



COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA

MAESTRÍA EN CIENCIAS GENOMICAS

**Evaluación del efecto del Zn^{2+} en la adhesión y citotoxicidad de
Trichomonas vaginalis durante su interacción con células DU145**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS GENOMICAS

Presenta

QFB. EDGAR YEBRÁN VILLEGAS VÁZQUEZ

Directora de Tesis

Dra. María Elizbeth Álvarez Sánchez

México, D.F. diciembre 2015

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.

Tutora

Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez

Profesor-Investigador del Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Asesores

Dr. Noé Duran Figueroa

Profesor Investigador Titular "A"

Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología

Instituto Politécnico Nacional

Dr. Mauricio Castañón Arreola

Profesor-Investigador del Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dr. José de Jesús Olivares Trejo

Profesor-Investigador del Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

M. en C. José Luis Villalpando Aguilar

cDr. Doctorado del posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 1 del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México bajo la dirección de la Dra. María Elizbeth Álvarez Sánchez y bajo la asesoría de los Drs. Noé Duran Figueroa, Mauricio Castañón Arreola, José de Jesús Olivares Trejo y el M. en C. José Luis Villalpando Aguilar.

El proyecto fue financiado con fondos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el número de proyecto: 83808

Agradecimientos

La vida se encuentra llena de alegrías, tristezas , triunfos y derrotas; vivimos conociendo y experimentando distintos caminos de la vida, tomamos decisiones, aceptamos consecuencias y continuamos viviendo para buscar la felicidad . Tenemos personas que son importantes en la vida y conocemos personas que se hacen importantes en la misma, se convierte en motivación, en ejemplo a seguir, en parte esencial de la vida.

Gracias a ustedes mi familia por ser lo más maravilloso del mundo

A mi madre por ser el pilar más fuerte en mi vida, mi motivación, mi fuerza, por siempre estar a mi lado.

A mi padre por ser siempre ese apoyo incondicional, por enseñarme el buen camino de la vida.

A mi hermana por ser la motivación para seguir aprendiendo.

A mi primo Ronald por enseñarme que a tan corta edad se puede soñar en grande.

A la Dra. Elizabeth por aceptarme en su grupo de trabajo y por todo su apoyo.

A mi sensei y amigo José Luis por ser un gran asesor, por motivarme, enseñarme, por fomentar en mí lo bonito que es la ciencia, por ser siempre humilde y sobre todo por ser mi amigo.

A mi novia Itzel por estar conmigo, por ser una maravillosa persona , ser mi motivación y parte importante en mi vida.

A mi generación Jorge, Benjamín y Eduardo por compartir buenos momentos.

Agradezco a todos y cada uno de los que formaron parte en esta aventura.

Gracias

“La perseverancia te lleva a conseguir cosas inimaginables”

Dedicatoria

A mi familia por todo su amor, su esfuerzo, su apoyo incondicional, por estar siempre en todo momento, por no permitirme bajar los brazos, infinitamente gracias por formar parte de mi vida y ser excelentes padres.

A mi novia Itzel por ser tan increíble, apoyarme siempre y por permitirme entrar en su vida.

A mi amigo José Luis "hotch" por tu enseñanza y apoyo incondicional.

Les dedico este gran logro que sin ustedes no hubiera sido posible.

Índice	iii
Lista de abreviaturas	V
Lista de figuras	lx
Lista de tablas	x
Resumen	1
1. Introducción	2
1.1 Tricomoniasis	2
1.2 Epidemiología	2
1.3 Síntomas asociados a Tricomoniasis	4
1.4 Tratamiento	4
1.5 Ciclo de vida	5
2. Interacción hospedero-parásito	7
3. Morfología	10
4. Diversidad genética en <i>T. vaginalis</i>	12
5. Mecanismos de virulencia	12
5.1. Citoaderencia de <i>T. vaginalis</i>	13
5.1.2. Proteínas de superficie en <i>T. vaginalis</i>	14
5.2. Citotoxicidad en <i>T. vaginalis</i>	15
5.2.1. Citotoxicidad en presencia de Zn^{2+}	16
5.2.2. Proteinasa en <i>T. vaginalis</i>	17
6. Micronutrientes	18
6.1. Fe^{2+}	18
6.1.1. El efecto del hierro y el contacto celular en <i>T. vaginalis</i>	18
6.1.2. Mecanismo de regulación génica por hierro en <i>T. vaginalis</i>	19
6.2. Zn^{2+}	20
6.2.1. El Zn^{2+} en el hombre	21
6.2.2. El efecto del Zn^{2+} en <i>T. vaginalis</i>	21
7. Estado del arte	22
8. Justificación	24
9. Hipótesis	25
10. Objetivo general	25
10.1. Objetivos específicos	25
11. Estrategia Experimental	26

11.1. Materiales y métodos	30
11.1.2. Cultivo de <i>T. vaginalis</i>	30
11.1.3. Cultivo de células	30
11.1.4. Microscopia Electrónica de Barrido	30
11.1.5. Ensayo de citotoxicidad	31
11.1.6. Ensayo de Adhesión	32
11.7.1. Extracción de RNA de <i>T. vaginalis</i>	32
11.1.8. Síntesis de cDNA	33
11.1.9. RT-PCR	33
12. Resultados	36
12.1. Morfología del aislado HGMN01 de <i>T. vaginalis</i> en presencia y ausencia de Zn²⁺.	36
12.1.2. Interacción de células DU145 con <i>T. vaginalis</i> en presencia de Zn²⁺	39
12.2. Efecto del Zn²⁺ en la adhesión del aislado HGMN01 de <i>T. vaginalis</i> durante la interacción con células DU145	41
12.3. Efecto del Zn²⁺ en la citotoxicidad de <i>T. vaginalis</i> en células DU145 y HeLa	44
12.4. Efecto del Zn²⁺ en la expresión de genes de dos aislados de <i>T. vaginalis</i> durante la interacción con células DU145	52
13. Discusión	61
14. Conclusiones	72
15. Perspectivas	72
16. Bibliografía	73
17. Apéndice	80
18. Anexos	83
Anexo1. Fotomicrografías de células DU145, <i>T. vaginalis</i> y su interacción en presencia y ausencia de Zn²⁺	84
Anexo 2. Fotomicrografías de la interacción de <i>T. vaginalis</i> hacia células DU145 en presencia y ausencia de Zn²⁺	87
Anexo 3. Artículo presentado en el V Foro Nacional de Divulgación Científica y Tecnológica Xalapa, Veracruz..	89

Lista de abreviaturas

AP65	Proteína de adhesión de 65KDa
AP33	Proteína de adhesión de 33KDa
AP51	Proteína de adhesión de 51KDa
AP23	Proteína de adhesión de 23KDa
AP120	Proteína de adhesión de 120KDa
BM	Membrana basal
Bsp-like	Familia de proteínas de superficie ricas en leucina
cbp	Cuanto baste para
cDNA	Acido desoxirribonucleico complementario
CNCD147	Aislado de <i>Trichomonas vaginalis</i> proveniente de mujer
CPs	Cisteín Proteinasa
CP30	Cisteín Proteinasa de 30KDa
CDF	Factor de desprendimiento celular
CHO	Línea celular de ovario de hámster
DNA	Acido desoxirribonucleico
DHT	Dihidroesterona
DMEM	Duelbecco's Modified Eagle Medium
DU145	Línea celular de cáncer de próstata
dNTPs	Deoxinucleotidos tri-fosfato
GP63	Familia de proteínas de superficie con actividad proteolítica
Fe ²⁺	Hierro
HeLa	Células humanas de cáncer cervical

HGMN01	Aislado de <i>Trichomonas vaginalis</i> proveniente de hombre
HN	Aislado de <i>T. vaginalis</i> proveniente de hombre crecido en condiciones normales
HNN	Aislado de <i>T. vaginalis</i> proveniente de hombre crecido en condiciones normales en medio de interacción normal
HNZ	Aislado de <i>T. vaginalis</i> proveniente de hombre crecido en condiciones normales en medio de interacción con Zn^{2+}
HZ	Aislado de <i>T. vaginalis</i> proveniente de hombre en presencia de Zn^{2+}
HZN	Aislado de <i>T. vaginalis</i> proveniente de hombre en presencia de Zn^{2+} en medio de interacción normal
HZZ	Aislado de <i>T. vaginalis</i> proveniente de hombre en presencia de Zn^{2+} en medio de interacción con Zn^{2+}
ITS	Infección de Transmisión Sexual
Inr	Elemento iniciador de la transcripción
kDa	Kilodaltones
MN	Aislado de <i>T. vaginalis</i> proveniente de mujer crecido en condiciones normales
MNN	Aislado de <i>T. vaginalis</i> proveniente de mujer crecido en condiciones normales en medio de interacción normal
MNZ	Aislado de <i>T. vaginalis</i> proveniente de mujer crecido en condiciones normales en medio de interacción con Zn^{2+}
MZ	Aislado de <i>T. vaginalis</i> proveniente de mujer en presencia de Zn^{2+}
MZN	Aislado de <i>T. vaginalis</i> proveniente de mujer en presencia de Zn^{2+} en medio de interacción normal
MZZ	Aislado de <i>T. vaginalis</i> proveniente de mujer en presencia de Zn^{2+} en medio de interacción con Zn^{2+}
MEC	Matriz extracelular
μ l	Microlitro

μm	Micrómetro
min	Minutos
mM	Milimolar
mg	Miligramos
ml	Mililitros
nm	Nanómetros
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pmol	pico molar
rpm	Revoluciones por minuto
RNA	Ácido ribonucleico
RNA pol II	RNA polimerasa II
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscriptasa
SC	Suero de caballo
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
TA	Temperatura ambiente
TM	Dominio transmembranal
TYM	Tripticasa-extracto de levadura y Maltosa
TYM-DMEM	Medio de interacción normal
TYM-DMEM-Zn ²⁺	Medio de interacción en presencia de Zn ²⁺ (1.6mM)
TvBsp-625	<i>T. vaginalis</i> Proteína de superficie rica en leucinas
TvCP20	<i>T. vaginalis</i> Cisteín Proteinasa de 20KDa
TvCP25	<i>T. vaginalis</i> Cisteín Proteinasa de 25KDa

TvCP30	Cisteín Proteinasa de 30KDa de <i>T. vaginalis</i>
TvCP39	Cisteín Proteinasa de 39KDa de <i>T. vaginalis</i>
TvCP65	Cisteín Proteinasa de 65KDa de <i>T. vaginalis</i>
TvCP70	Cisteín Proteinasa de 70KDa de <i>T. vaginalis</i>
TvFIM1	fimbrina 1 de <i>T. vaginalis</i>
TvGP63	Glicosilfosfatidilinositol de 63 KDa de <i>T. vaginalis</i>
TvGAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa de <i>T. vaginalis</i>
TvENO-1	Enolasa de <i>T. vaginalis</i>
TvLPG-like	Lipofosfoglicanos de <i>T.vaginalis</i>
TvMP50	Metaloproteinasa de 50KDa de <i>T. vaginalis</i>
UTR	Región no traducida
VECs	Células del epitelio vaginal
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
Zn ²⁺	Zinc

Lista de Figuras

Figura 1. Epidemiología de tricomoniasis

Figura 2. Ciclo de vida de *Trichomonas vaginalis*

Figura 3. Parásitos extracelulares

Figura 4. Morfología de *Trichomonas vaginalis*

Figura 5. Morfología del aislado HGMN01 de *T. vaginalis* en ausencia de Zn^{2+}

Figura 6. Morfología del aislado HGMN01 de *T. vaginalis* en presencia de Zn^{2+}

Figura 7. Morfología de la interacción de *T. vaginalis* (HGMN01) con células prostáticas DU145 en presencia de Zn^{2+}

Figura 8. Interacción de *T. vaginalis* (HGMN01) con células prostáticas DU145 en presencia de Zn^{2+} .

Figura 9. Efecto del Zn^{2+} en la adhesión del aislado HGMN01 de *T. vaginalis* durante su interacción con células prostáticas DU145

Figura 10. Efecto del Zn^{2+} en la citotoxicidad del aislado HGMN01 de *T. vaginalis* durante su interacción con células HeLa y células DU145

Figura 11. Efecto del Zn^{2+} en la citotoxicidad del aislado CNCD147 de *T. vaginalis* durante su interacción con células HeLa y células DU145

Figura 12. Análisis comparativo del efecto del Zn^{2+} en la citotoxicidad de los aislados CNCD147 y HGMN01 en interacción con sus células hospederas.

