partir de un BLASTp de las metaloproteinasas de *T. vaginalis* en la base de datos NCBI con el proteoma de *T. foetus*; cuando se tuvieron los números de identificación de las proteínas, se buscaron las características en la base de datos UNIPROT, y el dominio catalítico se confirmó en la base de datos Pfam.

Las 88 metaloproteinasas distribuidas en 12 familias obteniendo 6 proteínas en la familia M1, 2 proteínas en la familia M3, 11 proteínas en la familia M8, 11 proteínas en la familia M14, 7 proteínas en la familia M16, 19 proteínas en la familia M18, 9 proteínas en la familia M20, 12 proteínas en la familia M24, 5 proteínas en la familia M28, 1 proteína en la familia M48, 3 proteínas en la familia M49 y 1 proteína en la familia M67 (Fig. 19a). Se observa que el mayor porcentaje es del 22% que corresponde a proteínas dentro de la familia M18, seguida de la familia M24 con el 14% y finalmente las familias M8 y M14 con el 12.5% que ambas familias tienen 11 metaloproteinasas. Las familias que presentan el menor porcentaje son la M48 con el 1%, las M3 y M67 representan el 2% cada una y M49 el 3%.

Una vez que se obtuvieron las secuencias de las metaloproteinasas se hizo una gráfica con los pesos moleculares para considerar la abundancia de actividad esperada en los zimogramas realizados posteriormente (Fig. 19b). En la región de 40 a 50 kDa es donde hay más metaloproteinasas (28) con un 32%, sin embargo en la región de 60 a 70 kDa representa el 18% con 16, seguida de la región de 70 a 80 kDa donde hay 13 y representa el 15%. En las regiones donde menos metaloproteinasas es en 30-40 kDa y 130 kDa en donde solo hay 1 y representa el 1% y también en la región de 90-100 kDa donde solo representa el 2% con 2 metaloproteinasas.

a)



b)

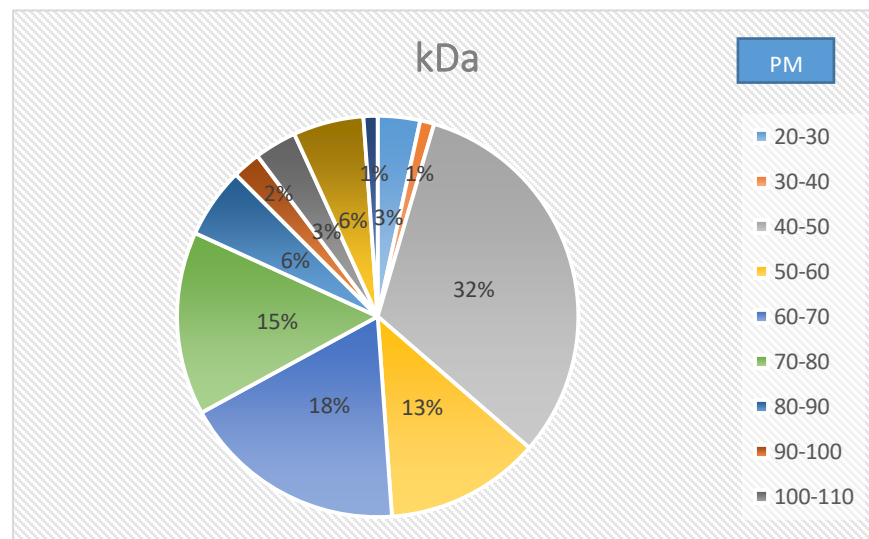


Figura 19. Clasificación por familias de 88 metaloproteinasas de *T. foetus*. En la gráfica se muestran las 12 familias de metaloproteinasas representadas por porcentajes de acuerdo al número total de metaloproteinasas por cada familia. B) Se muestra la distribución de las metaloproteinasas por cada 10 kDa.

El análisis comparativo entre las metaloproteinasas de *T. vaginalis* y *T. foetus*, se mostró que *T. foetus* no tiene dos familias de metaloproteinasas que si están presentes en *T. vaginalis*, estas familias son M22 y la M41. Otra diferencia entre las metaloproteinasas de estos parásitos protozoarios es que la familia con mayor número de metaloproteinasas en *T. foetus* es la M18 como ya se había mencionado anteriormente con un total de 19 metaloproteinasas, mientras que para *T. vaginalis* la familia que más metaloproteinasas tiene es la M8 con 55 metaloproteinasas. Solo coinciden con 11 metaloproteinasas en la familia M14 (Tabla II).

Tabla II. Familias de metaloproteinasas presentes en *T. vaginalis* y *T. foetus*.

a)	<i>T. vaginalis</i>	14 Fam	%
	M1	3	2%
	M3	1	1%
	M8	55	45%
	M14	11	9%
	M16	8	6%
	M18	6	5%
	M20	10	8%
	M22	1	1%
	M24	13	11%
	M28	1	1%
	M41	1	1%
	M48	3	2%
	M49	2	2%
	M67	7	6%
	Total	122	100%

b)	<i>T. foetus</i>	12 Fam	%
	M1	6	6.80%
	M3	2	2.20%
	M8	11	12.50%
	M14	11	12.50%
	M16	7	7.90%
	M18	19	21.50%
	M20	9	10.20%
	M22	X	X
	M24	12	13.60%
	M28	5	5.60%
	M41	X	X
	M48	1	1.10%
	M49	3	3.40%
	M67	2	2.20%
	Total	88	100

a) Metaloproteinasas de *T. vaginalis*, son un total de 122 que se distribuyen en 14 familias la más abundante es la M8 con el 45%, seguida de la M24 con el 11%. b) Metaloproteinasas de *T. foetus* tiene 12 familias y 88 metaloproteinasas en total.

En la tabla III se muestran las características principales de las 12 familias de metaloproteinasas que tiene el parásito *T. foetus*, en los cuales las firmas del sitio activo mantienen al menos una histidina y un ácido glutámico conservados los cuales

son importantes para la interacción con el metal. En su mayoría se inhiben con quelantes como EDTA y 1-10 Fenantrolina.

Tabla III. Características de las familias de metaloproteinasas de *T. foetus*.

Familia	Actividad	Sitio activo	Inhibidor
M1	Aminopeptidasas	HEXXH	EDTA, 1-10 Fenantrolina, bestain, amastain.
M3	Endopeptidasas	HEXXGH	No se conoce
M8	Endopeptidasas	HEXXH	1-10 fenantrolina
M14	Carboxipeptidasas	HXXG	Ácido 2-bencil-3,4-iminobutanoico, ácido guanidinoetilmercaptosuccínico
M16	Endopeptidasas	HXXGH	Quelantes
M18	Aminopeptidasas	HXDEE	No se conoce
M20	Exopeptidasas	HDDEEEDH	EDTA, 1-10 Fenantrolina
M24	Aminopeptidasas	HDDHEE	Fumagilina
M28	Exopeptidasas	HDDEH	EDTA, 1-10 Fenantrolina
M48	Endopeptidasas	HEXXH	1-10 Fenantrolina
M49	Dipeptidilpeptidasas	HEXXH	EDTA, EGTA, 1-10 Fenantrolina
M67	Peptidasas	HXHD	No se conoce

Ensayos de ligando-proteasas.

Se extrajeron las proteasas totales a partir de 20×10^6 de parásitos. La actividad de las proteinasas totales de *T. foetus* se analizó en geles de poliacrilamida al 10% polimerizado con gelatina al 9% los cuales se activaron a diferente pH (7, 8 y 9) y temperaturas (4°C y 37°C) figuras 20 y 21.

La actividad de las proteinasas totales se observó en la región desde los 30 kDa hasta los 150 kDa, en donde se encuentran bandas claras de actividad en la región de ~30, ~37, ~69, ~75 y ~150 kDa. Se puede observar una menor actividad de las proteinasas a 4°C con respecto a la actividad de 37°C.

Para determinar la actividad de las proteinasas totales de *T. foetus*, se analizaron a diferentes pH (7,8 y 9), estos pHs se eligieron con base a la literatura reportada para la activación de las metaloproteinasas, nuestros resultados mostraron que la actividad proteolítica de las proteinasas totales de *T. foetus* era mayor a pH 8.0, sin embargo en los tres pHs analizados se encontró actividad proteolítica. Con base a estos resultados se decidió llevar a cabo los experimentos de interacción de las proteinasas de *T. foetus* con las células blanco a 37°C y una activación a pH 8.0.

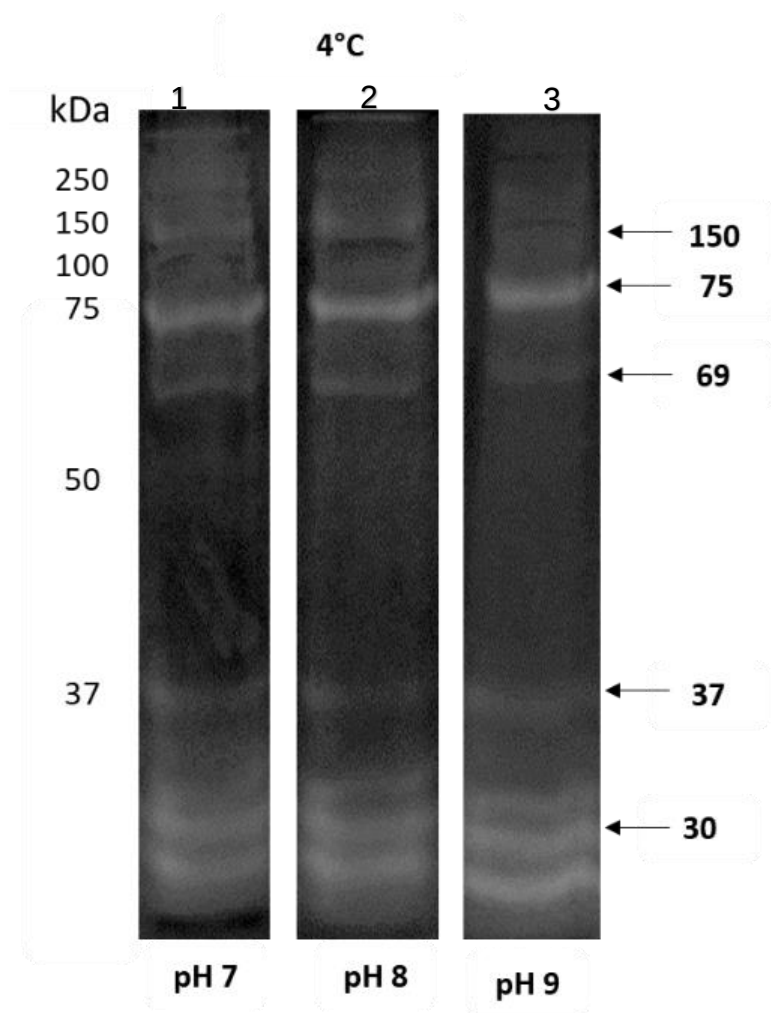


Fig 20. Actividad de proteinasas totales de *T. foetus* a 4°C. Zimograma usando como sustrato gelatina al 2%. La actividad proteolítica se sometió a diferentes condiciones en el carril 1 pH 7; carril 2 pH 8; carril pH 9. El patrón de bandeo de actividad se conserva en los diferentes pHs en las regiones de 150, 75, 69, 37 y 30 kDa.

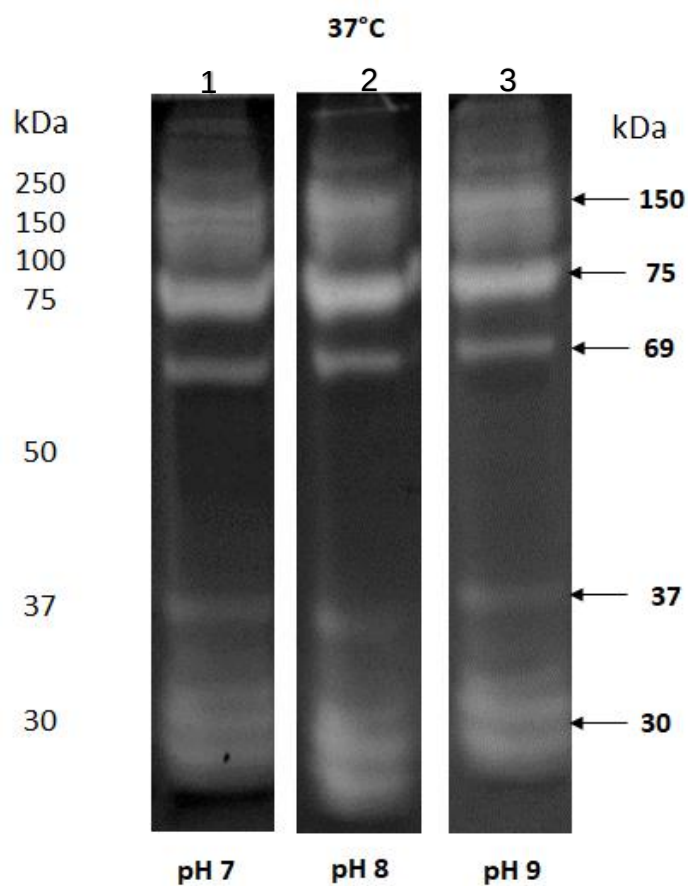


Fig 21. Actividad de proteinasas totales de *T. foetus* a 37°C. Zimograma usando como sustrato gelatina al 2%. La actividad proteolítica se puso a diferentes condiciones carril 1 a pH 7; carril 2 a pH 8; carril 3 a pH 9. El patrón de bandeo se conserva en los diferentes pHs en las regiones de 150, 75, 69, 37 y 30 kDa.

Para llevar a cabo los ensayos de interacción se obtuvieron las proteinasas totales de *T. foetus* se pusieron en interacción durante 18 horas con 1×10^6 de células MDBK y células HeLa (control) las cuales se observa en la figura 22a y 22b respectivamente.

Con respecto a la interacción con las células MDBK se puede observar la actividad en la región de 150, 75, 69, 37 y 30 kDa en los diferentes pH. En el ensayo de interacción usando como blanco las células HeLa también se presentaron estas actividades al igual que durante la interacción con las células MDBK. De manera interesante durante la interacción de las proteinasas del parásito con las células HeLa se encontró actividad proteolítica en las mismas regiones de 150, 75, 69 y 37 kDa con una intensidad incluso mayor que con las células MDBK.

Bajo las tres condiciones de pH hay una actividad de proteasas como en los zimogramas de proteasas totales sin interacción, sin embargo se ve una mejor actividad a pH de 9 en la región de 30kDa, pero en general las condiciones en donde se pueden percibir mejor las bandas de actividad de las proteasas son a 37°C y a pH 8 por lo que en los experimentos posteriores solo se utilizaron esas condiciones.

Para confirmar que la actividad que se observa es por metaloproteinasas se pusieron los inhibidores EDTA, EGTA y 1-10 Fenantrolina a una concentración de 50mM y se hizo un zimograma con las proteasas totales, cabe mencionar que se muestra con el fondo invertido para tener una mejor definición de las bandas de actividad.

En la figura 23a se pudo observar un gel de acrilamida con sustrato de gelatina al 9%, en donde hay una disminución de la actividad de hasta el 99% con los inhibidores EDTA y EGTA y de un 30 al 50% de inhibición con el inhibidor 1-10 Fenantrolina, con respecto al control que son las proteasas totales sin inhibidor. Se hizo un análisis densitométrico en las regiones de 150, 75, 69 y 30 kDa (fig. 23b-e).

Con respecto a los análisis densitométricos se hicieron gráficas para representar los porcentajes de intensidad disminuidos en donde los inhibidores EDTA y EGTA inhiben un 99% la actividad de las metaloproteinasas en la región de 150, 75, 69 y 30kDa,

mientras que el inhibidor 1-10 fenantrolina inhibe en la región de 150 kDa un 56%, en la región de 70 kDa solo se inhibe un 25% al igual que en la región de 69 y 38% en la región de 30 kDa con respecto al control.

Después llevar a cabo la inhibición de las proteinasas totales se hicieron zimogramas a partir de la interacción de las proteinasas totales con las células MDBK y HeLa en dónde también se inhibieron las proteasas desde un 70 a un 99% con respecto al control con los inhibidores EDTA y EGTA mientras que con el 1-10 fenantrolina inhibió desde un 20 al 99% con respecto al control (figuras 24-25).

En la figura 24a se muestra el zimograma de interacción con las células MDBK con los inhibidores, y se hicieron las gráficas (fig. 24 b-e) de las densitometrías para conocer el porcentaje de inhibición. En la fig. 24b se muestra la región de 150kDa en donde se inhibieron desde un 83 a un 95% con los tres inhibidores. En la fig. 24c se muestra la región de 75 kDa en donde se inhibió un 99% con EDTA y EGTA sin embargo con 1-10 fenantrolina solo se inhibió un 20%. En la fig. 24d se muestra la región de 69 kDa en donde con los 3 inhibidores se logró de un 92 a un 99% con los tres inhibidores con respecto al control. Finalmente, en fig. 24e se muestra la región de 30kDa en donde con EDTA y EGTA se inhibió un 95% y con 1-10 fenantrolina un 61%.

La figura 25a muestra la inhibición de las proteinasas en interacción con las células HeLa. En la fig. 25b se observa una inhibición de 94 al 98% en la región de 150 kDa, para la región de 75kDa se puede ver en la fig. 25b una inhibición del 67 al 71% con los tres inhibidores, en la fig. 25c en la región de 69 kDa hay una inhibición del 99% con los tres inhibidores y finalmente en la fig. 25c en la región de 30 kDa muestra una inhibición del 93% con EDTA y EGTA y un 75% con 1-10 fenantrolina

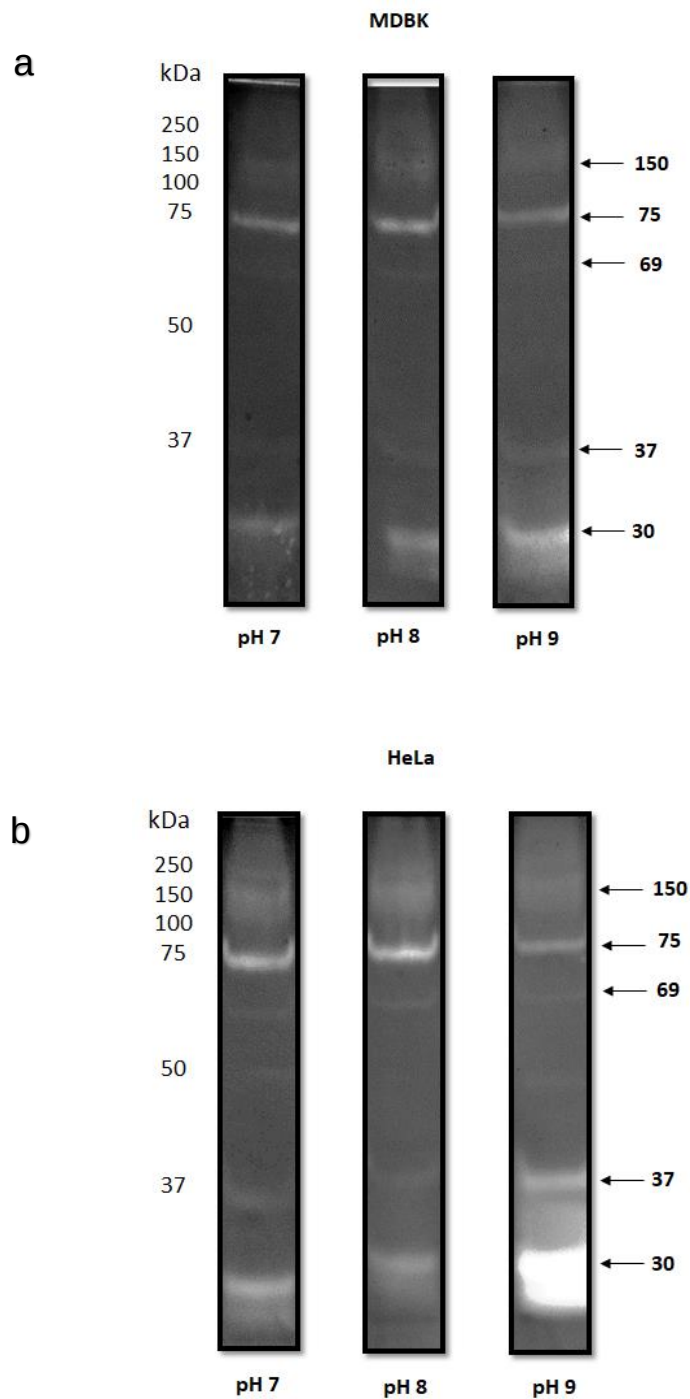


Fig 22. Actividad de proteinasas de *T. foetus* en interacción con células MDBK y HeLa. En el panel **a)** se muestra la actividad de las proteinasas en interacción con las células MDBK a 37°C en diferentes concentraciones de pH (7,8 y 9), así mismo en el panel **b)** se muestra la actividad de las proteasas en interacción con las células HeLa de igual forma a pH 7,8 y 9