Figura 13. Análisis semicuantitativo de la expresión de los transcritos de *T. vaginalis* aislado HGMN01

Figura 14: Análisis semicuantitativo de la expresión de los transcritos de *T. vaginalis* aislado HGMN01 durante la interacción con células DU145

Figura 15. Análisis semicuantitativo de la expresión de los transcritos de *T. vaginalis* aislado CNCD147

Figura 16. Análisis semicuantitativo de la expresión de los transcritos de *T. vaginalis* aislado CNCD147 expresados durante la interacción con células DU145

Figura 17: Análisis comparativo de la expresión de los transcritos de dos aislados de *T. vaginalis* expresados durante la interacción con dos líneas celulares diferentes.

Figura 18: Evaluación de la especificidad de los oligonucleótidos *enolasa* y *gapdh* en células DU145

Lista de Tablas

Tabla1. Oligonucleótidos usados para análisis de RT-PCR

Resumen

La tricomoniasis es una enfermedad de transmisión sexual causada por un protozoo flagelado denominado *Trichomona vaginalis*. La mujer es la principal hospedero para que el parásito colonice y cause la sintomatología, debido a que en el microambiente se encuentra presente el Fe^{2+} el cual favorece el establecimiento de la infección del parásito, sin embargo, *T. vaginalis* también afecta al hombre el cual es el principal portador asintomático de este parásito, debido a la presencia de Zn^{2+} en el tracto urogenital.

La patogenicidad de este parásito es un evento multifactorial en el que se involucran diversas moléculas que participan como factores de virulencia. El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto del Zn^{2+} en la citotoxicidad, adhesión, morfología y expresión de los genes *ap65*, *ap33*, *gapdh*, *enolasa*, *tvcp39*, *mp50* y *tvfim1* de *T. vaginalis* durante la interacción con células prostáticas DU145. En este trabajo se utilizó el aislado HGMN01 de *Trichomonas vaginalis* correspondiente a un paciente masculino con tricomoniasis y como control el aislado CNCD147 correspondiente a un paciente femenino con tricomoniasis. Los resultados mostraron que durante el evento de citotoxicidad, el aislado CNCD147 en presencia de Zn^{2+} disminuye la citotoxicidad sobre las células prostáticas DU145 y células HeLa. En el caso de la adhesión, la presencia del Zn^{2+} disminuye la adhesión de este parásito hacia las células DU145. El cambio morfológico no se observó y la expresión de genes que participan en propiedades de virulencia tales, como *ap65*, *ap33*, *enolasa*, *tvcp39*, *mp50* y *tvfim1* fueron afectadas negativamente excepto para el gen *gapdh* en el aislado HGMN01 en presencia de Zn^{2+} durante su interacción con células DU145 en el que se observó una expresión positiva. El Zn^{2+} tiene un efecto negativo sobre la adhesión, citotoxicidad de este parásito, la morfología no se vio afectada por la presencia del catión y la expresión de genes presentó un efecto negativo durante la interacción y la presencia de Zn^{2+} . Aportando una visión de cómo el microambiente masculino puede estar afectando el comportamiento del parásito.

1. Introducción

1.1. Tricomoniasis

Trichomonas vaginalis es un parásito flagelado, microaerófilo perteneciente a *Phylum Parabasalia*. *T. vaginalis* es el agente causal de la tricomoniasis humana, una infección de transmisión sexual (ITS) no viral; infecta el tracto urogenital y la cavidad vaginal, enfrentando una diversidad microambiental para su supervivencia, siendo el humano el principal reservorio de este parásito, [Marczak y cols. 1983] esta enfermedad representa uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial.

1.2. Epidemiología

Anualmente se han reportado alrededor de 250 millones de casos de tricomoniasis a nivel mundial [WHO 2005]. En el 2008 se presentaron 276.4 millones de casos en adultos de entre 19 y 49 años de edad, con una mayor prevalencia en mujeres [Rowley R. y cols., 2012]. En el hombre es difícil determinar su incidencia, sin embargo, se ha reportado que en hombres con parejas infectadas la incidencia es de 15% a 73% [Schwebke y cols. 2003], [Sena y cols. 2007]. La infección en el hombre puede ser dosificada de 3 a 12 veces más rápido que en mujeres permaneciendo o no en tratamiento [Schmid y cols. 2001]. En México, durante el año 2013 se reportaron 101,200 casos de tricomoniasis y en 2014 se reportaron 77,280 casos, siendo Veracruz, Puebla y el Estado de México los que reportaron el mayor número de casos, para el año 2015 hasta la semana 28 se presentaron 32,774 casos en mujeres y 1037 en hombres, de los cuáles, el 97% corresponde a mujeres y solo el 3% a hombres en los 3 años. **(Figura 1)** [Epidemiológica 2015].

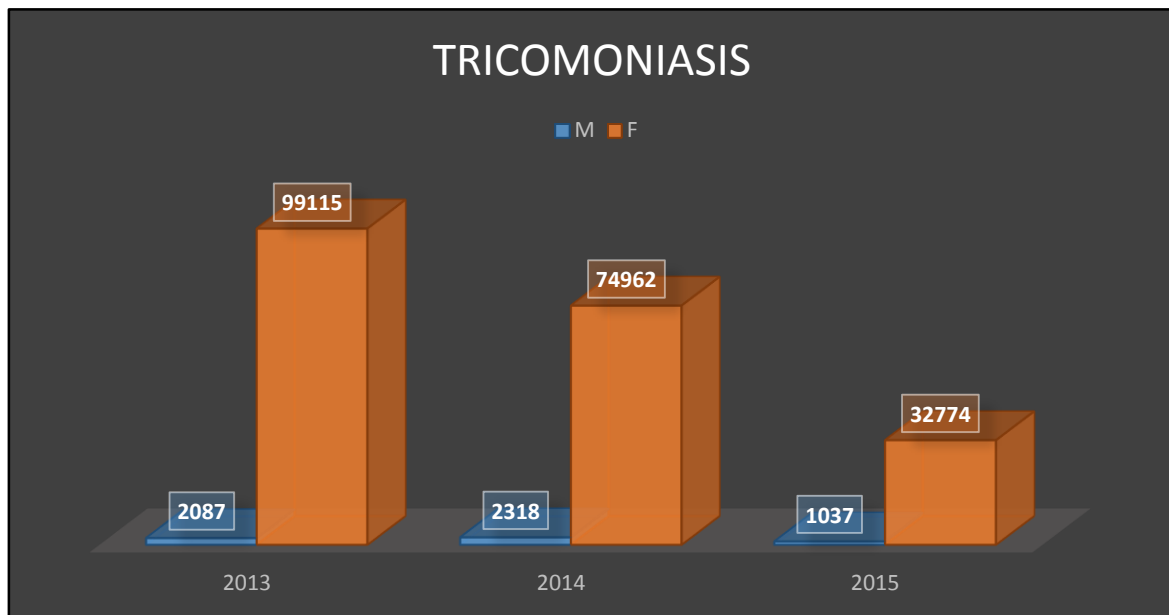


Figura 1. Epidemiología de la tricomoniasis durante los años 2013, 2014 y la semana 28 del 2015. La barra en azul representa el número de casos del sexo masculino y la barra en naranja representa el número de casos del sexo femenino

1.3. Síntomas asociados a la tricomoniasis

Los pacientes que presentan la tricomoniasis pueden presentar síntomas variados; en mujeres puede causar prurito, ardor, vaginitis o uretritis, secreción seropurulenta vaginal de mal olor, colpitis malcularis (cérvix de fresa) y eritemas [Rein y cols. 1975]. En mujeres embarazadas puede presentar complicaciones como ruptura de las membranas amnióticas, infantes de bajo peso al nacer, parto prematuro [Cotch y cols. 1997] e infertilidad [El-Shazly y cols. 2001]. La tricomoniasis está implicada como un factor en la predisposición de la transmisión del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) [Smith y cols. 2001], así como la predisposición a cáncer cervical [Lehker y cols. 2000].

En el caso del hombre, la infección es asintomática y autolimitante, sin embargo se describen casos donde se presentan complicaciones tales como uretritis, prostatitis, epididimitis y está involucrado en el desarrollo de cáncer prostático [Langley y cols. 1987] e infertilidad [Tuttle y cols. 1977]. Existen factores solubles o metabolitos que son producidos por el parásito lo que provoca una disminución en la movilidad y viabilidad de los espermatozoides [Han y cols. 2004].

1.4. Tratamiento

En el año 1959 existían preparaciones vaginales tópicas contra la tricomoniasis aliviando la sintomatología [Lossick y cols. 1991]. En ese mismo año se encontró un derivado de los nitromidazoles conocido como metronidazol, que es el medicamento por elección para tratar la tricomoniasis [Cosar y cols. 1959]. El tratamiento estándar es de una sola dosis de 2g por vía oral o de 2 dosis diarias de 5mg por 7 días, con una tasa de éxito que oscila de entre 90 y 95% cuando la pareja sexual es tratada simultáneamente (Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, CDC 2002). Existe otro derivado de los nitromidazoles llamado Tinidazol el cual contiene un grupo sulfona; la dosis es de 2g en la mujer y de 1 a 1.5g en el hombre, la diferencia con el metronidazol es su mayor solubilidad lipídica por lo que es un inhibidor efectivo del ADN. Actualmente existen nuevas moléculas imidazolicas mono y bi-aciladas, así como compuestos lactamicos con cadenas laterales más

hidrofóbicas que el metronidazol, lo que le proporciona una actividad superior [Vazquez y cols. 2001].

1.5. Ciclo de vida

T. vaginalis se transmite de persona a persona por contacto sexual, se presenta en forma de trofozoito uninucleado pleomórfico y carece de la forma de quiste, sin embargo, se ha descrito la formación de pseudoquiste bajo estrés ambiental [Ribeiro y cols. 2002]. El parásito se divide por fisión binaria comenzado por la división nuclear, división del blefaroplasto y de los demás organelos, originando al final dos células hijas en un periodo de entre 4 y 28 días [Gomez-Conde y cols. 2000]. Los parásitos se establecen en la mucosa uretral, vaginal y prostática y se alimentan de las células del huésped (**Figura 2**), bacterias, componentes solubles y eritrocitos [Honigberg 1990].

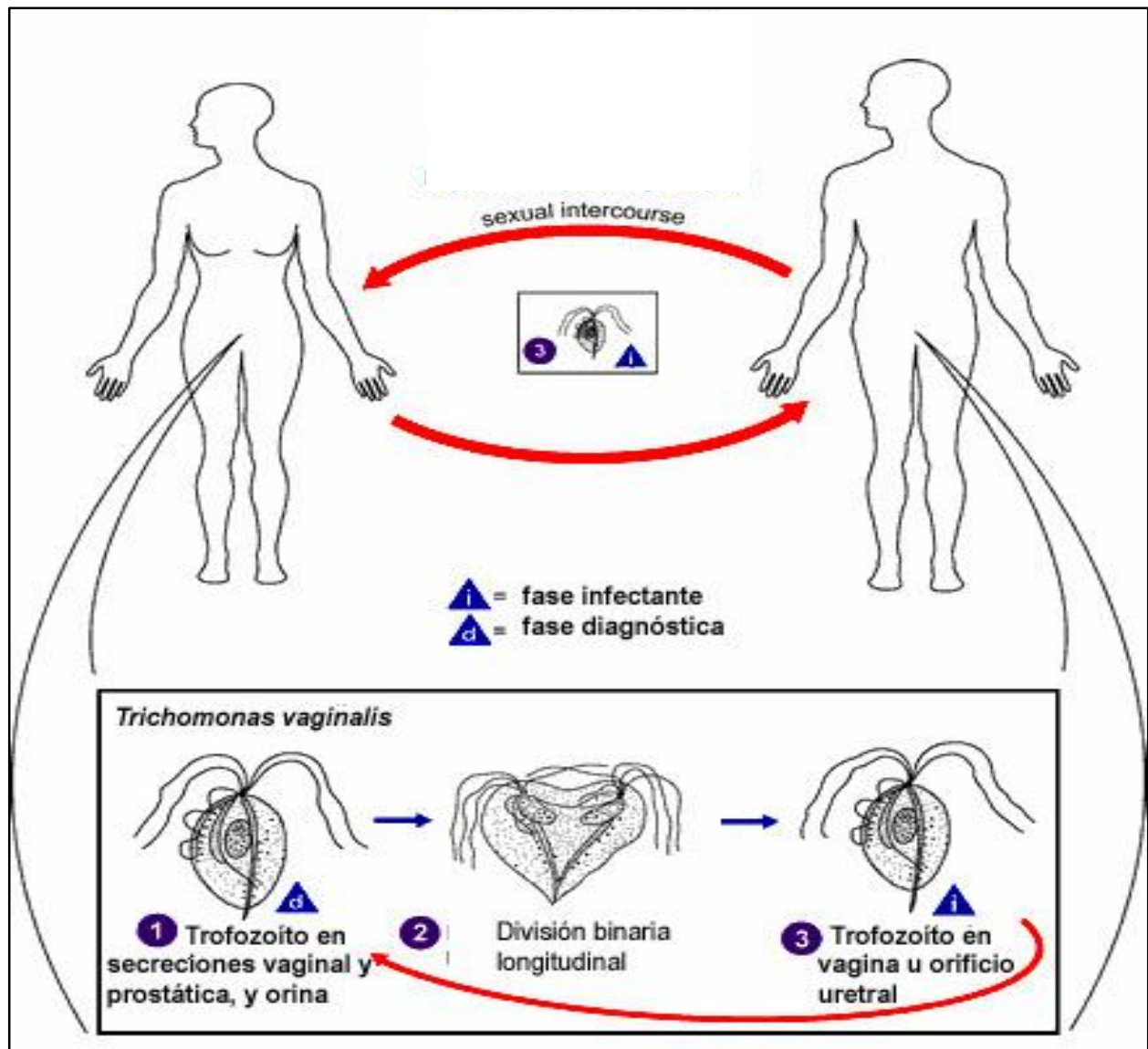


Figura 2. Ciclo de vida de *Trichomonas vaginalis*. 1. Trofozoito 2. División por fisión Binaria. 3. Trofozoito en secreciones vaginales o prostáticas. (Figura tomada de Tiger Database www.tigr.or/tdb/e2k1/tvg/intro.shtml)

2. Interacción hospedero-parásito

La matriz extracelular (MEC) está presente en todos los tejidos y provee un andamio físico para los componentes celulares, así como señales bioquímicas requeridas para la morfogénesis, diferenciación y homeostasis del tejido [Piña-Vázquez y cols. 2012]. La matriz extracelular está compuesta por proteínas fibrosas y proteoglicanos, siendo las principales proteínas el colágeno, elastina, fibronectina y laminina [Bruckner 2010], [Van Agtmael y cols. 2010].