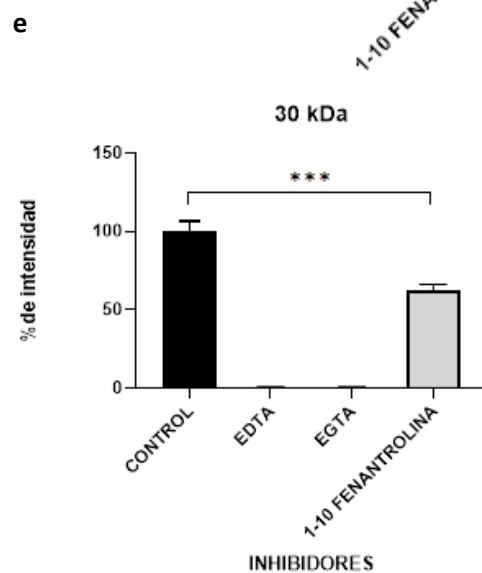
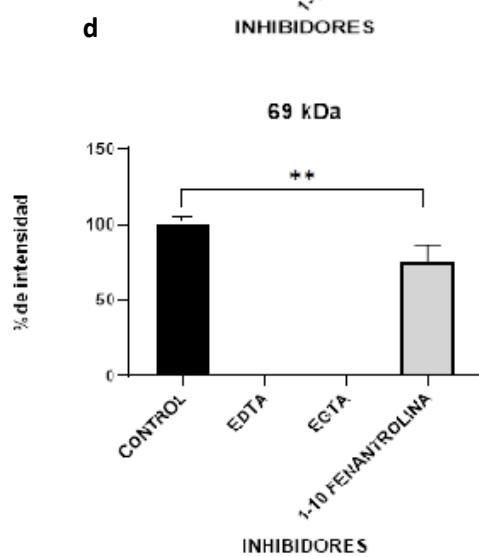
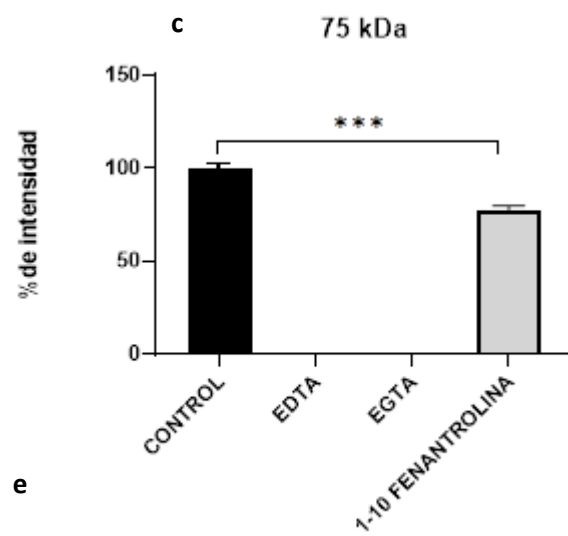
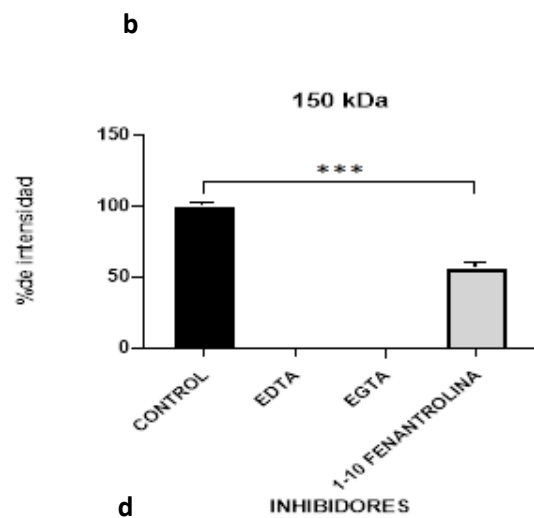
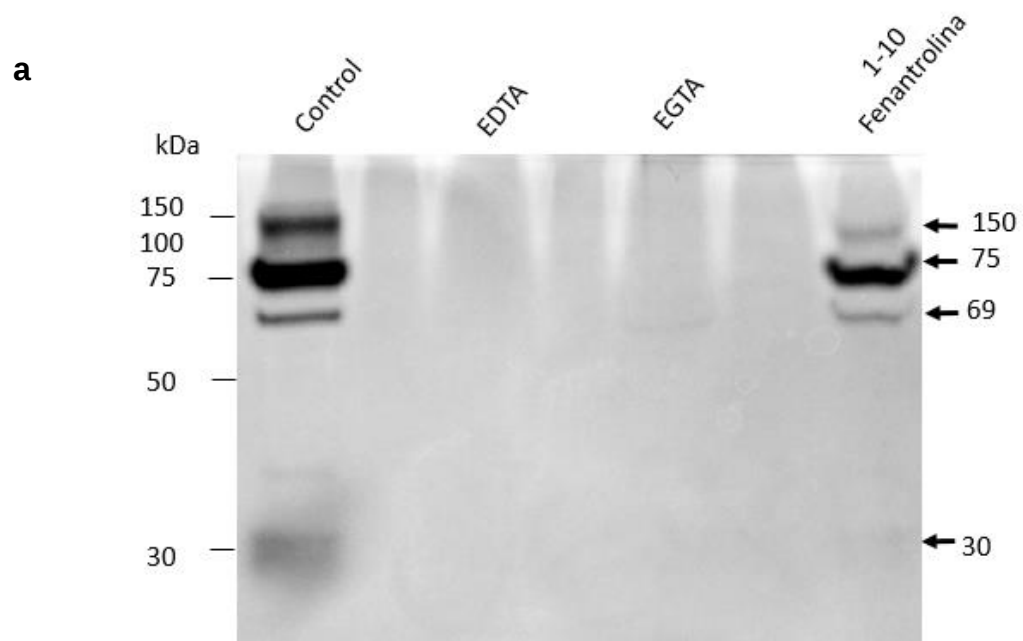


Fig 23. Inhibición de la actividad de proteinasas totales de *Tritrichomonas foetus*.

En el panel **a** carril 1) se muestra la actividad de las proteasas en ausencia de inhibidores, carril 2 EDTA; carril 3 EGTA; carril 4 1-10 Fenantrolina, la concentración de los inhibidores fue de 50 mM. En la fig **b)** se muestra el análisis densitométrico de la región de 150 kDa. En la fig. **c)** se muestra el análisis densitométrico de la región de 75 kDa. En la fig. **d)** se muestra el análisis densitométrico de la región de 69 kDa y finalmente en la fig. **e)** se muestra el análisis densitométrico de la región de 30 kDa. En todas las regiones se puede observar que hay una disminución de hasta el 99% con EDTA y EGTA, mientras que para la 1-10 Fenantrolina inhibe desde el 30 al 50%. Los (***) indica la diferencia significativa que hay entre el control (sin inhibidores) y los 3 inhibidores, respectivamente ($p < 0.0001$).

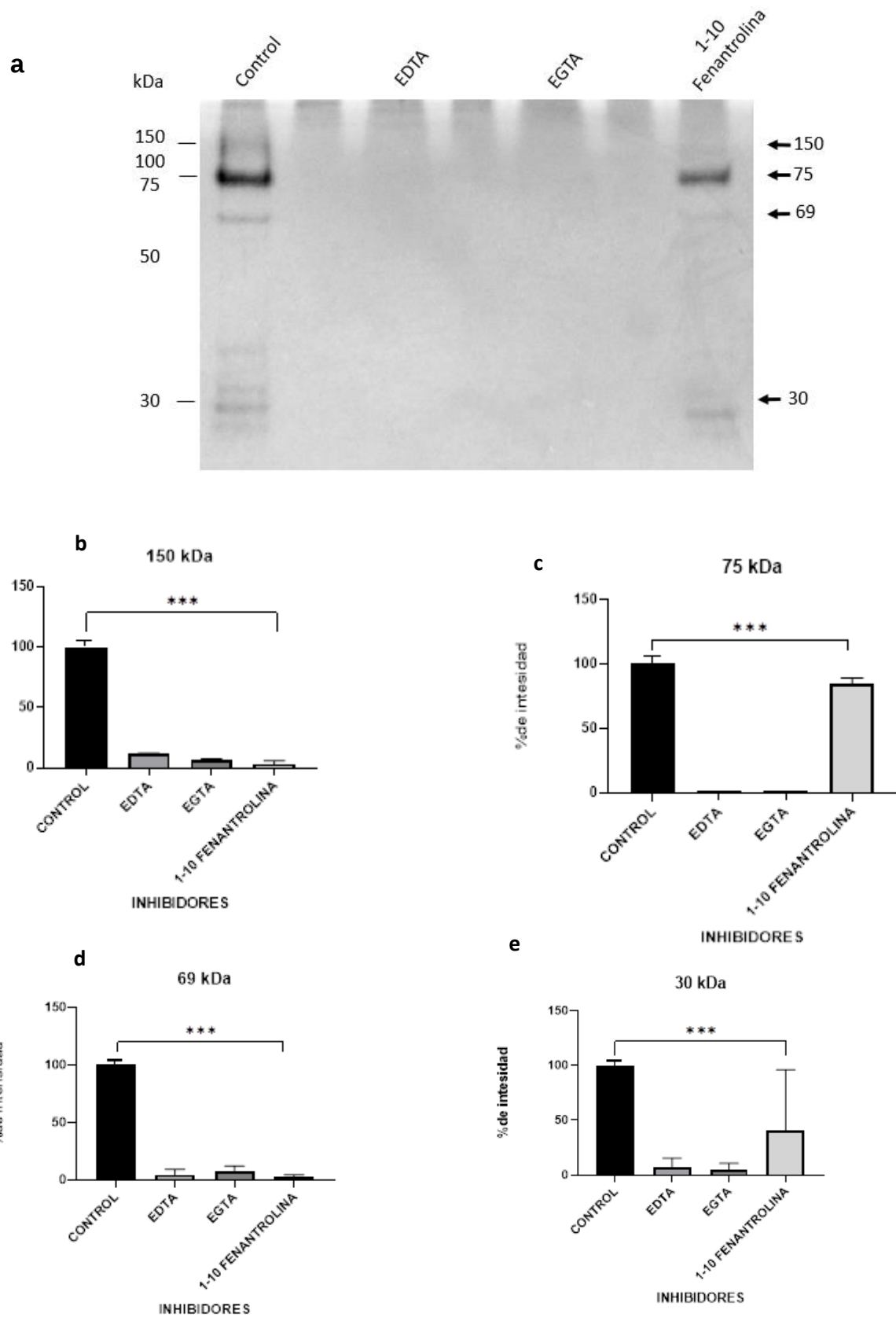


Fig 24. Inhibición de la actividad de proteinasas totales de *Tritrichomonas foetus* en interacción con las células MDBK. En el panel **a)** carril 1 se muestra la actividad de las proteasas en ausencia de inhibidores, carril 2 EDTA; carril 3 EGTA; carril 4 1-10 Fenantrolina, la concentración de los inhibidores fue de 50 mM. En la fig. **b)** se muestra el análisis densitométrico de la región de 150 kDa. En la fig. **c)** se muestra el análisis densitométrico de la región de 75 kDa. En la fig. **d)** se muestra el análisis densitométrico de la región de 69 kDa y finalmente en la fig. **e)** se muestra el análisis densitométrico de la región de 30 kDa. En todas las regiones se puede observar que hay una disminución de hasta el 99% con EDTA y EGTA, mientras que para la 1-10 Fenantrolina inhibe desde el 30 al 90%. Los (***) indica la diferencia significativa que hay entre el control (sin inhibidores) y los 3 inhibidores, respectivamente ($p < 0.0001$).