La pared vaginal está conformada de un epitelio externo estratificado y tejido conectivo adyacente, las hormonas del ciclo menstrual controla el crecimiento y diferenciación de las células del epitelio vaginal, el epitelio es el tejido formado por una o varias capas de células unidas entre sí, compuesta por una red de macromoléculas que comprende la membrana basal (BM), matriz extracelular tales como fibronectina y laminina [Alderete y cols. 2002]. La colonización de *T. vaginalis* en el epitelio del tracto urogenital humano depende de múltiples mecanismos como son: unión y degradación de componentes, mucosa y proteínas de la matriz extracelular, unión a células del huésped y células del sistema inmune, la fagocitosis de bacterias vaginales y células (VEC, eritrocitos), endocitosis de proteínas del huésped y degradación de inmunoglobulinas.

La naturaleza de la mucosa durante la infección con *T. vaginalis*, puede ser el resultado de la infiltración del parásito al espacio de membrana extracelular y membrana basal, [Harp y cols. 2011], el parásito puede acoplarse a la superficie uniéndose a fibronectina mediante un receptor altamente específico; a través de la proteína gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) una proteína de superficie asociada a fibronectina [Alderete y cols. 2002].

Se han realizado estudios *in silico* se han realizado para buscar posibles candidatos de unión a superficie que puedan degradar la MEC, a este respecto se ha encontrado un total de 122 proteasas transmembranales en el genoma de *T. vaginalis* [Hirt y cols. 2007]. Otros estudios han mostrado tres proteínas con actividad proteolítica que degradan componentes de la MEC: CP30 y CP65 que degradan fibronectina y colágeno IV y CP39

degrada colágeno I, II IV y V así como fibronectina [Alvarez-Sánchez y cols. 2000, Mendoza-Lopez y cols. 2000, Hernández-Gutiérrez y cols. 2004] **(Figura 3)**. En la interacción hospedero-parásito se encuentran involucradas una diversidad de proteínas capaces de generar un contacto con la célula del hospedero para generar un daño y adaptación al ambiente estableciéndose para su supervivencia.

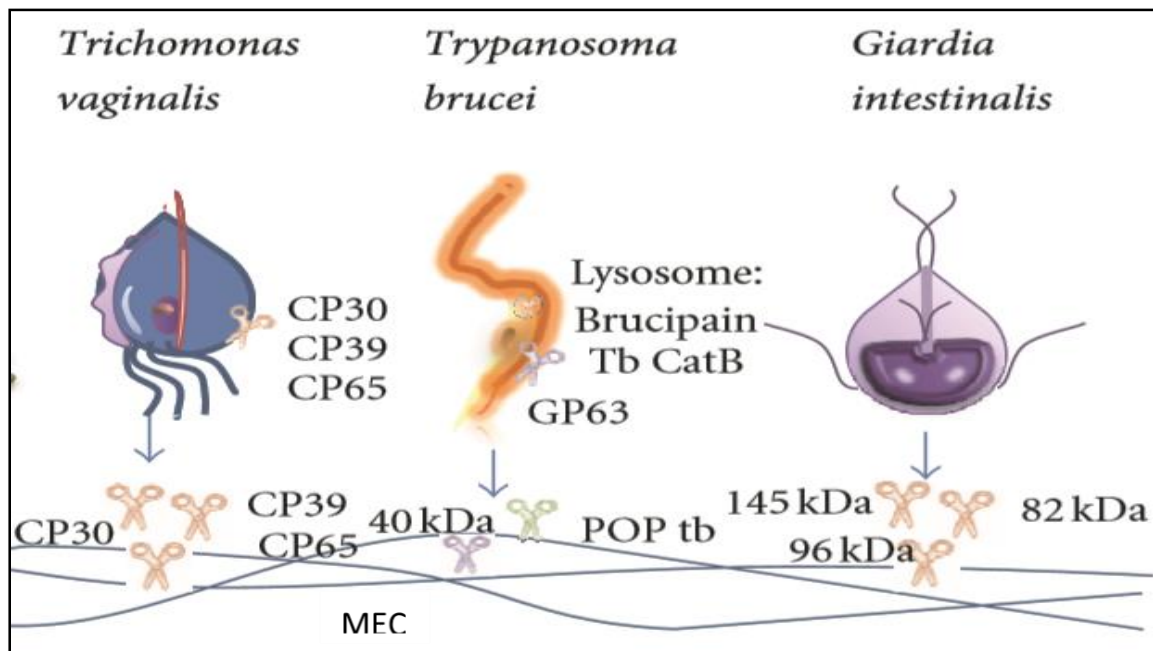


Figura 3. Parásitos extracelulares. Actividad proteolítica de *Trichomonas vaginalis*, *Trypanosoma brucei* y *Giardia Intestinalis*. CPs: cistein proteasas, tijeras rosas; MMP: metaloproteasas, tijeras moradas; SPs: serin proteasas, tijeras verdes; POP: prolil-oligopeptidasa; CatB: catepsina B MEC: Matriz extracelular. [Piña-Vázquez y cols. 2012]

3. Morfología

T. vaginalis presenta forma ovoide y un tamaño promedio de 10 μm de largo por 7 μm de diámetro y las condiciones fisicoquímicas del medio altera su morfología, [Petrin y cols. 1998] presentando una forma ameboidea y una forma esférica; tiene una superficie rugosa con numerosas depresiones en forma de “cráter”, posee 5 flagelos, 4 localizados en la parte anterior y un flagelo recurrente adosado a la membrana ondulante asociado a una estructura denominada costa y una estructura hialina denominada axostilo que comienza en el núcleo y divide al parásito longitudinalmente, dándole al parásito motilidad [Ovcinnikov y cols. 1975]. El citoesqueleto de *T. vaginalis* se compone de túbulina y fibras de actina; presenta un núcleo grande, ovalado y excéntrico localizado en su porción anterior rodeado por una envoltura nuclear, en el citoplasma se encuentran un sistema vacuolar rico en fagosomas así como el enriquecimiento de carbohidratos [Shawebke., 2004]. Además, posee retículo endoplásmico liso y rugoso, aparato de Golgi, tiene gránulos paraxostilares y paracostales denominados hidrogenosoma, gránulos de glucógeno, ribosomas libres y adosados al retículo endoplásmico [Petrin y cols. 1998].

En cultivos axénicos líquidos su forma es ovoide, sin embargo, el parásito sufre un cambio al adherirse al plástico o al tener contacto con el epitelio vaginal formando lamelipodios y pseudópodos que interdigitan con los contornos de la célula epitelial cambiando a una forma ameboidea (**Figura 4 A, B, C**), incrementando la expresión de adhesinas y liberando quimioatrayentes para la atracción de más parásitos, revelando un efecto citopático del parásito en el epitelio [Arroyo y cols. 1993]. El parásito también puede adherirse *in vitro* a células prostáticas DU145 causando un daño a las células, sin embargo, no existe un cambio morfológico cuando *T. vaginalis* se adhiere a las células prostáticas como ocurre con las células del epitelio vaginal [Vazquez-Carrillo y cols. 2011] (**Figura 4 D**).

En ausencia de hierro en el medio de cultivo el parásito reduce su crecimiento y cambia de su forma ovoide y ameboide a una forma esférica, seguido de la internalización de los flagelos y la invaginación del axostilo [De Jesus y cols. 2007].

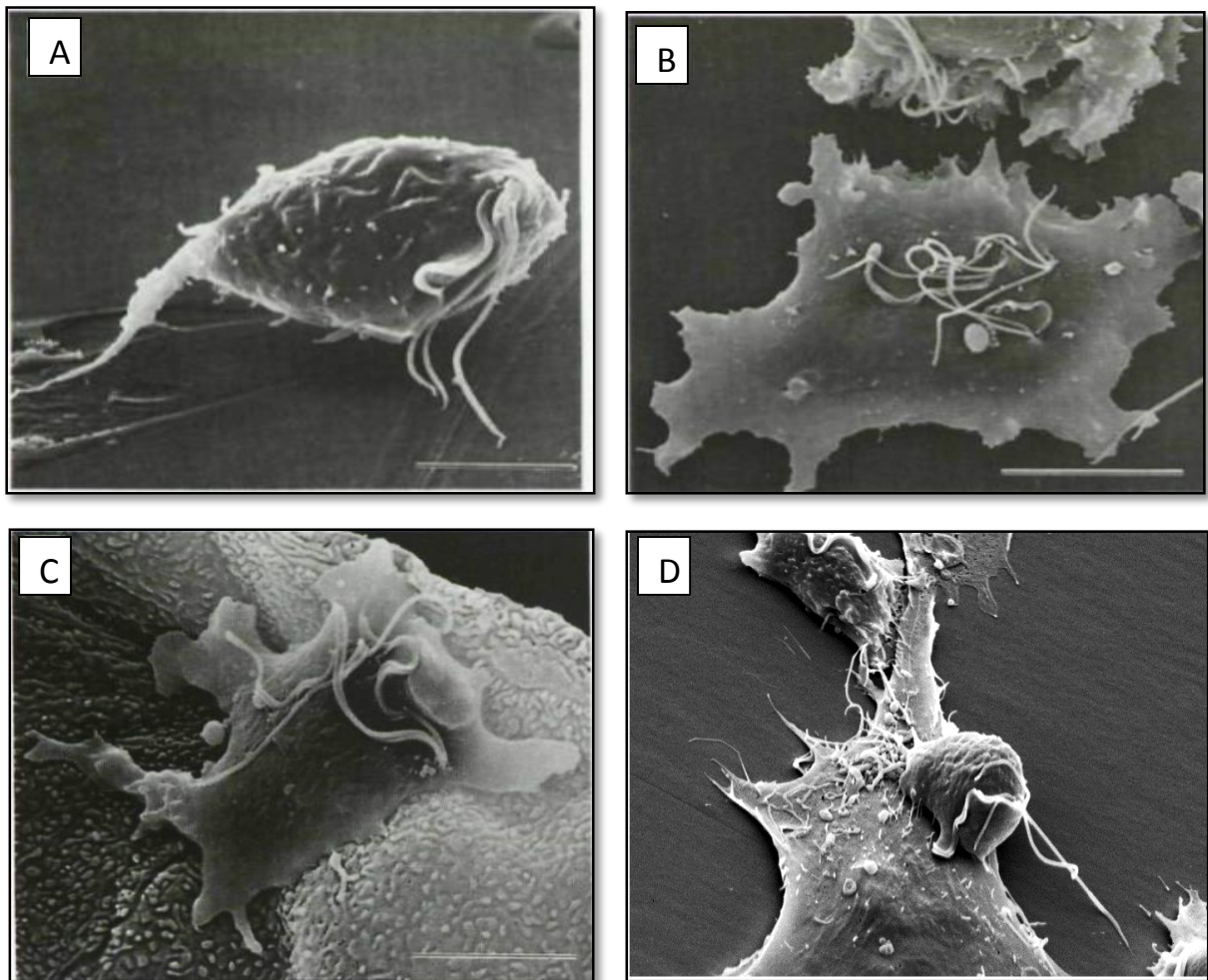


Figura 4. Morfología de *Trichomonas vaginalis*. **A)** Morfología del aislado T106 en fase logarítmica de cultivo en medio de cultivo TYM (5µm). **B)** Morfología de *T.vaginalis* al contacto con plástico (10µm). **C)** Transformación morfológica del parásito al contacto con células VEC's presentando una forma ameboide, membrana ondulante y flagelos (5µm). **D)** Morfología del aislado CNCD147 de *T. vaginalis* al contacto con células prostáticas DU145, el parasito mantiene su forma ovoide presentando sus flagelos, la membrana ondulante y el axostilo 10µm. [Arroyo y cols. 1993] [Vazquez-Carrillo y cols. 2011]

T. vaginalis presenta una importante proteína denominada fimbrina (TvFim1), la cual está asociado con agrupaciones de fibras de actina y se conecta con estructuras protusivas opuestas al final del deslizamiento ameboideo y está implicada en la redistribución con actina, por lo que se sugiere que el comportamiento de TvFim1 durante la infección es predominante durante la fase de transición de la forma flagelar a la forma ameboidea [Kusdian y cols. 2013]. Por otra parte, la α -actina tiene un papel importante para mantener la forma ameboidea durante la adherencia a VECs. La α -actina es la base del citoesqueleto y juega un papel importante en la motilidad celular, fagocitosis, adhesión celular, transducción de señales y otros procesos; esta proteína es una de las más abundantes de *T. vaginalis* [Bricheux y cols. 1997].