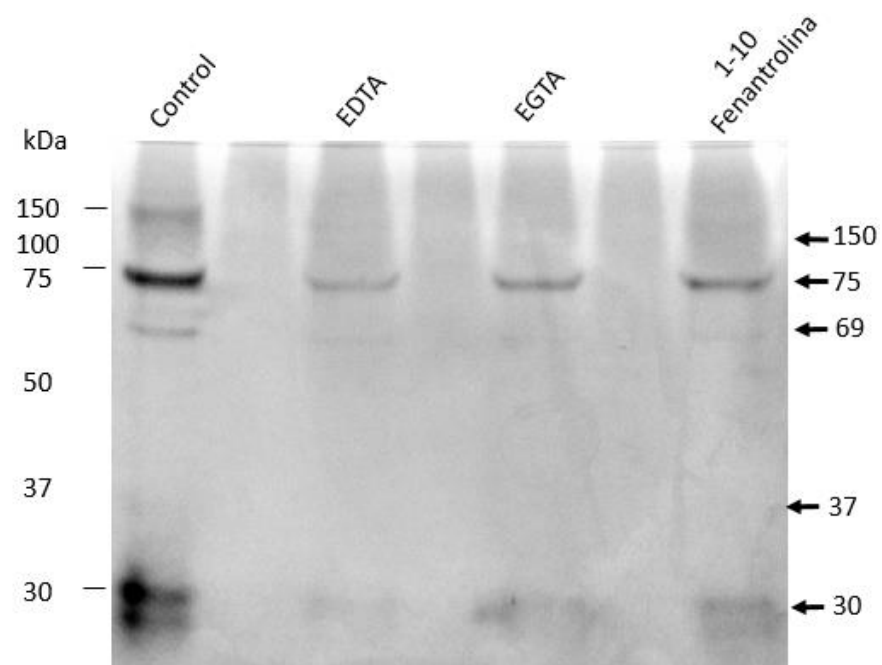
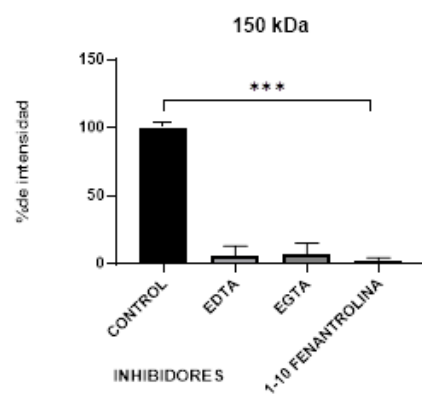
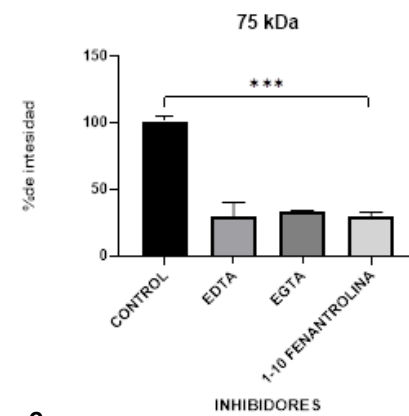
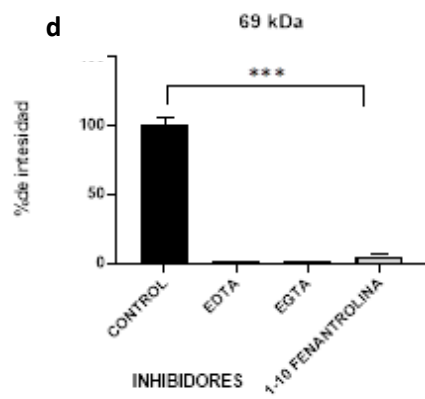
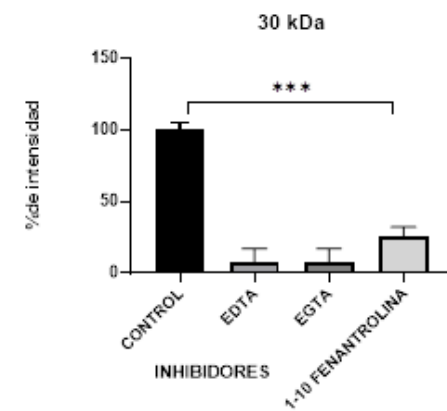
a**b****c****d****e**

Fig 25. Inhibición de la actividad de proteinasas totales de *Tritrichomonas foetus* en interacción con las células HeLa. En el panel **a)** en el carril 1 se muestra la actividad de las proteasas en ausencia de inhibidores, carril 2 EDTA; carril 3 EGTA; carril 4 1-10 Fenantrolina, la concentración de los inhibidores fue de 50 mM. En la fig. **b)** se muestra el análisis densitométrico de la región de 150 kDa. En la fig. **c)** se muestra el análisis densitométrico de la región de 75 kDa. En la fig. **d)** se muestra el análisis densitométrico de la región de 69 kDa y finalmente en la figura **e)** se muestra el análisis densitométrico de la región de 30 kDa. En la región de 150 y 69 kDa se inhibió hasta el 95% con los tres inhibidores, mientras que para la región de 75 kDa se inhibió un 80% con los tres quelantes y en la región de 30 kDa también se inhibió hasta un 80% con los tres quelantes. Los (***) indica la diferencia significativa que hay entre el control (sin inhibidores) y los 3 inhibidores, respectivamente ($p < 0.0001$).

Finalmente se realizó un zimograma en interacción con las células MDBK y HeLa, se analizaron para ver si había una diferencia significativa en la actividad de las metaloproteinasas en las diferentes regiones, sin embargo no se encontró una diferencia significativa pero en la región de 69 kDa se mostró una actividad mayor de las metaloproteinasas en interacción con las células MDBK en comparación con las HeLa por lo que se mandó a identificar por espectrometría de masas (MS) la banda en la región de 69kDa en interacción con las células MDBK (fig.26).

Los péptidos identificados a partir de la MS de la banda de la región de 69 kDa fueron cuatro metaloproteinasas (tabla IV) que corresponden a las familias M28, M1, M49 y M16. Se hizo un alineamiento de los péptidos contra el proteoma de *T. foetus* y se confirmó que solo corresponden al 100% con las metaloproteinasas.

Sin embargo solo una MP corresponde al peso molecular de 69kDa, la cual corresponde a la familia M1, principalmente son aminopeptidasas, sus sustratos son colágeno tipo I, II, II, gelatinasas y colageno intersticial, el ión que utiliza es el Zn, esta familia tiene la firma H(324),E(325), H(328), E(347) y Y(408) (fig.27).

Tabla IV. Péptidos identificados por espectrometría de masas.

Péptido	Acceso	Cobertura	PM
NLFALISPFNNSKPPIMLSGHLDSK	A0A1J4KC46	3.03	94.16
SLCLVCYSNDLLKKLEK	A0A1J4JJY8	2.85	69.16
KTFTPPSYNAINIITYCSSGMPIGINIPNYDSIRLN EG FK	A0A1J4JAM3	5.91	75.51
KVNFSIHSVSNNDNDPDDVSAQLK	A0A1J4K124	2.38	110.56

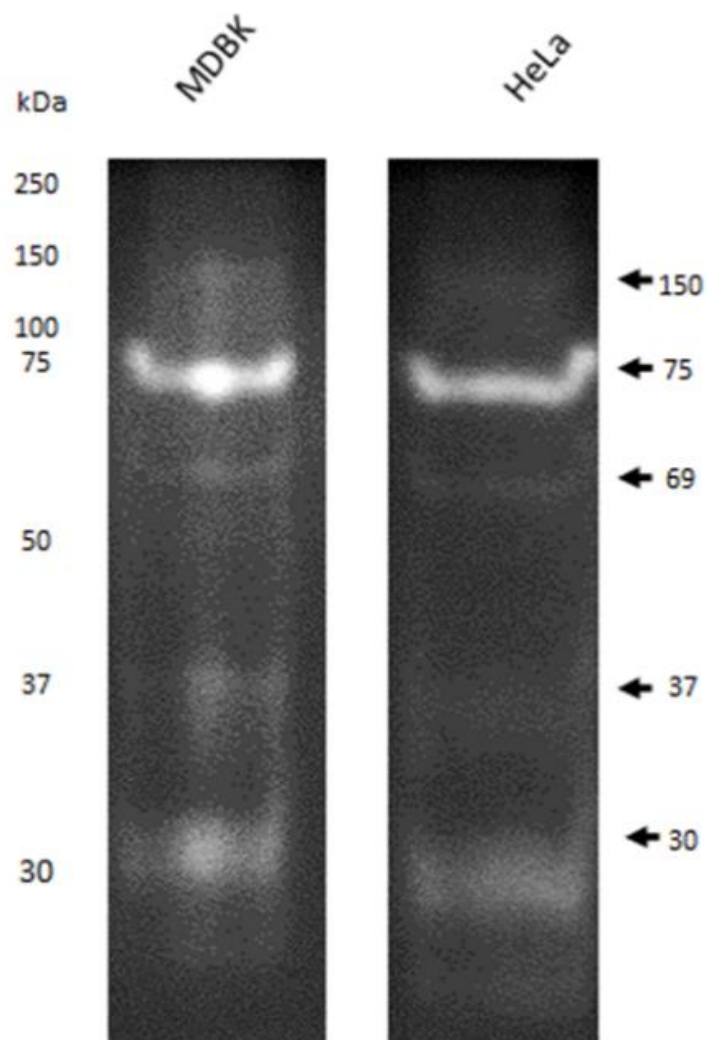


Fig 26. Zimograma de proteinasas de *T. foetus* en interacción con células MDBK y HeLa para análisis por masas. Se observa el patrón de bandeo de actividad en ambas líneas celulares en la región de 150, 75, 69, 37 y 30 kDa, en donde la región de 69 kDa parece tener una actividad diferencial en MDBK con respecto a HeLa.

MTDSKRIPNS IIPSSYDIFI DFINNEKILP ASVTIHFIKN HNNISDISDE SEGVKQSESE
 TAYLAVSKNI VIKSIKQNNK PIRFTIFKRK GLVAIFPSTS PFISLTVSPV TIEYQIPVGS
 NYEGLYKSKN LYITDLEPNN AQMFVPCFDE PCIKSIFNVS LLIPNQLNCI SNMPLKSKTQ
 NIFATNEKNQ RNELISLINI DNKESQTSYH DAILYEFYPT PPICTYLLCF AVGKFSLAFS
 DTSNRVPIHL FCQKKTDEHQ KYVSIASKAL NWLENKFGVK YPLPHLQLIS HSGIYSGMEN
 YGLITLHELD VDPISRTDVL LLIHEIVHFW FGDIIITIKWW DSLWLNESFA QLLSYIITQE
 FCPEFNIWEF FYKNEIKNSL YLYSKQSIVP NNPNQHLINS SLFTKVIYNK NCFVMKMFVD
 IVGYDNFMKF LTKYVQKYSY IGLVDTNDFL GLCQDYFPIT HDYFDNWLYK KGFPILYIDD
 QKNLIQQIQT DKSYYFFPLS IQLSKNGTVK NETILIKEEE TNFCMDECDW IIVNSESKSL
 CLVCYSNDLL KKLEKHKKDG NLTEKDSYLI NQSFRLVYEI SHPILEKVINI ELIQT

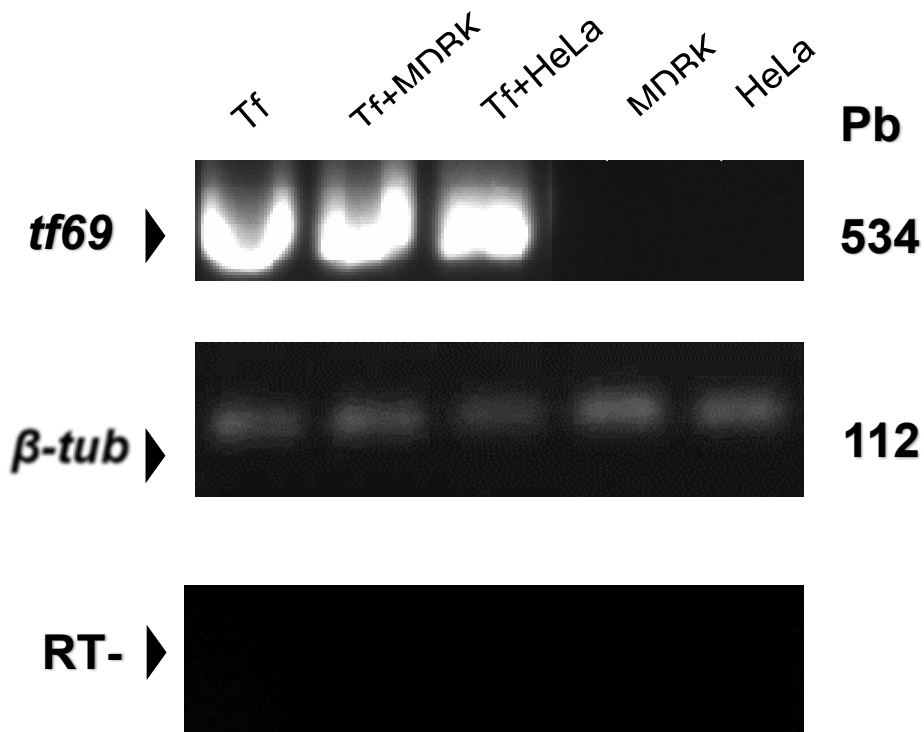
Fig 27. Secuencia de la metaloproteinasa TF69 de *T. foetus* identificada por espectrometría de masas. Secuencia de la proteína TfMP69, se encuentra subrayado de rosa la secuencia del péptido que se identificó por espectrometría de masas el cual se alinea al 100% con la proteína. En verde se encuentran subrayados los aminoácidos (H324, E325, H328, E347 y Y408) que interaccionan con el Zn²⁺ en el sitio catalítico

Expresión del gen *tf69* de *T. foetus* en interacción con las células MDBK y HeLa.

Para determinar si la TF69 se expresa diferencialmente en interacción con las células blanco, se diseñaron oligonucleótidos específicos del gen que codifica la TfMP69 identificada. A partir de un cultivo de *T. foetus*, los parásitos se pusieron a interaccionar con las células MDBK y HeLa durante 8h y se extrajo el RNA de los parásitos para la síntesis de cDNA (templado) el cual fue utilizado para amplificar un fragmento de los genes de *β -tubulina* y *mp69* (fig.28a). Los valores de intensidad se normalizaron con el gen constitutivo *β -tubulina* de la condición control.

De acuerdo con el análisis densitométrico (fig.28b) los niveles relativos de mRNA del gen *tf69* muestra un incremento del 18% con respecto al control en interacción con ambas células

a



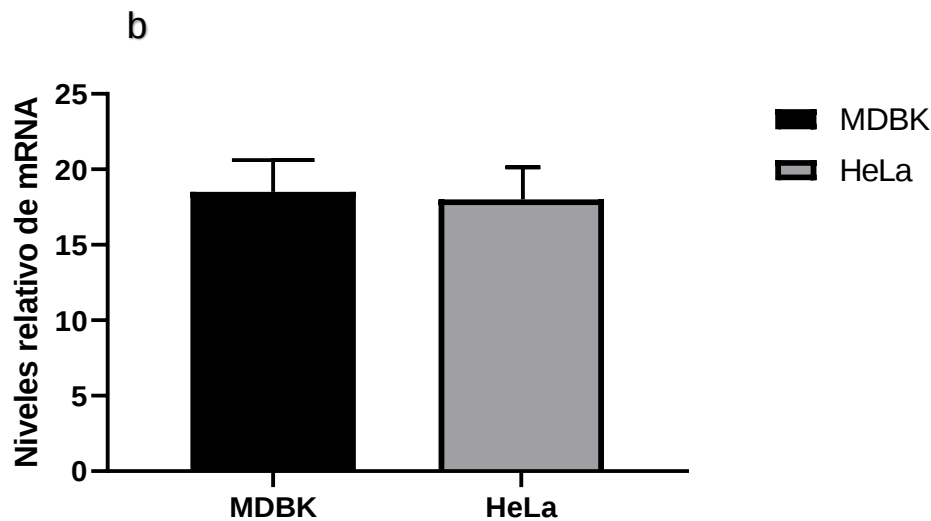


Fig 28. Análisis semicuantitativo de la expresión del gen *tf69* de *T. foetus*. a) Perfil de expresión del gen *tf69* en interacción con las células MDBK y HeLa. El producto se observó en un gel de agarosa al 2% con Red-Gel. En el carril 1 se observa el producto de *T. foetus* sin interacción, en el carril 2 se muestra el producto de *T. foetus* en interacción con las células MDBK, en el carril 3 el producto de *T. foetus* en interacción con células HeLa, en carril 4 el producto de las células MDBK y finalmente en el carril 5 el producto de las células HeLa **b)** Análisis densitométrico de la expresión del gen *tf69*, la barra negra muestra el cultivo de *T. foetus* en interacción con las células MDBK y la barra gris la interacción con células HeLa.

DISCUSIÓN

Tritrichomonas foetus causa no solo la tricomoniasis genital bovina si no también la tricomoniasis entérica en gatos, se ha demostrado que no tienen diferencias significativas genéticamente por lo que se ha comparado el transcriptoma, debido a los requerimientos del microambiente son diferentes en los hospederos se encontró que solo hay ligeras variaciones como es el caso de las proteasas en donde las cisteinproteinasas en el genotipo bovino hay 285 y serinproteinasas 99 y en el genotipo felino hay 249 y 95 respectivamente, sin embargo ambos genotipos tienen 22 treoninproteinasas, 9 asparticoproteinasas y 88 metaloproteinasas, por lo que ambos genotipos presentan un funcionamiento transcripcional similar (Morin V y cols. 2014).

De acuerdo a los resultados que se obtuvieron a partir de BLASTP de las metaloproteinasas de *T. vaginalis* con el proteoma de *T. foetus* se encontraron las 88 metaloproteinasas transcritas, las cuales se pudieron clasificar por familias y determinar características en la base de datos de UNIPROT (<http://www.uniprot.org>) y en MEROPS (<https://www.ebi.ac.uk/merops>) se identificaron los inhibidores y los amino ácidos que integran el sitio catalítico (Rawlings N. y cols 2018).

Las metaloproteinasas presentan el dominio HEXXH (X cualquier amino ácido), que se ha demostrado mediante la cristalografía de las metaloproteinasas el cual forma parte para la unión al metal. Las familias de metalopeptidasas se pueden clasificar en cinco grupos, los primeros tres tienen el motivo HEXXH. En el primer conjunto, un residuo de ácido glutámico completa el sitio de unión al metal, y debido a que las familias en este conjunto "HEXXH + E" muestran signos de relación entre sí, forman el clan MA. En el segundo conjunto, un tercer residuo de histidina es un ligando; estas familias "HEXXH + H" también están interrelacionadas y, por lo tanto, forman un clan MB (Rawlings N y Barrett A. 1995).

Este primer objetivo fue de gran importancia debido a que los números de identificación de las metaloproteinasas de *T. foetus* no se encontraban disponibles en ningún artículo y tampoco hay una base de datos exclusiva para el parásito, además

gracias al concentrado de datos una vez que se obtuvieron los péptidos de MS fue más fácil identificar a que metaloproteinasas correspondían debido a que se contaba con las secuencias de las metaloproteinasas.

Para el segundo objetivo se obtuvo la actividad de las metaloproteinasas en 1D, en donde se obtuvo actividad en las regiones de 150, 75, 37 y 30 kDa.

La actividad de las metaloproteinasas totales en el zimograma se pueden comparar con la actividad reportada por Da Rocha y cols. 2005 en las regiones de 75 y 69 kDa, sin embargo la actividad de bajo peso molecular por debajo de los 30kDa no se observó, esto puede ser debido a que el buffer de activación que nosotros utilizamos tiene Zn^{2+} y en el ya reportado solo es un buffer de fosfato y la actividad de bajo peso molecular se le atribuye a las CP y no a las metaloproteinasas.

También de forma interesante no se observó que existiera una actividad diferencial en las regiones de 150, 75, 37 y 30 kDa en interacción con las dos líneas celulares, sin embargo sí se aprecia una actividad mayor en la interacción con las células HeLa que en las células MDBK. Con los estudios anteriores se ha repostado que ambas líneas celulares en ensayos de citotoxicidad pueden sufrir lisis, sin embargo las MDBK son más resistentes al daño (Burges y cols. 1990).

Para demostrar que la actividad que se observa en el zimograma es por acción de metaloproteinasas se utilizaron los agentes quelantes EDTA, EGTA y 1-10 fenantrolina. Nosotros obtuvimos una inhibición de hasta el 99% en las diferentes regiones con EDTA y EGTA sin embargo con 1-10 fenantrolina no se pudo inhibir de la misma forma. Los quelantes metálicos contienen átomos de oxígeno y nitrógeno distribuidos espacialmente para proporcionar una unión bi o polidentada a un átomo metálico. Los quelantes pueden inhibir las metaloproteinasas mediante la inhibición del metal de la enzima o unirse a él formando un complejo ternario. En el caso del EDTA arresta iones divalentes, con el paso del tiempo esta unión puede ser reversible, lenta o indetectable dependiendo de la concentración también puede sostener una inhibición irreversible. El caso de 1-10 fenantrolina es mucho más selectiva al arresto del ión Zn^{2+} por lo que podría ser un mejor inhibidor sin embargo este quelante es bidentado a comparación del EDTA que es hexadentado por lo que se requiere una concentración mayor para mantener una inhibición (Bazargan M y cols. 2019).

Los quelantes bidentados como la 1-10 fenantrolina tiene fuerzas difenciales de unión a los metales, por ejemplo, tiene más afinidad a Ni^{2+} , Cu^{2+} y Fe^{2+} posteriormente Zn^{2+} , Cd^{2+} y Co^{2+} y finalmente Mn^{2+} . Hay un cambio de estabilidad de los metales con respecto al EDTA y EGTA en donde el Fe^{2+} y el Mn^{2+} caen en un valor cercano de estabilidad. Para una concentración de 1mM cualquiera de los quelantes ya mencionados debería ser suficiente para eliminar el metal de la mayoría de las metaloproteinasas, sin embargo las características del sitio de unión al metal y la estructura del quelante determinan que quelante será más efectivo (Auld D. 1995. Swann y cols. 1981).