4. Diversidad genética en *T. vaginalis*

Este parásito posee un genoma con un tamaño de 160 Mb en seis cromosomas haploides y 60 000 genes predichos [Carlton y cols. 2007]. Se han descrito 27 marcadores polimórficos (21 microsatelites y 6 genes de una sola copia) en diferentes aislados de *T. vaginalis* de diversos orígenes geográficos, demostrando un alto grado de diversidad distribuido en 4 de los 6 cromosomas, también se han observado diferencias en la frecuencia del RNA de doble cadena viral y en la resistencia a metronidazol [Conrad y cols. 2012], estas diferencias pueden explicar la habilidad de los aislados para colonizar el tracto urogenital masculino o la mucosa vaginal. Los aislados infectados por RNA de doble cadena muestran diferentes tasas de virulencia, así como implicaciones en la patogénesis de la enfermedad [Conrad y cols. 2013, Smith y cols. 2011].

5. Mecanismos de virulencia

La patogenicidad de *T. vaginalis* es un evento multifactorial en el que participan una diversidad de moléculas y procesos biológicos. El éxito de la colonización del parásito depende de su capacidad de interacción, degradación de la mucosa y de la matriz extracelular (MEC) a pesar del microambiente al que enfrenta; mediante distintos mecanismos de virulencia y la participación de diversos factores de virulencia, así como de la susceptibilidad del hospedero a la infección [Honigberg 1990].

El primer evento es la adherencia de *T. vaginalis* hacia su célula hospedera [Lehker y cols. 1991, Arroyo y cols. 1992] continuando con la citotoxicidad, la hemólisis [Dailey y cols. 1990] y la fagocitosis de microorganismos en el sitio de infección (bacterias, virus, hongos, etc) así como de la célula blanco (VECs, DU145, eritrocitos, espermatozoides etc.), [Midlej y cols. 2010] siendo estas propiedades esenciales para la colonización y persistencia del parásito [Lehker y cols. 1990]. Existen diversos eventos que ocurren tras el contacto del parásito con la célula blanco, como lo son la evasión de la respuesta inmune [Provenzano y cols. 1995], transducción de señales transmembranales [Arroyo y cols. 1993], adquisición de nutrientes [Lehker y cols. 1990] y apoptosis, en el que se involucran las cistein proteasas ocasionando un desprendimiento seguido por la destrucción celular [Gilbert y cols. 2000].

5.1. Citoadherencia en *T. vaginalis*

La interacción del parásito con su célula blanco es una condición primordial para el inicio y el mantenimiento de una infección crónica; la citoadherencia es realizado a través de componentes denominados adhesinas y receptores para laminina, fibronectina y colágena [Alderete 1999], [Silva Filho y cols. 1998] en el que se desencadena una serie de transducción de señales tales como: transformación morfológica, síntesis de adhesinas, quimiotaxis y reclutamiento de parásitos, así como la actividad proteolítica de múltiples proteinasas [Arroyo y cols. 1993].

La citoadherencia es dependiente del tiempo, temperatura, pH, así como de la perturbación de proteínas del citoesqueleto (microtúbulos y microfilamentos) [Lehker y cols. 1990]. El contacto celular y el hierro regulan de manera positiva el proceso de adherencia promoviendo la síntesis de adhesinas [Arroyo y cols. 1992, Arroyo y cols. 1993] y regulando de manera negativa la expresión de proteínas antigénicas [Neale y cols. 1990]. Existe una relación cercana del parásito con su célula huésped que al fusionarse intercambian información y material genético [Furtado y cols. 1998].

En *T. vaginalis* el Fe^{2+} causa una regulación positiva en la expresión y localización de proteínas de superficie. En *T. vaginalis* se encuentran un conjunto de proteínas que se expresan en la superficie celular y que juegan un papel importante en la regulación de la

interacción entre *T. vaginalis* y su célula blanco. Varias enzimas hidrogenosomales (enzima málica, α y β succinil CoA sintetasa y piruvato: ferredoxina oxidorreductasa) presenta una localización alternativa en la superficie celular, donde se describe la función de adhesinas (AP65, AP33, AP51, AP120 y AP23) [Hirt y cols. 2007]; estas proteínas participan en el contacto del parásito con células VECs y están implicadas como el primer paso para el desarrollo de la infección [Alderete y cols. 1988]. Otras proteínas metabólicas con función no enzimática son TvGAPDH y TvENO-1 que se presentan como proteínas de superficie. TvGAPDH es una proteína de superficie regulada por Fe^{2+} implicada en la unión a un receptor específico (fibronectina) durante el evento de interacción [Lama y cols. 2009]. TvENO-1 es una proteína de superficie, la cual es modulada por el contacto del parásito al reconocer a su receptor plasminógeno en células VECs [Alderete y cols. 2001], [Garcia y cols. 2003] como enzimas exhiben actividad unión-ligando, una función importante en el papel de la colonización e invasión bajo distintos ambientes; a ambas proteínas se les conoce como proteínas multifuncionales en otros patógenos [Alderete y cols. 2001].

5.1.2. Proteínas de superficie de *T. vaginalis*

Las proteínas de superficie de *T. vaginalis* son esenciales para distintas actividades y se ha demostrado que en otros organismo son importantes factores de virulencia en la relación huésped-patógeno [Casadevall y cols. 2001].

Las principales proteínas de superficie estudiadas, presentan varias familias de genes que codifican para 4 enzimas metabólicas conocidas como: piruvato ferredoxin oxidorreductasa, enzima málica, α y β succinil-CoA sintetasa localizadas en el hidrogenosoma; también pueden ser localizadas en la superficie del parásito como son las adhesinas: AP65, AP33, AP51, AP120, además de otra proteína de superficie denominada AP23; a estas proteínas con más de una función se les denomina “moonlighting proteins” [Dacks y cols. 2006]. Han sido identificadas 300 proteínas candidato de superficie con al menos un dominio transmembranal [Carlton y cols.] compartiendo características con proteínas de superficie de otros patógenos que contribuyen a un proceso patogénico [Carlton y cols. 2007].

Una familia de genes que codifica para proteínas de superficie ricos en leucinas, son las llamadas proteínas BspA-like encontrada en diferentes bacterias de la mucosa las cuales muestran la unión a células epiteliales del hospedero y a proteínas de la ME. En el caso de eucariontes se han descrito proteínas de la familia Bsp-like [Ikegami y cols., 2004]. Organismos como *Entamoeba histolytica* y *E. dispar* muestran proteínas en su superficie permitiendo la unión a su célula blanco como es el mecanismo llevado a cabo en bacterias [Anderson y cols. 2005]. En *T. vaginalis* se ha encontrado una proteína Bsp-like (TvBspA-625) con TM que se expresa en la superficie del parásito sugiriendo un papel importante en la interacción del parásito [Hirt y cols. 2002]. TvLPG-like es una proteína abundante en el glicocalix de *T. vaginalis*, teniendo función como factor de virulencia y participa en el proceso de interacción hospedero-parásito hacia células VECs mediante la unión a galectina-1 [Singh y cols. 2009].

Otros miembros de proteínas de superficie son la familia GP63, que comprende 48 miembros de esta familia de metaloproteasas. Estudios han demostrado que GP63 de *T. vaginalis* (TvGP63), está involucrada en la citotoxicidad pero no en la citoaderencia del parásito [Ma y cols. 2011].

5.2. Citotoxicidad en *T. vaginalis*

La citotoxicidad involucra una cascada de eventos que resultan en la citólisis, fagocitosis y daño a la monocapa celular, este último evento es regulado de forma negativa por altas concentraciones de Fe^{2+} [Peterson y cols. 1984] sin embargo, también se ha demostrado un mecanismo citolítico contacto-independiente mediado por moléculas secretadas por el parásito [Alderete y cols. 1984, Midlej y cols. 2010].

Estudios *in vitro* han medido el efecto citotóxico de los aislados de *T. vaginalis* mostrando un daño a monocapas de células vaginales humanas [Rasmussen y cols. 1986], monocapas de células HeLa [Alderete y cols. 1984] y células de ovario de hámster [Figueroa-Angulo y cols. 2012] [Krieger y cols. 1985]; estos estudios mostraron que las células tienen un cambio en su morfología debido a la presencia de *T. vaginalis*, que causa un daño a la célula del hospedero por la secreción de células citoactivas como el factor de 250 KDa que

altera la morfología de la célula huésped [Lushbaugh y cols. 1989], una glicoproteína de 200 KDa, el factor de desprendimiento celular (CDF) [Garber y cols. 1990], las fosfolipasas A1 y A2 [Vargas-Villarreal y cols. 2005] y varias cistein proteinasas (CPs) localizadas en la superficie [Alvarez-Sanchez y cols. 2000], Vazquez-Carrillo y cols. 2011] siendo parte importante de la citotoxicidad del parásito.

Las CPs de 39 (TvCP39) y 65 KDa (TvCP65) que se encuentran en secreciones vaginales de pacientes con tricomoniasis; son proteínas inmunogénicas que participan en la citotoxicidad del parásito a la célula blanco. Estas proteínasas se unen a la superficie de las células del epitelio vaginal y son activas en los rangos de pH entre 4.0 y 4.5, encontrados en la vagina de pacientes con tricomoniasis, son capaces de degradar fibronectina y colágeno IV. La síntesis y actividad proteolítica de estas CPs se ve afectada por factores ambientales como la presencia de Fe^{2+} , Zn^{2+} , pH, temperatura y poliaminas para su expresión. La presencia de cationes como el Fe^{2+} y el Zn^{2+} regulan de manera negativa estas CPs, las poliaminas tales como putresina, espermina y espermidina son aminos alifáticas cargadas positivamente que regulan algunos factores de virulencia del parásito que participan en propiedades como citoadherencia y citotoxicidad; al inhibir la síntesis de poliaminas aumenta la adherencia de *T. vaginalis* hacia células VECs reduciendo la citotoxicidad, sugiriendo que la expresión de TvCP39 y TvCP65 requiere de poliaminas [Alvarez-Sánchez y cols. 2000, Ramón-Luig y cols. 2011, Vazquez-Carrillo y cols. 2011]. [Garcia y cols. 2005, Carvajal-Gamez y cols. 2014].

5.2.1. Citotoxicidad de *T. vaginalis* en presencia de Zn^{2+}

T. vaginalis es capaz de generar daño a células prostáticas DU145 de manera contacto-dependiente, sin embargo, el daño hacia las células requiere largos periodos de tiempo para generar la destrucción de la monocapa celular [Vázquez-Carrillo y cols. 2011] [Figueroa-Angulo y cols. 2012].

La citotoxicidad de *T. vaginalis* es afectada por la presencia de Zn^{2+} , este daño a la monocapa celular esta mediada por al menos 5 proteinasas: CP70, CP65 CP39, CP25 Y CP20 involucradas en la interacción del parásito con células DU145, presentando una regulación

negativa por este catión, sin embargo el efecto del Zn^{2+} no inhibe totalmente su actividad proteolítica, después de un periodo de tiempo existe un daño total a las células DU145 [Vazquez-Carrillo y cols. 2011]. De manera interesante se describe a una metaloproteinasa de 50KDa (TvMP50) que presenta actividad proteolítica y modulación de transcrito y proteína por la presencia de Zn^{2+} , TvMP50 ha mostrado ser inmunogénica, el suero de pacientes hombres con tricomoniasis reconoce esta TvMP50, por lo que se sugiere como posible molécula para el diagnóstico de la tricomoniasis masculina [Quintas-Granados y cols. 2013].

5.2.2. Proteinasa en *T.vaginalis*

T. vaginalis presenta alta actividad proteolítica siendo las proteinasas uno de los factores de virulencia más importantes en el parásito. Una proteinasa es una enzima capaz de degradar proteínas por escisión hidrolítica de enlaces peptídicos; estas enzimas realizan cortes en el enlace peptídico ya sea dentro de la cadena polipeptídica (endopeptidasas) o en los extremos amino o carboxipeptidasa (exopeptidasas). De acuerdo a su mecanismo catalítico y al residuo involucrado en la hidrólisis se pueden clasificar en: aspártico, serin, treonin, metalo y cisteín [Rawlings y cols. 2014]. Existe una diversidad de proteinasas del tipo cisteína y de tipo metalo que contribuyen con la alta actividad proteolítica [Bozner y cols. 1990].

T. vaginalis contiene un repertorio de casi 450 genes que codifican para proteinasas [Carlton y cols. 2007]; 220 correspondientes al tipo cisteín; se han detectado al menos la actividad de 23 CPs usando geles de gelatina como sustrato y detectados en doble dimensión que corresponde a nueve diferentes proteínas, que fueron identificados por espectrofotometría de masas (TvCP1, TvCP2, TvCP3, TvCP4, TvCP4-like, TvCP12, TvCPT, TvLEGU-1 y otra CP-legumina-like) en una región de 30 KDa, observando que estas moléculas identificadas son especies reactivas en sueros de pacientes con tricomoniasis, sugiriendo que algunas CPs funcionan como biomarcadores diagnóstico de la tricomoniasis [Neale y cols. 1990], [Ramon-Luing y cols. 2010].

6. Micronutrientes

Los micronutrientes son compuestos necesarios para un correcto estado fisiológico del organismo; las vitaminas y los oligoelementos también llamados elementos traza son conocidos como micronutrientes [Muñoz García y cols. 2011]. Los oligoelementos se encuentran en los organismos en cantidades pequeñas a 0,01 ppm por 100 mg del peso corporal.

Los oligoelementos que se encuentran relacionados con la salud humana son un grupo de elementos como: cobalto (Co), cobre (Cu), yodo (Y), molibdeno [Carlton y cols.], Hierro (Fe) Zinc [Bozner y cols.], Selenio (Se), Manganeseo (Mn) y Cromo (Cr); la cantidad adecuada del elemento garantiza el funcionamiento biológico del organismo [de Brätter y cols. 1995].

6.1. Fe²⁺

El hierro es un oligoelemento esencial importante en el desarrollo y crecimiento de los organismos [Muñoz García y cols. 2011]. Este catión es vital en distintos procesos biológicos como la síntesis del DNA, transporte de electrones y transporte de oxígeno [Sehgal y cols. 2012]. El hierro forma parte de la mioglobina, hemoglobina, sistemas citocromáticos y diversas enzimas, por lo que es de vital importancia en la salud humana. Brätter y cols (1995) reporta valores normales de hierro de 0.6- 1.45 mg/l en mujeres y 0.8- 1.68mg/l en hombres; los depósitos de hierro se encuentran en parénquima hepático, músculo esquelético y en el sistema retículo endotelial [Lynch y cols. 1984].

6.1.1. El efecto del hierro y el contacto celular en *T. vaginalis*

El microambiente vaginal se encuentra en constante cambio debido principalmente al ciclo menstrual, *T. vaginalis* tiene la capacidad de adaptarse a tales cambios, considerando las distintas concentraciones de Fe²⁺ del hospedero y la respuesta al contacto celular; mediante esta adaptación el parásito genera infección y la capacidad de sobrevivir mediante la expresión de diversas moléculas involucradas en la virulencia hacia su hospedero [Lehker y cols. 1991, Arroyo y cols. 1993, Arroyo y cols. 1993, Garcia y cols. 2003].

El hierro es un elemento importante para el mantenimiento y crecimiento de *T. vaginalis* durante de la infección, jugando un papel importante en la interacción hospedero-parásito, participando en el proceso de citoadherencia, en la resistencia del sistema de complemento, inducción de la apoptosis en la célula hospedera y la disminución de la citotoxicidad [Lehker y cols. 1990]. El hierro es capaz de regular la expresión de genes de virulencia como adhesinas que son sobreexpresadas y CPs que son poco expresadas [Lehker y cols. 1992]; *T. vaginalis* requiere de 300 μM de Fe^{2+} para un óptimo metabolismo y multiplicación en cultivos [Gorrell 1985]. *T. vaginalis* usa distintas fuentes de Fe^{2+} : lactoferrina, hemoglobina y grupo hemo; el hierro está unido a moléculas específicas como lactoferrina y transferrina en el huésped; las cuales tienen una afinidad elevada por este catión. El parásito tiene un sistema de consumo de hierro presentando un receptor de 136 KDa para la unión de holo-Lf, receptores para citocromo c, adhesinas, eritrocitos y células epiteliales [Torres-Romero y cols. 2009]. El contacto de *T. vaginalis* con la célula hospedera genera una serie de señales intracelulares tanto en la células como en el parásito generando la expresión de factores de virulencia y cambios morfológicos en el parásito [Kucknoor y cols. 2005]; al entrar en contacto con las células VECs del hospedero existe la sobrerregulación de adhesinas y un cambio morfológico a una forma ameboidea considerándose como una característica de virulencia [Arroyo y cols. 1993].

El Fe^{2+} tiene un papel importante en la fisiología y la morfología del parásito, los cambios en perfiles de proteínas pueden generar alteraciones morfológicas ; las diferentes concentraciones de hierro afectan el crecimiento y la síntesis de proteínas mostrándose diferencialmente reguladas en el parásito [De Jesus y cols. 2007].

6.1.2 Mecanismo de regulación génica por hierro en *T. vaginalis*

En *T. vaginalis* existen secuencias promotoras que se han caracterizado y que junto con proteínas de unión a DNA generan el proceso de transcripción de diversos genes en este parásito [Liston y cols. 1999], [Schumacher y cols. 2003].

La regulación transcripcional en *T. vaginalis* es todavía limitada sin embargo estudios en el genoma del parásito han predicho que el 75% de genes que codifican proteínas utilizan

un elemento iniciador (Inr) de metazoarios como promotor y se encuentra a 20pb rio arriba del codón de inicio de la traducción [Carlton y cols. 2007]. Una secuencia consenso altamente conservada en el sitio de inicio de la transcripción TCA+1 T/CT/A localizado en el extremo 5'UTR de genes que codifican para proteínas de *T. vaginalis*. El Inr es reconocido por factores de transcripción asociados con la RNA polimerasa II (RNA pol II) y es responsable del reconocimiento del sitio de inicio de la transcripción [Smith y cols. 2011]. Existen genes que codifican para factores de transcripción asociados al complejo de pre-iniciación de *T. vaginalis*. Se ha reportado la presencia de una proteína de 39KDa (IBP39) la cual reconoce específicamente la secuencia Inr, está proteína presenta un dominio de unión a DNA y otro a la RNA pol II para el proceso de inicio de la transcripción basal de genes en *T. vaginalis* [Smith y cols. 2011, Smith y cols. 2011].

Un mecanismo descrito a nivel transcripcional modulado por hierro, es el del gen *ap65-1*; en este gen se han encontrado elementos promotores de respuesta al hierro; se ha observado la presencia de elementos de reconocimiento "MRE" que presenta una secuencia consenso en el extremo 5' y tres secuencia ricas en T que son reconocidos por un conjunto de tres factores de transcripción tipo Myb y que son responsables de la regulación en la expresión de *ap65-1* mediado por Fe^{2+} [Wei y cols. 2012].

6.2. Zn^{2+}

El Zn^{2+} es el segundo oligoelemento más importante en el cuerpo humano después del hierro; al ser un ion intracelular se encuentra principalmente en el citoplasma [Rubio y cols. 2007]. Los valores normales se encuentran entre 0,6-1,2 mg/l [de Brätter y cols. 1995].

El Zn^{2+} participa en diversos procesos biológicos como la respiración celular, en la replicación de DNA y transcripción del RNA, en la integridad de la membrana celular y en sistemas enzimáticos [Rubio y cols. 2007]. Principalmente actúa como cofactor de al menos 200 enzimas implicadas en metabolismo energético, reacciones de biosíntesis, degradación de proteínas etc.

El 90% del Zn^{2+} se encuentra en el tejido óseo y muscular, el resto se encuentra en la piel, páncreas, hígado, retina, células hemáticas y tejidos gonadales del hombre [Estechea

1996]. El Zn^{2+} se encuentra en el microambiente masculino en una concentración que va de 4.5 a 7 mM lo que permite disminuir las infecciones en la mayoría de los hombres funcionando como defensa contra patógenos [Krieger y cols. 1982].

6.2.1. El Zn^{2+} en el hombre

En el hombre el Zn^{2+} tiene un papel importante sobre la diferenciación gonadal, el crecimiento testicular, la espermatogénesis, el metabolismo de andrógenos y en la interacción con los receptores hormonales [Prasad 1991]. La deficiencia de Zn^{2+} interfiere con el desarrollo normal puberal en varones mediante la supresión en la producción de andrógenos testiculares durante la pubertad [Castillo y col., 1999]; la deficiencia causa oligosperminia e impotencia sexual, que pueden ser corregidas suplementando Zn^{2+} a la dieta [Sandstead y cols. 1998].

La testosterona presenta un receptor nuclear, de la misma forma que todas las hormonas esteroideas; es una proteína tipo dedos de Zn^{2+} por lo que este catión es vital para su funcionamiento [Sandstead y cols. 1998]. Existe una enzima denominada 5α -reductasa la cual cataliza la conversión de testosterona en su metabolito activo a dihidroesterona (DHT) siendo responsable de la ausencia de genitales masculinos externos; al disminuir los niveles de Zn^{2+} séricos disminuyen las concentraciones de DHT en hombres infértiles, por lo que al suplementar con Zn^{2+} aumenta los niveles de testosterona y DHT logrando la recuperación de la fertilidad [Favier 1992].

6.2.2. El efecto del Zn^{2+} en *T. vaginalis*

T. vaginalis se enfrenta al microambiente de la próstata, glándula que junto con las vesículas seminales, produce fluidos prostáticos, los cuales representan un ambiente hostil rico en Zn^{2+} [Krieger y cols. 1982]. Este catión presenta un efecto antimicrobiano que afecta la viabilidad de *T. vaginalis*, el cual es sensible a concentraciones de 1.6mM de Zn^{2+} , esta concentración afecta su crecimiento, así como el perfil de expresión de genes y de proteínas. El éxito del establecimiento de la infección depende de un arsenal de factores de virulencia que facilitan la colonización incluyendo adhesinas involucradas en la unión celular

y en la participación de señalización e invasión celular; sin embargo se desconoce como el Zn^{2+} afecta la adhesión del parásito.

Estudios realizados con Zn^{2+} en *T. vaginalis* y utilizando la línea celular DU145, han mostrado que el Zn^{2+} afecta la expresión de factores de virulencia, la morfología y el proteoma, alterando la virulencia del parásito. En el aislado CNCD147 de *T. vaginalis* se ha observado que cuando es crecido con 1.6mM de Zn^{2+} exhibe un proteoma de 27 proteínas expresadas diferencialmente y hay una disminución en la tasa de crecimiento del parásito. De manera interesante se observó la sobreexpresión de dos fimbrinas y una metaloproteinasa de 50 KDa en presencia de Zn^{2+} . Esta expresión diferencial sugiere un beneficio de la supervivencia del parásito en presencia de Zn^{2+} en el tracto urogenital masculino [Vazquez-Carrillo y cols. 2011].

El Zn^{2+} es determinante en la expresión de transcritos y proteínas, sin embargo, se desconoce su mecanismo de regulación. Se han encontrado diferentes proteínas reguladoras a nivel transcripcional que son estabilizadas por Zn^{2+} , tales como dedos de Zn^{2+} . En organismos eucariontes el Zn^{2+} está involucrado con el funcionamiento de dominios de dedos de Zn^{2+} y de su interacción con DNA. Existen elementos de respuesta a metal (MRE) que con la participación de factores de transcripción pueden mantener las concentraciones de Zn^{2+} celular y activa la expresión de proteínas involucradas en mecanismos de homeostasis de Zn^{2+} ; en estos mecanismos se encuentra la participación de proteínas de respuesta al catión que contienen motivos dedos de Zn^{2+} , así como la regulación de genes que codifican para proteínas transportadoras de Zn^{2+} . Estos hallazgos indican la actividad transcripcional de proteínas mediado por los niveles de Zn^{2+} intracelular. Un mecanismo similar puede estar presente en *T. vaginalis*, que puede dar lugar a la expresión diferencial de proteínas en presencia de Zn^{2+} .