Las propiedades de la 1-10 Fenantrolina son la estructura rígida impuesta por el anillo central que le permite que los dos átomos de nitrógeno siempre se mantienen en yuxtaposición, La rotación libre alrededor del enlace de enlace permite que los dos nitrógenos se separen, en particular en condiciones básicas o fuertemente ácidas y finalmete todas estas propiedades del quelante se han utilizado para la inhibición de metaloproteinasas de los microorganismos parásitos. Las metaloproteinasas de *T. cruzi* se inhiben con 1-10 fenantrolina como la GP63 homóloga a la GP63 de *Leishmania spp.* que son importantes para la infección de la célula huésped (Santos y cols. 2012 Auld D.1988).

A partir de la banda de 69kDa que se mandó a identificar por MS obtuvimos tres péptidos como se muestra en la tabla IV. La Metaloproteinasa con ID A0A1J4KC46 pertenece a la familia M28 la cual es una aminopeptidasa y carboxipeptidasa, es activa con el ion Zn y en su sitio catalítico presenta la firma HDDEH. Otra Metaloproteinasa es de la familia M49 es una dipeptidil peptidasa y también se activa con el ión Zn como la Metaloproteinasa de la M16 la cual es una metaloendopeptidasa (MEROPS).

Por último la metaloproteinasa de la familia M1 que corresponde al peso molecular de 69 kDa, no se ha descrito en algún otro parásito alguna Metaloproteinasa de esta familia pero en el humano si está caracterizada, también se le denomina colagenasa-1 o intersticial, su locus genético es en el cromosoma 11q22.3. La MMP-1 degrada colágeno y gelatina. MMP-1 también corta proMMP-9 en su forma activa. Al igual que con muchas otras MMP, los niveles de MMP-1 son muy bajos en la mayoría de las células en condiciones fisiológicas, pero se regulan en condiciones inflamatorias y

enfermedades autoinmunes en donde se ha identificado una mayor actividad. La expresión de MMP-1 se ve aumentada por las citocinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y la interleucina-1 (IL-1). MMP-1 puede desempeñar un papel en el desarrollo del cáncer y la metástasis. Los estudios han sugerido una asociación entre MMP-1 y un mal pronóstico en tumores malignos como el carcinoma de células escamosas de la lengua. Además, en pacientes con carcinoma de tiroides invasivo bien diferenciado, la expresión de MMP-1 se correlaciona con la agresividad tumoral manifestada como invasión laringotraqueal, multifocalidad del tumor y la presencia de metástasis (Cui y cols. 2017).

La familia M1 contiene solo aminopeptidasas, Las aminopeptidasas difieren ampliamente en especificidad con otras familias de metaloproteinasas, estas hidrolizando residuos N-terminales ácidos, básicos o neutros. También un miembro de la familia es leukotriene-A4 hidrolasa, esta tiene una lleva a cabo la hidrólisis del epóxido leukotriene-A4 para formar un mediador inflamatorio. El ión zinc es esencial para ambas para la actividad. La alanil aminopeptidasa de membrana y la glutamil aminopeptidasa tienen dominios que abarcan la membrana N-terminal que no se eliminan proteolíticamente. Ambos son típicamente homodímeros glicosilados (Rawlings N y Barrett A. 1995).

Con respecto a la expresión del gen *tf69* no se encontraron diferencias en interacción con las líneas celulares MDBK y HeLa, esta Metaloproteinasa no se ha caracterizado en ningún parásito protozoario como es el caso de la Tvmp50 en el parásito *T. vaginalis* se ha visto una regulación a la alta de la expresión de la Tvmp50 en presencia de Zn^{2+} y GAPDH y enolasa se ha visto regulada de manera positiva con por Fe^{2+} y la síntesis si se incrementa en contacto con las células VEC (Villegas Y y cols. 2015).

El micro ambiente urogenital de los bovinos especialmente en machos se sabe que presentan en plasma seminal, semen B (1.73-0.44 mg/mL), Mg (9.8-1.9 mg/mL), Ca (24-6.6), P (70-23), Na (227-53 mg/mL), K (173-91 mg/mL) y Zn (0.28 mg). Por lo que sería de forma interesante hacer los ensayos de expresión en presencia de alguno de elementos traza para ver si hay cambio en la regulación de la expresión de *mp69*.

Los resultados mostraron que TF69 se expresa antes y durante el contacto con las células MDBK, sin embargo esta interacción no es específica debido a que también esta metaloproteinasa se expresa al contacto con las células HeLa, en los experimentos previos con *T. vaginalis* se ha determinado que los genes que codifican una gran cantidad de proteínas que funcionan como factores de virulencia se van a expresar de diferente forma de acuerdo a los nutrientes del medio, cambios en el pH, temperatura, concentraciones de Fe^{2+} , Zn^{2+} y poliamidas. El contacto con células diana de mamíferos, *T. vaginalis* muestra una regulación positiva de las adhesinas y una transformación morfológica a una forma ameboidea, que puede considerarse otro rasgo de virulencia, las adhesinas AP65 y AP33, actinina y enolasa, las cuales se propone que pudieran estar reguladas no solo por el contacto y también por la presencia de Fe^{2+} . *T. vaginalis* requiere hasta 300 mM de hierro para un para el crecimiento y mantenimiento de la infección, el hierro modula la expresión de varios genes de virulencia en *T. vaginalis*, incluidas las adhesinas que están reguladas por aumento y varias CP que están reguladas. Los efectos citotóxicos de *T. vaginalis* en las monocapas de células HeLa y DU-145 se ha observado que puede ser regulado por el Zn^{2+} ya que en la citotoxicidad de *T. vaginalis* hacia la célula las monocapas HeLa no se ven afectadas, sin embargo, el Zn^{2+} tiene un efecto negativo sobre la citotoxicidad hacia las células DU-145 (Figueroa y cols. 2012). Esto podría deberse a una reducción en la expresión de las CP involucradas en citotoxicidad (TvCP65 y TvCP39). La regulación de la expresión de la metaloproteinasa TvMP50 la cual es un factor de virulencia ya que causa un daño citotóxico a las células DU-145 se demostró que tiene una regulación positiva en la expresión en presencia de Zn^{2+} (Puente y cols. 2017).

Las moléculas involucradas en los diferentes factores de virulencia, pueden estar reguladas por diferentes iones pero hasta el momento no se ha visto la regulación de una metaloproteinasa en de *Tritrichomonas foetus*.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron de *in silico* 88 metaloproteinasas de *T. foetus* que pertenecen a 12 familias, siendo las de la familia M18 las más abundantes. *T. foetus* no presenta la familia M22 y M41 que posee *T. vaginalis*.

La actividad de las metaloproteinasas de *T. foetus* con interacción a las células MDBK no es específico para esta línea celular.

La Metaloproteinasa de *T. foetus* con interacción a las células MDBK pueden ser inhibidas con EDTA, EGTA y 1-10 Fenantrolina.

Por espectometría de masas se identificó una metaloproteinasa de 69 kDa (TF69) con interacción a las células MDBK.

Las metaloproteinasas de 69 kDa pertenece a la familia M1 y la firma del sitio catalítico es H (324), E (325), H (328), E (347) y Y (408).

REFERENCIAS

1. Auld D. (1988). Use of Chelating Agents to Inhibit Enzymes. *Methods in enzymology*. Pp. 110-114.
2. Auld D. (1995) Removal and replacement of metal ions in metalloproteinases. *Methods in enzymology*. Pp. 228-242
3. Auld D. (2013). *Metalloproteases*. Elsevier. Pp 86-89.
4. Barreiros D., Fernandes J., Rocha B., Costa e Silva-Filho F. (2008). The binding of *Tritrichomonas foetus* to immobilized laminin-1 and its role in the cytotoxicity exerted by the parasite. *Microbiology*. Pp. 2283–2290.
5. Barratt J., Harkness J., Marriott D., Ellis J., Stark D. (2011). The ambiguous life of *Dientamoeba fragilis*: the need to investigate current hypotheses on transmission. *Parasitology*. Pp. 557–572.
6. Bazargan M., Mirzaei M., Franconetti A., Frontera A. (2019). On the preferences of five-membered chelate rings in coordination chemistry: insights from the Cambridge Structural Database and theoretical calculations. *Chemistry*. Pp. 1-30.
7. Benchimol, M., Johnson, P., De Souza W., 1996, Morphogenesis of the hydrogenosome: an ultrastructural study. *Biol Cell*. Pp. 197-205.
8. Benchimol M., Almeida L., Vasconcelos A., Andrade I., Rels M., Wilges L., De Souza W. (2017) Draft Genome Sequence of *Tritrichomonas foetus* strain K. American Society for Microbiology Genome Announcements. Pp 1-2.
9. BonDurant R., Campero M., Anderson M., Van K. (2003) Detection of *Tritrichomonas foetus* by polymerase chain reaction in cultured isolates, cervicovaginal mucus, and formalin-fixed tissues from infected heifers and fetuses. *J Vet Diag Invest*. Pp.579-584.
10. Borchert Alfred. *Parasitología Veterinaria*. Editorial Acribia Zaragoza (1900). Pp. 595-599.
11. Borgess D., Knoblock K., Daugherty T., Robertson N. (1990). Cytotoxic and hemolytic effects of *Trichomonas foetus* on mammalian cell. *Infection and Immunity*. Pp 3627-3632.

12. Campbell B., Gajadhar A. (1999). Effects of temperature on the survival of *Tritrichomonas foetus* in transport, Diamond's and InPouch TF media. Vet Rec. Pp. 227-232.
13. Campero C., Ladds P. (1991). Cuantificación de inmunoglobulinas en fluidos genitales y células contenedoras de inmunoglobulinas en el tracto genital de toros vacunados y desafiados con *Tritrichomonas foetus*. Rev Med Vet. Pp. 36-39.
14. Campero C., Patitucci A., Medina D., (1993). Tricomoniasis bovina: infección experimental y natural en hembras. Vet Arg. Pp. 662-670.
15. Campero, C., (2002). Eficiencia productiva del rodeo de cría. Rev. Idia. Pp. 127-131
16. Campero C. y E. Cobo. (2006) *Tritrichomonas foetus*: patogénesis de la mortalidad embrionaria/fetal, caracterización de antígenos vacunales y respuesta inmune inducida. Revista de Medicina Veterinaria Vol 87: 47-56 p.
17. Collantes E., Moreno J., Sánchez R., García I., Horcajo P, Ortega L. (2019). Prevalence of bovine trichomonosis and associated risk factors in bulls from Spanish beef herds. Theriogenology. Pp. 1-27.
18. Costa F. y Souza W. (1988). The Interaction of *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus* with Epithelial Cells in Vitro. Cell Structure And Function. Pp. 301-310.
19. Cox M., Phillips G (2007). Handbook of proteins structure, function and methods. Vol. 1. Pp. 509-514.
20. Cuevas I. Cazzulo J., Sánchez D. (2003). gp63 Homologues in *Trypanosoma cruzi*: Surface antigens with metalloprotease activity and a possible role in host cell infection. Pp. 5739–5749.
21. Cui N., Hu M., Khalil R. (2018). Biochemical and biological attributes of matrix metalloproteinases. Elsevier. Pp. 1-73.
22. Da Rocha B., Melo M., Silva F. (2005) Intra-strain clonal phenotypic variation of *Tritrichomonas foetus* is related to the cytotoxicity exerted by the parasite to cultured cells.
23. Dong W., Rong Z., Gajadhar A. (1998). Chromosome numbers of *Tritrichomonas foetus* and *Tritrichomonas suis*. Elsevier. Pp 247-251.