7. Estado del arte

La regulación génica en respuesta a la interacción con las células del hospedero utilizando modelos *in vitro* se ha estudiado en *Neisseria meningitides* [Grifantini y cols. 2002] *Porphyromonas gingivalis* [Hosogi y cols. 2005] y *Helicobacter pylori* [Kim y cols.

2004]. Debido a la falta de un buen modelo para estudiar la patogénesis de *T. vaginalis* se han propuesto el uso de modelos celulares *in vitro* como VECs, HeLa, DU145, células de cáncer de colon (CaCo), etc. El uso de bibliotecas de cDNA se ha empleado para la caracterización de la expresión génica durante la fase inicial de la tricomoniasis en contacto con células huésped; varios genes codifican a proteínas relacionadas con la colonización, adherencia, cambios en morfología, genes involucrados en la regulación de la expresión génica y así como otros con funciones desconocidas. La literatura sugiere la existencia de al menos dos vías de señalización para la sobreexpresión de expresión de estos genes [Kucknoor y cols. 2005]. Estudios sobre interacción de *T.vaginalis* con células del epitelio vaginal Z172 revelan disrupción entre las uniones celulares, signos de apoptosis y una morfología similar a la necrosis, también se observa la expresión de genes involucrados en la inflamación así como genes que codifican para proteínas de adhesión, observando distintos eventos durante el proceso de interacción [Lin y cols. 2015].

Estudios *in vitro* reportan el efecto antimicrobiano a concentraciones superiores de 1.6 mM de sales de Zn^{2+} describiendo que *T. vaginalis* puede perder motilidad y mantener la viabilidad a esta concentración, sugiriendo que en presencia de Zn^{2+} el parásito es capaz de generar su adaptación mediante propiedades de virulencia como la adhesión y citotoxicidad expresando factores de virulencia que permiten la patogénesis del parásito. El Zn^{2+} presente en el microambiente masculino es capaz de regular la expresión de proteínas; actualmente estudios del proteoma de *T. vaginalis* realizados en comparativa de un aislado de mujer (CNCD147) y un aislado de hombre (HGMN01) en presencia de Zn^{2+} muestran una expresión diferencial de su proteoma [Quintas-Granados y cols. 2013]; por lo que esta expresión diferencial de *T. vaginalis* en presencia de Zn^{2+} juega un papel importante en la supervivencia del parásito en un ambiente adverso como el tracto urinario masculino en comparación con el ambiente vaginal [Vazquez-Carrillo y cols. 2011]. Por lo que es importante conocer como el Zn^{2+} puede afectar en la interacción con células *in vitro*, ya que este es el primer evento que *T. vaginalis* necesita para colonizar y generar virulencia, lo que permitiría conocer más acerca del comportamiento del parásito en un ambiente adverso.

8. Justificación

El desarrollo de este trabajo nos permitirá comprender la tricomoniasis en el hombre y contribuir al conocimiento de cómo el Zn^{2+} puede afectar a nivel de morfología y como este catión afecta positiva o negativamente las propiedades de adhesión y citotoxicidad, así como la expresión de genes asociados a estas propiedades durante la interacción de *Trichomonas vaginalis* (HGMN01) con células prostáticas DU145.

9. Hipótesis

La expresión de algunos genes del aislado HGMN01 así como la morfología, adhesión y citotoxicidad, serán afectadas por la presencia de Zn^{2+} (1.6mM) durante su interacción con células prostáticas DU-145.

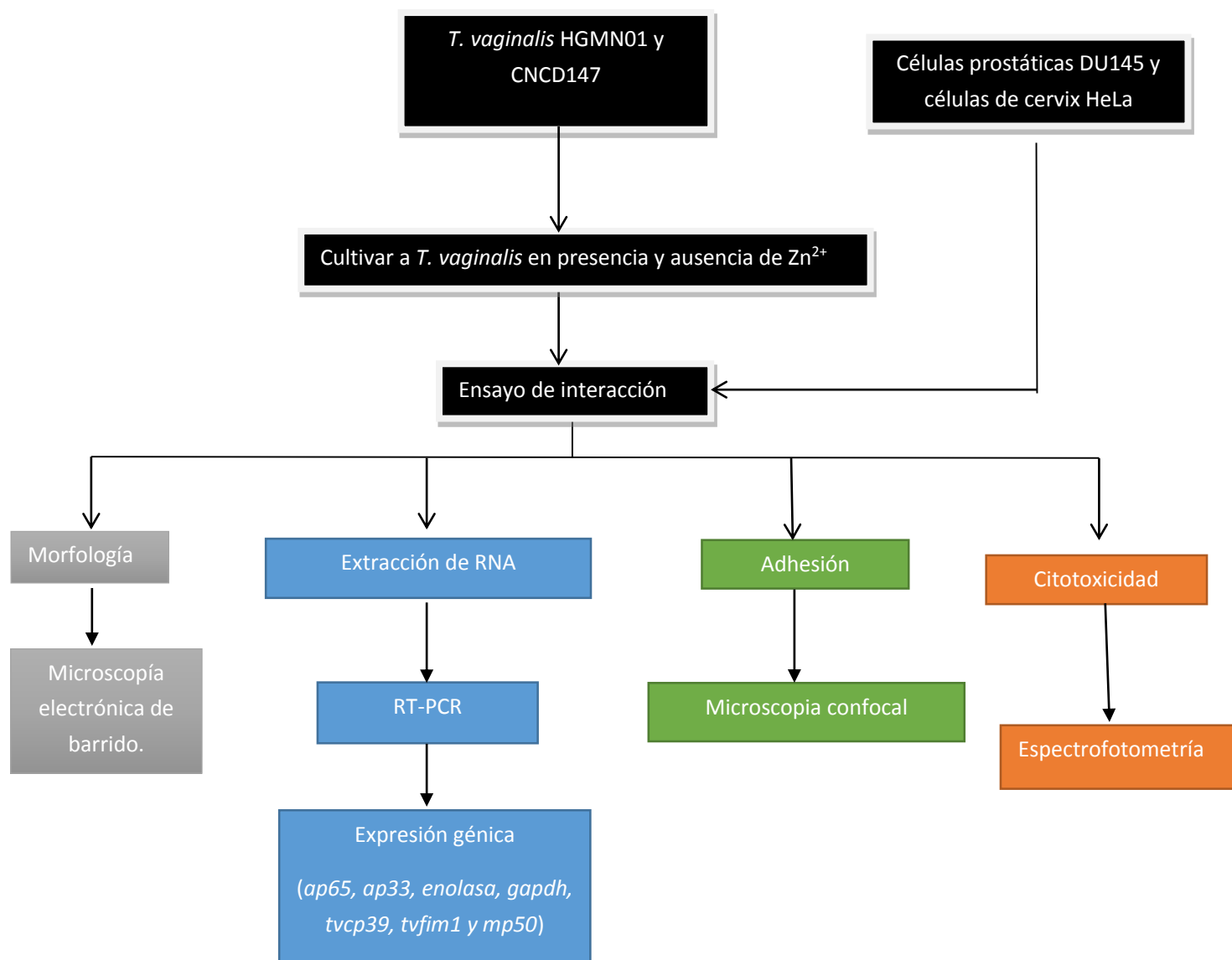
10. Objetivo General

- ✓ Evaluar la adhesión y citotoxicidad de *T. vaginalis* aislado HGMN01 durante la interacción con células prostáticas DU145 en presencia y ausencia de Zn^{2+}

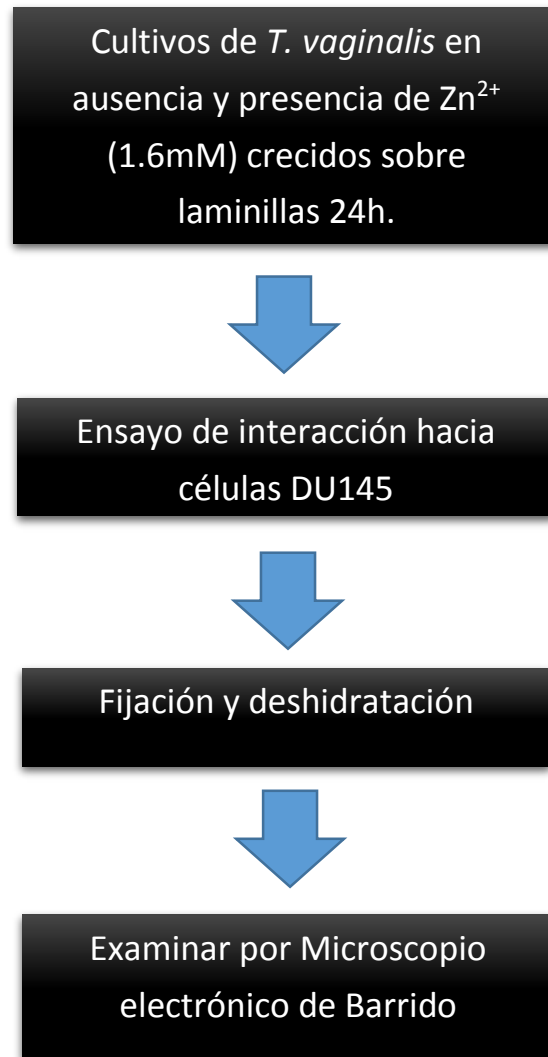
10.1 Objetivos Específicos

- ✓ Caracterizar la morfología del aislado HGMN01 durante su interacción con células DU145 en presencia de Zn^{2+} .
- ✓ Determinar los niveles de adhesión y citotoxicidad del aislado HGMN01 durante su interacción con células DU145 en presencia de Zn^{2+} .
- ✓ Determinar la expresión de genes del aislado HGMN01 involucrados en adhesión y citotoxicidad durante su interacción con células prostáticas DU145 en presencia de Zn^{2+}