24. Doumec M., y Soto, P. (2013). *Tritrichomonas foetus*: mechanisms of action pathogenic. SCielo. 14(2): 151-161.
25. Felleisen R. (1997). Comparative sequence analysis of 5.8S rRNA genes and internal transcribed spacer (ITS) regions of trichomonadid protozoa. Parasitology. Pp.111-119.
26. Filho F., Souza W. (1988). The interaction of *Trichomona vaginalis* and *Tritrichomonas foetus* with epithelial cells in vitro. Cell structure and function. Pp. 301-310.
27. Figueroa E., Rendon F., Puente J., Calla J., Cárdenas R., Ortega J., Quintas L., Álvarez M., Arroyo R. (2012). The effects of environmental factors on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. Elsevier.
28. Geurts N., Opdenakker G., Steen P. (2012). Matriz Metalloproteinases as therapeutic targets in protozoan parasitic infections. Elsevier. Pp. 257-279.
29. Gomez M., Gonzalez R., Pereira J., Orteg L., (1998) Prevalence of *Tritrichomonas foetus* infection in beef bulls in northwestern Spain. Vet Parasitol. Pp.265-268.
30. Jacobs D., Fox M., Gibbons L., y Hermosilla C. (1998). Principles Of Veterinary Parasitology. Editorial Wiley Blackwell.
31. Kania S., Reed S., Thomford, J. (2001) Degradation of bovine complement C3 by trichomonad extracellular proteinase. Vet Immunol and Immunopathol. Pp.83-96
32. Kennetta M., y Hook R. (2002). *Tritrichomonas foetus*: characterization of isolates and partial purification of a secreted cytotoxin. Elsevier Experimental Parasitology 10. Pp 1–8.
33. Lam C., Jamerson M., Cabral G., Carlesso A., Marciano F. (2017). Expression of matrix metalloproteinases in *Naegleria fowleri* and their role in invasion of the central nervous system. Microbiology society. Pp. 1436-1444.
34. Lockwood B., North M., Scott K., Bremner A., Coombs G. (1987). The use of a highly sensitive electrophoretic method to compare the proteinases of trichomonads. Molecular and Biochemical Parasitology. Pp. 89-95.

35. López L., Braga M., López J., Arroyo R., Filho Costa E Silva F. (2000) Strategies by which some pathogenic trichomonads integrate diverse signals in the Decision-making Process. *Redalyc*. Pp. 173-186.
36. Lucas J., Hayes G., Kalsi H., Gilbert R., Choe Y., Craik C., Singh B. (2008). Characterization of a cysteine protease from *Tritrichomonas foetus* that induces host-cell apoptosis. *Elsevier*. Pp 239–243.
37. Lockwood B., North M., Scott K., Bremner A., coombs G. (1987) The use of a highly sensitive electrophoretic method to compare the proteinases of trichomonads. *Molecular and Biochemical Parasitology*. Pp.89-95.
38. Mallinson D., Livingstone J., Appleton K., Lees S., Coombs G., y North M. (1995). Multiple cysteine proteinases of the pathogenic protozoon *Tritrichomonas foetus*: identification of seven diverse and differentially expressed genes. *Microbiology*. Pp. 3077-3085.
39. Michi A., Favetto P., Kastelic J., Cobo E. (2015). A review of sexually transmitted bovine trichomoniasis and campylobacteriosis affecting cattle reproductive health. *Theriogenology*. Pp. 1-46.
40. Morin V., Lomas R., Meally D., Stack C., Conesa A., Slapeta J. (2014). Comparative transcriptomics reveals striking similarities between the bovine and feline isolates of *Tritrichomonas foetus* : Consequences for in silico drug-target identification. *BMC Genomics*. Pp. 1-17.
41. Morin V., Muller K., Conesa A., Slapeta J. (2015). Comparative RNA-seq analysis of the *Tritrichomonas foetus* PIG30/1 isolate from pigs reveals close association with *Tritrichomonas foetus* BP-4 isolate bovine genotype. *Elsevier*. Pp. 1-7.
42. Nagase H. 2001. *Current Protocols in Protein Science*. 21.4.1-21.4.13 Copyright.
43. Ondrak J. (2016). *Trichomonas foetus* prevention and control in cattle. *Elsevier*. Pp 1-13.
44. Owen D., Crews J. (2006). *Tritrichomonas foetus*. *Elsevier*. Pp. 595-611.
45. Oyhenart J., Breccia J. (2014). Evidence for repeated gene duplications in *Tritrichomonas foetus* supported by EST analysis and comparasion with the *Trichomonas vaginalis* genome. *Elsevier*. Pp. 267-276.

46. Pereira A., Ferreira L., Benchimol M. (2012). Cytotoxic Effects Exerted by *Tritrichomonas foetus* Pseudocysts. Elsevier. Pp. 529-543.
47. Pereira A., Rosales J., Meyer J., Benchimol M. (2014). *Tritrichomonas foetus*: Characterisation of ecto-phosphatase activities in the endoflagellar form and their possible participation on the parasite's transformation and cytotoxicity. Experimental parasitology. Pp. 67-82.
48. Pires K., Autoguia J., Sousa M. (2010). Partial biochemical characterization of metalloproteinase from the bloodstream forms of *Trypanosoma brucei brucei* parasites. Springer. Pp. 283-289.
49. Rawlings N y Barrett A. (1995). Evolutionary Families of Metallopeptidases. Methods In Enzymology. Pp. 183-228.
50. Rawlings N., Barret A., Finn R. (2018). The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and comparison with peptidases in the panther database. Nucleic acid. Pp. 624-632.
51. Swann J., Reynolds J., Galloway A. (1981). Zinc metalloenzyme properties of active and latent collagenase from rabbit bone. Biochemical.
52. Singh B., Lucas J., Hayes J., Kumar I., Beach D., Frajblat M., Gilbert R., Sommer U., Costello C. (2004). *Tritrichomonas foetus* Induces Apoptotic Cell Death in Bovine Vaginal Epithelial Cells. Infection and Immunity. Pp. 4151–4158.
53. Slapeta J., Craig S., McDonell D., Emery D. (2010). *Tritrichomonas foetus* from domestic cats and cattle are genetically distinct. Elsevier. Pp. 209-213.
54. Slapeta J., Muller N., Stack C., Walker G., Lew A., Tachezy J. (2012). Comparative analysis of *Trichomonas foetus* (Riedmuller, 1928) cat genotype, *T. foetus* (Riedmuller, 1928) cattle genotype and *Trichomonas suis* (Davine, 1875) at 10 DNA loci. Elsevier. Pp. 1143-1149
55. Slapeta J., Muller N., Stak C., Walker G., Lew A., Tachezy J (2012). Comparative analysis of *Tritrichomonas foetus* (Riedmuller, 1928) cat genotype, *T. foetus* (Riedmuller, 1928) cattle genotype and *Tritrichomonas suis* (Davine, 1875) at 10 DNA loci. Elsevier. Pp. 1143-1149.
56. Stround L., Slapeta J., Padula M., Druery D., Tsiotsioras G., Coorssen R., Stack C. (2016). Comparative proteomic analysis of two pathogenic *Tritrichomonas foetus* genotypes: there is more to the proteome than meets the eye. Elsevier.

57. Villegas Y., Villalpando J., Vázquez L., Castañón M., Álvarez M. (2015). Evaluación de la citotoxicidad y la expresión génica de *Trichomonas vaginalis* durante la interacción con las células prostáticas in vitro mediado por Zn^{2+} . FODICYT. Pp. 1-6.
58. Visse R., y Nagasse H. (2003). Matrix Metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases Structure, function, y biochemistry. Journal. Pp.827-839.
59. Wang, A. y Wang C. (1985) Molecular and Biochemical Parasitology, isolation and characterization of DNA from *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. Elsevier Vol. 14: 323-335 p.
60. Wiley J., Sons. (2001). Current protocols in protein science. Pp. 21.4.1-21.4.13.

ANEXO

Tabla de las 88 metaloproteinasas de *T. foetus*.

GEN	PROTEINA	Amino ácidos	Función molecular	Función biológica	Localización	MW (kDa)	Familia
TRFO_25509	A0A1J4K4V9	619	Metaloendopeptidasa	Adhesión celular	Transmembranal	68.7	M8
TRFO_26126	A0A1J4K3M3	667	Metaloendopeptidasa	Adhesión celular	Membrana	73.6	M8
TRFO_20432	A0A1J4KHF8	646	Metaloendopeptidasa	Adhesión celular	Membrana	72.5	M8
TRFO_09983	A0A1J4JAX6	597	Metaloendopeptidasa	Adhesión celular	Transmembranal	68.4	M8
TRFO_01978	A0A1J4JE15	638	Metaloendopeptidasa	Adhesión celular	Transmembranal	72	M8
TRFO_38081	A0A1J4J9C4	664	Metaloendopeptidasa	Adhesión celular	Transmembranal	74.5	M8
TRFO_26622	A0A1J4K7Z7	662	Metaloendopeptidasa	Adhesión celular	Transmembranal	74.3	M8
TRFO_09554	A0A1J4JI70	620	Metaloendopeptidasa	Adhesión celular	Transmembranal	68.6	M8
TRFO_25514	A0A1J4K5N7	1208	Metaloendopeptidasa	Adhesión celular	Transmembranal	136.5	M8
TRFO_27033	A0A1J4K6E0	631	Metaloendopeptidasa	Adhesión celular	Transmembranal	71.7	M8
TRFO_02870	A0A1J4KW39	583	Metalocarboxipeptidasa	sin caracterizar	sin caracterizar	66.2	M14
TRFO_13768	A0A1J4L1E0	594	Metalocarboxipeptidasa	sin caracterizar	sin caracterizar	66.8	M14
TRFO_25661	A0A1J4KA42	602	Metalocarboxipeptidasa	sin caracterizar	Citoplasma	68.4	M14
TRFO_09746	A0A1J4JGW7	537	Metalocarboxipeptidasa	sin caracterizar	sin caracterizar	61.9	M14
TRFO_31829	A0A1J4JQS6	540	Metalocarboxipeptidasa	sin caracterizar	sin caracterizar	61.4	M14
TRFO_39428	A0A1J4JAB9	107	Metalocarboxipeptidasa	sin caracterizar	sin caracterizar	81.4	M14
TRFO_16074	A0A1J4KS86	517	Metalocarboxipeptidasa	sin caracterizar	sin caracterizar	59.8	M14
TRFO_11483	A0A1J4J715	582	Metalocarboxipeptidasa	sin caracterizar	sin caracterizar	67.1	M14
TRFO_22605	A0A1J4KBI7	685	Metalocarboxipeptidasa	sin caracterizar	sin caracterizar	66.4	M14
TRFO_39773	A0A1J4J9X3	507	Metalocarboxipeptidasa	sin caracterizar	sin caracterizar	58	M14
TRFO_40348	A0A1J4J5F6	694	Metalocarboxipeptidasa	sin caracterizar	sin caracterizar	79	M14
TRFO_27199	A0A1J4K665	1029	No se sabe	sin caracterizar	Transmembranal	116.7	M16
TRFO_06704	A0A1J4K124	1017	Metaloendopeptidasa	sin caracterizar	sin caracterizar	110.6	M16
TRFO_12298	A0A1J4IZA7	966	Metaloendopeptidasa	sin caracterizar	sin caracterizar	112.2	M16
TRFO_38272	A0A1J4J8U6	967	Metaloendopeptidasa	sin caracterizar	sin caracterizar	109.6	M16
TRFO_39323	A0A1J4J5L7	1,017	Metaloendopeptidasa	Proteolisis	sin caracterizar	116.5	M16
TRFO_13649	A0A1J4KYK8	443	Metaloendopeptidasa	sin caracterizar	sin caracterizar	49.7	M16
TRFO_21477	A0A1J4KDT0	455	Metaloendopeptidasa	sin caracterizar	sin caracterizar	49.9	M16
Pepd	A0A1J4JXX1	461	AMINOPEPTIDASA UNIONMg	sin caracterizar	sin caracterizar	51.4	M24
TRFO_07951	A0A1J4JMK0	457	AMINOPEPTIDASA UNIONMg	sin caracterizar	sin caracterizar	51.5	M24
TRFO_39919	A0A1J4J929	411	Aminopeptidasa	sin caracterizar	Citoplasma	45.9	M24
MAP2	A0A1J4KMC6	409	Aminopeptidasa	sin caracterizar	sin caracterizar	45.8	M24
TRFO_36646	A0A1J4JIZ2	415	Aminopeptidasa	sin caracterizar	sin caracterizar	46.1	M24
TRFO_42357	A0A1J4KXW9	660	Aminopeptidasa	sin caracterizar	sin caracterizar	73.4	M24
TRFO_27336	A0A1J4K2J7	443	aminopeptidasa	sin caracterizar	sin caracterizar	50.1	M24
TRFO_17550	A0A1J4KSR5	441	aminopeptidasa	sin caracterizar	sin caracterizar	49.8	M24
TRFO_39468	A0A1J4JAM3	676	dipeptidilpeptidasa	sin caracterizar	sin caracterizar	75.5	M49
TRFO_14117	A0A1J4KVN1	387	aminopeptidasa 3	sin caracterizar	sin caracterizar	43.8	M24
TRFO_28697	A0A1J4JZK0	384	aminopeptidasa 4	sin caracterizar	sin caracterizar	43.3	M24

TRFO_02636	A0A1J4KZV6	383	aminopeptidasa 3	sin caracterizar	sin caracterizar	42.4	M24
TRFO_06860	A0A1J4JVL2	985	aminopeptidasa P	sin caracterizar	sin caracterizar	112.4	M24
apeB	A0A1J4JGI6	416	aminopeptidasa	sin caracterizar	sin caracterizar	46.8	M18
TRFO_38450	A0A1J4JCS5	420	aminopeptidasa	sin caracterizar	sin caracterizar	48.2	M18
apeB	A0A1J4KC16	420	aminopeptidasa	sin caracterizar	sin caracterizar	47.1	M18
TRFO_07703	A0A1J4JU33	417	apsartilaminopeptidasa	sin caracterizar	sin caracterizar	45.6	M18
apeB	A0A1J4L139	429	aminopeptidasa	sin caracterizar	sin caracterizar	47.6	M18
apeB	A0A1J4KHM4	409	aminopeptidasa	sin caracterizar	sin caracterizar	44.8	M18
apeB	A0A1J4K099	424	aminopeptidasa	sin caracterizar	sin caracterizar	46.8	M18
TRFO_01015	A0A1J4L6R8	556	METALOPEPTIDASA	sin caracterizar	sin caracterizar	62.1	M20
TRFO_03062	A0A1J4KU34	552	METALOPEPTIDASA	sin caracterizar	Transmembranal	61.8	M20
TRFO_17551	A0A1J4KS78	501	METALOPEPTIDASA	sin caracterizar	sin caracterizar	55.6	M20
TRFO_03192	A0A1J4KWS0	517	dipeptidilpeptidasa	hidrolasa		57.7	M20
TRFO_18033	A0A1J4KRY6	514	Hidrolasa	Proteolisis	sin caracterizar	58	M20
TRFO_43126	A0A1J4KX61	495	Hidrolasa	Proteolisis	sin caracterizar	53.8	M20
TRFO_20716	A0A1J4KJT1	428	PEPTIDASA			47.2	M20
TRFO_38877	A0A1J4J6T6	473	Hidrolasa	sin caracterizar	sin caracterizar	51.6	M20
TRFO_23813	A0A1J4KAC7	505	Hidrolasa	sin caracterizar	sin caracterizar	55.3	M20
TRFO_28052	A0A1J4K466	892	metalopectidasa	sin caracterizar	Transmembranal	102.8	M28
TRFO_24604	A0A1J4KC46	824	metalopectidasa	sin caracterizar	Transmembranal	94.2	M28
TRFO_39614	A0A1J4JA78	788	metalopectidasa	sin caracterizar	Transmembranal	88.5	M28
TRFO_22224	A0A1J4KI25	779	metalopectidasa	sin caracterizar	Transmembranal	88.2	M28
TRFO_15130	A0A1J4KXP3	770	PEPTIDASA	sin caracterizar	Transmembranal	87.4	M28
TRFO_14442	A0A1J4KZS3	227	METALOPEPTIDASA	sin caracterizar	Proteosoma	25.7	M67
TRFO_16400	A0A1J4KUI3	555	METALOPEPTIDASA	sin caracterizar	sin caracterizar	64.6	M1
TRFO_08022	A0A1J4JSU7	839	AMINOPEPTIDASA	sin caracterizar	sin caracterizar	95.4	M1
TRFO_10315	A0A1J4JE06	928	AMINOPEPTIDASA	sin caracterizar	Transmembranal	105.2	M1
TRFO_18726	A0A1J4KKS7	632	metalopectidasa	sin caracterizar	sin caracterizar	72.1	M1
prIC	A0A1J4K6M7	692	metalopectidasa	sin caracterizar	sin caracterizar	79.9	M3
TRFO_11649	A0A1J4J2P6	721	metalopectidasa	sin caracterizar	sin caracterizar	84.8	M3
TRFO_06163	A0A1J4K4X6	408	metalopectidasa	sin caracterizar	Transmembranal	47.1	M48
TRFO_40472	A0A1J4J6D9	436	metalopectidasa	sin caracterizar	Transmembranal	49.3	M49
Ctob_012752	A0A0M0K6K7	719	metalopectidasa	Adhesión celular	Transmembranal	79.8	M8
DPP3	A0A1J4JAV9	648	dipeptidilpeptidasa	sin caracterizar	sin caracterizar	73.4	M49
TRFO_35845	A0A1J4JI00	423	aminopeptidasa	sin caracterizar	sin caracterizar	46.5	M18
TRFO_16015	A0A1J4KVR6	426	aminopeptidasa	sin caracterizar	sin caracterizar	47	M18
TRFO_13295	A0A1J4KYH7	433	aminopeptidasa	sin caracterizar	sin caracterizar	47.7	M18
TRFO_34863	A0A1J4JJY8	596	aminopeptidasa	sin caracterizar	sin caracterizar	69.2	M1
TRFO_09212	A0A1J4JKM2	576	aminopeptidasa	sin caracterizar	sin caracterizar	66.4	M1
TRFO_01364	A0A1J4KC16	420	aminopeptidasa	sin caracterizar	sin caracterizar	47.1	M18
TRFO_12570	A0A1J4L139	429	aminopeptidasa	sin caracterizar	sin caracterizar	47.6	M18
TRFO_22079	A0A1J4KHM4	409	aminopeptidasa	sin caracterizar	sin caracterizar	44.8	M18
TRFO_08899	A0A1J4JGQ8	424	aminopeptidasa	sin caracterizar	sin caracterizar	47.4	M18
TRFO_33909	A0A1J4JLM5	561	aminopeptidasa	sin caracterizar	sin caracterizar	63	M18
TRFO_08328	A0A1J4JR04	392	aminopeptidasa	sin caracterizar	sin caracterizar	44.9	M18
TRFO_30764	A0A1J4JSW3	420	aminopeptidasa	sin caracterizar	sin caracterizar	27.2	M18

TRFO_17395	A0A1J4KMY5	364	aminopeptidasa	sin caracterizar	sin caracterizar	41.8	M18
TRFO_22088	A0A1J4KIM5	408	aminopeptidasa	sin caracterizar	sin caracterizar	46.2	M18
TRFO_02863	A0A1J4L0Q7	388	aminopeptidasa	sin caracterizar	sin caracterizar	45.2	M18
TRFO_02482	A0A1J4L222	304	Metalopeptidasa	sin caracterizar	sin caracterizar	34.8	M67

Anexo II.

PBS pH7

NaCl 8g

KCl 0.2g

Na₂HPO₄ 0.05g

KH₂PO₄ 0.2g

Buffer de corrida 10X

Trizma base 30.2g

Glicina 144g

SDS 10g

H₂O 1L

TBE 1X

Trizma base 10.8g

Ácido bórico 5.5g

EDTA 0.93g

TDSET

Trizma base 121.1g

DOC 10%

SDS 20%

EDTA 0.5M

Tritón 5mL

Coomassie R-250

Metanol 500mL

Azul coomassie 0.500g

Ácido acético glacial 100mL

H₂O 400mL

Persulfato de amonio (PSA 10%)

PSA 0.040g

H₂O 400μL

Glicina 0.2M

Glicina 0.075g

H₂O 5mL

DOC 10%

DOC 1g

H₂O 10mL

Solución decolorante

Ácido acético 50mL

Metanol 165 mL

H₂O 785mL

Gelatina 9%

Gelatina 0.0324g

H₂O 10mL

Tritón 2.5%

Tritón 25mL

H₂O 925mL

Buffer 2X

Azul de bromofenol 0.01g

B-Mercaptoetanol 50μL

H₂O 1mL

Acrilamida 30%

Acrilamida 29.2g

Bisacrilamida 0.8g

H₂O 100mL

Medio TYM pH 6.2

Bacto triptone 20g

Extracto de levadura 10g

Maltosa 5g

Cisteína 1g

Ácido ascórbico 0.2g

K₂HPO₄ 0.8g

KH₂PO₄ 0.8g

Buffer de activación

Tris 1.57g

NaCl 1.75g

NaN₃ 0.004g

ZnCl₂ 0.272g

EDTA 50mM

EDTA 0.0730g

H₂O 5mL

EGTA 50mM

EGTA 0.0951

H₂O 5mL

1-10 Fenantrolina 50mM

1-10 Fenantrolina 0.045g

H₂O 5mL