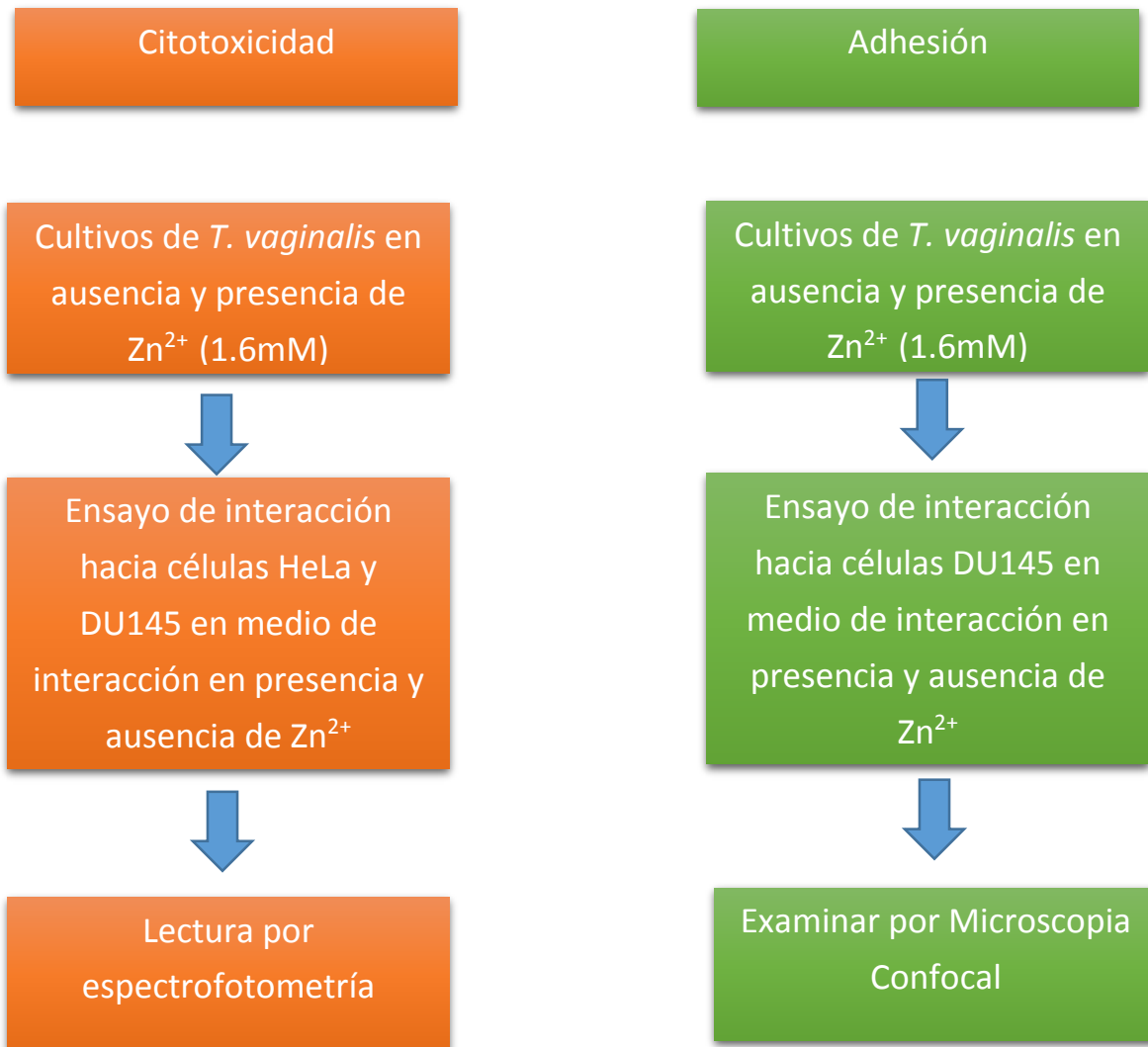
11. Estrategia experimental



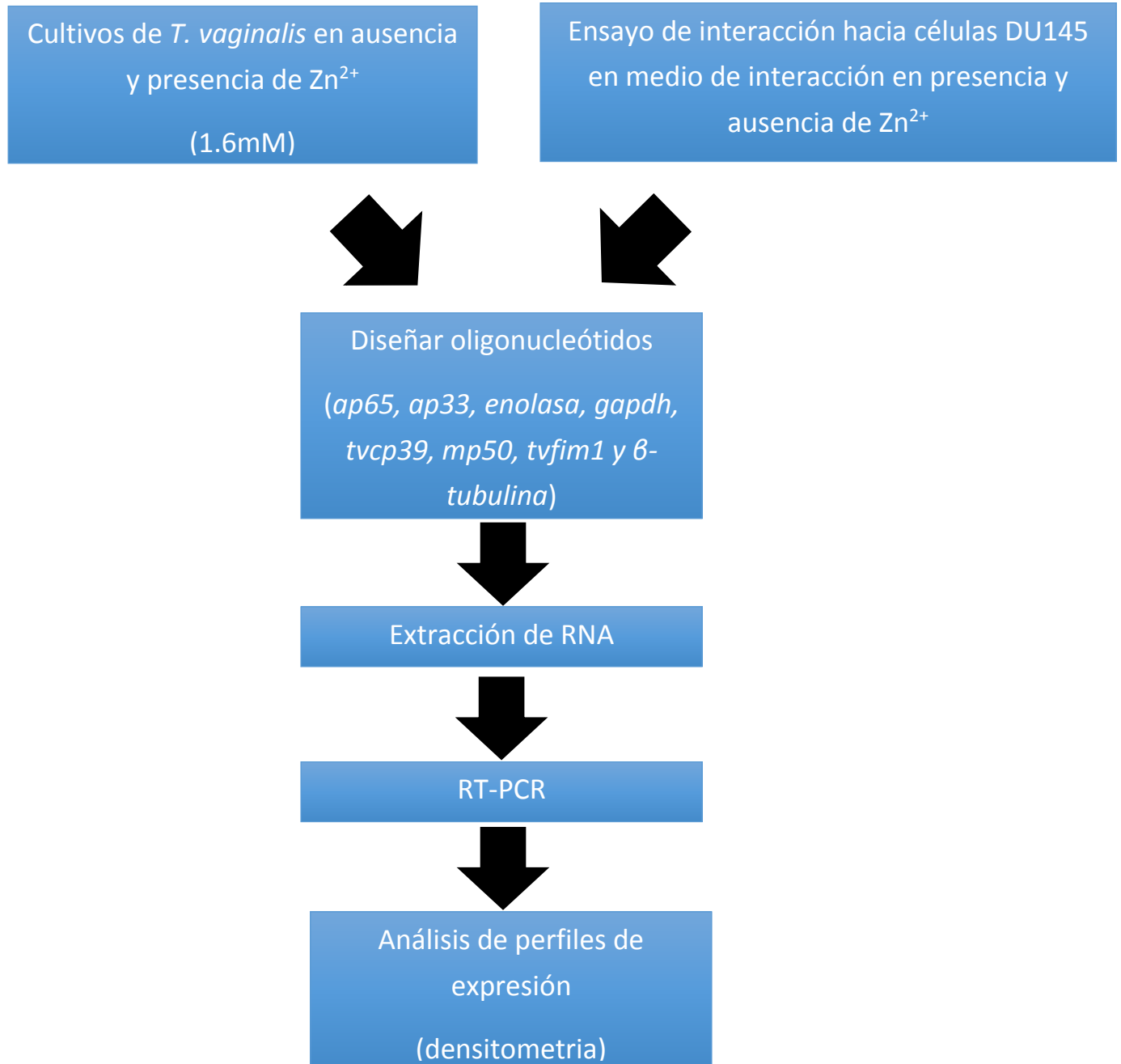
- 1) Caracterizar la morfología del aislado HGMN01 durante su interacción con células DU145 en presencia de Zn^{2+} .



2) Determinar los niveles de adhesión y citotoxicidad del aislado HGMMN01 durante su interacción con células DU145 en presencia de Zn^{2+} .



3) Determinar la expresión de genes del aislado HGMN01 involucrados en adhesión y citotoxicidad durante su interacción con células prostáticas DU145 en presencia de Zn^{2+}



11.1 MATERIALES Y METODOS

11.2 Cultivo de *T. vaginalis*

Los aislados CNCD147 Y HGMN01 de *Trichomonas vaginalis* se cultivaron en medio TYM (tripticaseína y extracto de levadura-maltosa) por 24h a 37°C adicionado con 10% de suero de caballo (SC) inactivado por calor (TYM-SC) para obtener parásitos en fase logarítmica tardía de crecimiento. Se cultivaron 10×10^6 *T. vaginalis* en cajas de cultivo de 25 cm² en 30 ml de TYM-SC. Para los parásitos con Zn²⁺, se cultivaron 20×10^6 *T. vaginalis* en cajas desechables de cultivo de 25 cm² en 30 ml de TYM-SC suplementado con ZnCl₂ a una concentración de 1.6 mM.

11.3 Cultivo de células

Las células HeLa (ATCC) provenientes de la línea celular del carcinoma de cérvix humano. Las células DU145 provenientes de la línea celular de adenocarcinoma de próstata humana. Las células HeLa se cultivaron en cajas de 75 cm², se inocularon 3×10^6 células en 10 ml de medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) adicionado con 10% de suero de caballo (SC) adicionado con penicilina/estreptomicina y se incubó a 37°C en 5% de CO₂ para alcanzar una monocapa confluyente en 48h. Las células DU145 se cultivaron en cajas desechables de 75 cm², se Inocularon 0.8×10^6 en 10ml de medio DMEM-SFB bajo en glucosa, se incubaron a 37°C en 5% de CO₂ para alcanzar monocapa en 48h. Las monocapas confluentes de células HeLa y DU145 se incubaron con PBS-EDTA 0.2% a temperatura ambiente por 10 minutos para células HeLa y 13 minutos para células DU145. Previo a la obtención de monocapas confluentes, las células se colectaron por centrifugación por 5min/1800 rpm/ 4°C.y la cuantificación se realizó en la cámara de Neubauer.

11.4 Microscopia electrónica de Barrido

Los parásitos se cultivaron sobre cubreobjetos en medio TYM-SC en presencia y ausencia de Zn²⁺ (1.6mM) crecidos por 24h a 37°C. Células DU145 se sembraron sobre cubreobjetos en placas de 6 pozos de fondo plano, se inocularon 7×10^5 células DU145 por pozo en 2ml de medio DMEM-SFB. La placa se incubó por 24h a 37°C en 5% de CO₂.

Una vez que se obtuvo la monocapa confluyente, se realizó el ensayo de interacción células: parásito a los 5 minutos, con una relación (1:5) parásitos en presencia y ausencia de Zn^{2+} se incubaron a 37°C en 2ml de medio de interacción TYM-DMEM (1:2 vol/vol). La placa se incubó a los tiempos establecidos a 37°C en 5% de CO_2 . Posteriormente se procesaron las laminillas, se fijaron en formaldehído al 3.75% por 10 minutos a 37°C, las muestras se deshidratan con incrementos de concentración de etanol de 70 a 100%. Se examinaron por Microscopia Electrónica de Barrido.

11.5 Ensayo de citotoxicidad

Se obtuvieron monocapas confluentes de células HeLa y DU145 en placas de 96 pozos de fondo plano, se inoculó 0.35×10^5 células HeLa en 100 μ l de medio DMEM-SC, para células DU145 se inoculó 0.28×10^5 células en 100 μ l de medio DMEN-SFB por pozo. Ambas placas se incubaron por 24h a 37°C en 5% de CO_2 .

Una vez que se obtuvo la monocapa confluyente, se realizó el ensayo de interacción células:parásito con una relación (1:5), parásitos en presencia y ausencia de Zn^{2+} se incubaron a 37°C en 100 μ l de medio de interacción TYM-DMEM y medio de interacción en presencia de Zn^{2+} TYM-DMEM- Zn^{2+} (1:2 vol/vol). Esto se realizó para ambas líneas celulares.

La cinética de citotoxicidad se realizó con diferentes tiempos de interacción (1, 3, 6, 8 h). Después las monocapas se lavaron suavemente 3 veces con PBS pH 7.0, se fijaron con 50 μ l de formaldehído al 2% durante 10 min/TA, se lavaron 2 veces con PBS pH 7.0, se tiñeron con cristal violeta al 0.13% en etanol-formaldehído (5:2) e inmediatamente se lavaron con PBS pH 7.0 hasta quitar el excedente del colorante y se dejaron secar a TA. El colorante se eluyó con 50 μ l de SDS al 1% en 50% de etanol por 15 min/TA. La densidad óptica del colorante eluido se obtuvo con un lector ELISA Multiskan a una longitud de onda de 570 nm.

Como controles se usaron monocapas confluentes de ambas líneas celulares sin interaccionar con los parásitos. El porcentaje de citotoxicidad se calculó considerando la densidad óptica del control como el 100% de monocapa confluyente; los valores de absorbancia de la monocapa remanente de cada muestra después de la interacción fue

representada como el % de monocapa remanente de cada condición y la diferencia entre el % de monocapa remanente de cada muestra y el 100% de monocapa control correspondió al % de citotoxicidad.

11.6 Ensayo de Adhesión

Células DU145 se sembraron sobre cubreobjetos en placas de 6 pozos de fondo plano, se inocularon 0.7×10^6 células DU145 por pozo en 2ml de medio DMEM-SFB. La placa se incubó por 24h a 37°C en 5% de CO₂ hasta obtener monocapa confluyente. Parásitos cultivados en medio TYM-SC en presencia y ausencia de Zn²⁺ (1.6mM) por 24h a 37°C.

Una vez que se obtiene la monocapa confluyente, se realizó el ensayo de interacción células: parásito con una relación (1:5), a los tiempos 30 y 60 minutos; parásitos en presencia y ausencia de Zn²⁺ se incubaron a 37°C en 2ml de medio de interacción TYM-DMEM (1:2 vol/vol) y 2ml de medio de interacción TYM-DMEM-Zn²⁺ en condiciones independientes. La placa se incubó a los tiempos establecidos a 37°C en 5% de CO₂. Posteriormente se procesaron las laminillas, se fijaron en formaldehído al 3.75% por 10 minutos a 37°C, se lavaron 3 veces con solución amortiguadora, se montaron sobre portaobjetos en 10µl de Vecta Sheal. Una vez montadas las laminillas se sellaron con esmalte y se examinaron por Microscopia confocal (Leica).

11.7 Extracción de RNA de *T. vaginalis*

La extracción del RNA se realizó a partir de parásitos recolectados del ensayo de 8h de interacción, crecidos en condiciones de ausencia y presencia de Zn²⁺ (1.6mM), en medio de interacción DMEM-TYM en presencia y ausencia de Zn²⁺, los parásitos se lavaron 3 veces con PBS pH 7 y se centrifugaron a 1800 rpm, 5min, 4°C y se le adiciono 1ml de Trizol (Invitrogen) por cada 20×10^6 de parásitos, lisando las células por inversión. La muestra se incubó 10 min/TA y posteriormente 30 min a 4°C; se agregaron 200 µl de cloroformo (Sigma-Aldrich) por ml de Trizol, se mezcló por inversión por 15s/TA y se centrifugó a 10,000 rpm/15min/4°C. Se recuperó la fase acuosa y se le adicionaron 0.5ml de isopropanol (Sigma-Aldrich) al 100% por cada 1 ml de Trizol, se mezcló, se incubó por 15 min/TA, se centrifugó a 10000 rpm/15min/4°C, se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 2 volúmenes

de etanol al 75% diluido en agua diethyl pirocarbonato (H₂O-DEPC), se centrifugó a 10,000 rpm/5min/4°C se dejaron secar las pastillas a temperatura ambiente. La pastilla de RNA se resuspendió en 50 µl de H₂O-DEPC libre de nucleasas y RNAsas. La integridad del RNA se analizó en gel al 1% teñido por RedGel y se cuantificó en un espectrofotómetro NANODROP 2000 a una absorbancia de 260 nm.

11.8 Síntesis de cDNA

5 µg de RNA se trataron con DNAsa I (Promega 1U/µl) por 2h a 37°C, se le agregó 1µl de la solución de paro y se incubó a 65°C por 10 min y se cuantificó por espectrofotometría. A 1 µg de RNA se le adicionó 1 µl de oligo dT (10 pmol/µl) y H₂O-DPEC cbp 13 µl, se incubó a 65°C por 10 min después se colocó en hielo por 5 min y se adicionaron 4 µl de amortiguador 5x, 2 µl de dNTPs (10 mM) y 0.5 µl (20U/µl) de retro transcriptasa reversa (Transcriptor Reverse Transcriptase Roche) se incubó a 55°C por 30 min y se inactivo a 85°C por 5 min.

11.9 RT-PCR

El perfil de RT-PCR se obtuvo utilizando los oligonucleótidos reportados para los genes de *ap33* y *ap65* [Kucknoor y cols. 2005]. Para *enolasa* [Mundodi y cols. 2008], *gapdh* [Lama y cols. 2009], *tvcp39* [Carvajal-Gamez y cols. 2014], *mp50* [Quintas-Granados y cols. 2013] y *tvfim1*. Como control de carga se utilizó los oligonucleótidos *β-tubulina* [Leon-Sicaire y cols. 2004].

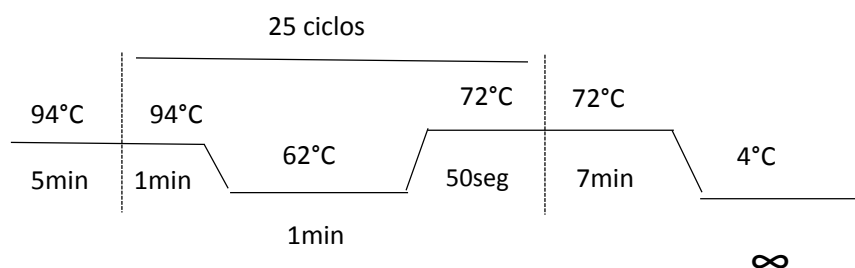
Tabla 1. Oligonucleótidos usados para análisis de RT-PCR

Genes		Oligonucleótidos	Tamaño del amplicon (pb)
<i>ap65</i>	Sentido	5'-CAGTTAGATATGGGTACAGACCGC-3'	631
	Antisentido	5'-CGCTCGGAGTTAGCGCATGTAG-3'	
<i>ap33</i>	Sentido	5'-CTCATTTTCGTCCCAGCTCCA-3'	250
	Antisentido	5'-AAACAATACCGATCTTACCG-3'	
<i>enolasa</i>	Sentido	5'-CTG GCAAGGACATCATGATC-3'	444
	Antisentido	5'-CAGCGAG ATCAGCGATGACG-3'	
<i>gapdh</i>	Sentido	5'-CAGTTGGTGAGGGCGATGAC-3'	762
	Antisentido	5'-GAAGAACCTTTGTGGAGAGAGCAT-3'	
<i>tvcp39</i>	Sentido	5'-CTTTTATATAGTTTATTTGTCTGTTGGGATGCA-3'	933
	Antisentido	5'-GCAATGTTTCGTTCAACAACATGAGCAG-3'	
<i>mp50</i>	Sentido	5'- CCGGATCCATGTCAGGTGACGAATTC-3'	1320
	Antisentido	5'- CCAAGCTTTCAAAGTACTCTTGAAGC-3'	
<i>tvfim1</i>	Sentido	5'-ATCGGATCCATGGCTGTAAACGCT-3'	1833
	Antisentido	5'-GTACGGTACCTTATTGATCCATGGCCATAA-3'	
<i>β-tubulina</i>	Sentido	5'-CATTGATAACGAAGCTCCTTTACGAT-3'	112
	Antisentido	5'-GCATGTTGTGCCGGACATAATCAT-3'	

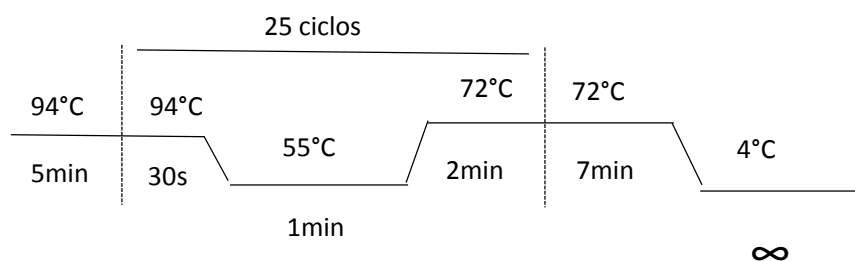
Para la reacción de PCR se utilizó 0.3 µl a 10pmol de los iniciadores sentido y antisentido, 1.3 µl de amortiguador PCR 10x, 0.3 µl de dNTP [10mM], 0.8 µl de MgCl₂ [25mM], 0.1 µl de Taq polimerasa [1 unidad] (Kappa) 1 µl de cDNA, cbp 12.5 µl de agua inyectable. Equivalente a una reacción de PCR. Se generaron amplificadores para cada uno de los genes en las distintas condiciones.

Los condiciones de amplificación para cada uno de los genes fueron los siguientes:

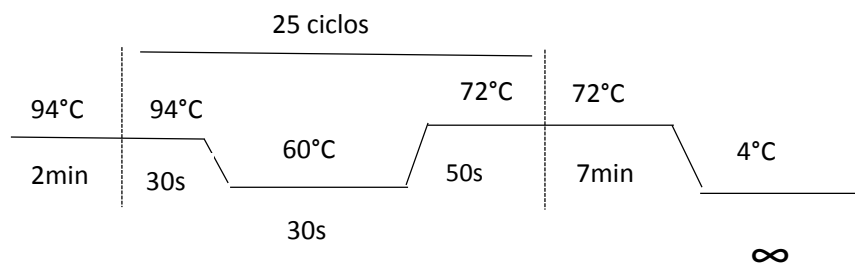
Para *ap65*



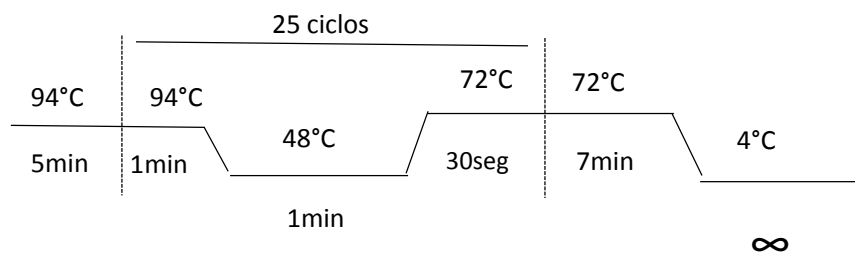
Para *ap33*, *tvmp50*, *tvfim1*, *tvcp39*



Para *enolasa*, *gapdh*



Para *β-tubulina*



Cada una de los productos de PCR se resolvió en geles de agarosa al 1% y 2% con Red gel en cada muestra (6X Loading Buffer with GelRed). Se realizó análisis por densitometría utilizando el programa Image Lab (BioRad).

12. RESULTADOS

12.1 Efecto del Zn^{2+} en la morfología de *T. vaginalis* HGMN01

La morfología de los parásitos crecidos en presencia de Zn^{2+} (1.6 mM) y en ausencia del catión se evaluaron por Microscopia Electrónica de Barrido (MEB). Se observó la morfología característica de *T. vaginalis* adherida a una superficie de plástico observándose ovoides (ov) y ameboides (am) como se ha reportado (Arroyo y col., 1993). La morfología ovoide presenta los cuatro flagelos así como su axostilo (**Figura 5 y 6 panel C**); la morfología ameboide presenta flagelos adosados al cuerpo así como flagelos en interacción con otros parásitos (**Figura 5 y 6 panel D**); se observan diversos grupos de parásitos formando interdigitaciones uno sobre otro, mostrando una morfología más redonda en el grupo de parásitos (**Figura 5 y 6 panel A**), por lo tanto nos sugiere que al existir más superficie con la cual interaccionar el parásito tiende a formar la morfología ameboide (**Figura 5 y 6 panel B**), sin embargo, los parásitos en conjunto generan un espacio de interconexiones así como interdigitaciones mostrando ambas morfologías. Estas características se muestran en ambas condiciones; sin embargo en presencia del catión se puede observar una rigidez en los flagelos de algunos parásito para ambas morfologías (**Figura 6 panel B**). Sugiriendo que el Zn^{2+} puede estar afectando la movilidad e interconexiones entre los parásitos.

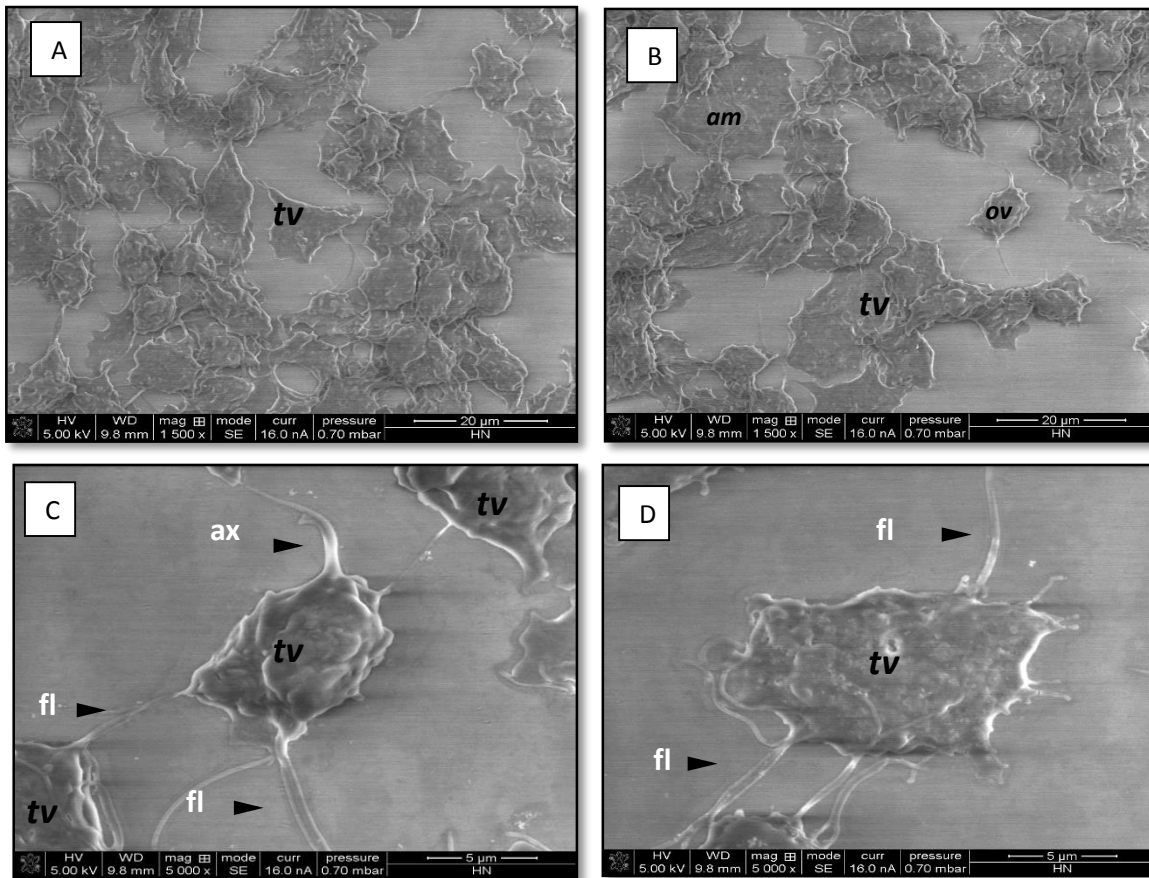


Figura 5. Morfología del aislado HGMN01 de *T. vaginalis* en ausencia de Zn^{2+} . A) Agrupaciones de *Trichomona vaginalis* (tv) sobre superficie de vidrio mostrando morfología ovoide (OV) y ameboide (AM), 1500x B) Morfología ameboide al contacto de la superficie e interdigitación entre los parásitos 1500x C) Morfología ovoide, se observa la presencia del axostilo (ax) y flagelos D) Morfología ameboide, se observa flagelos adosados al cuerpo y flagelos [Carrillo y cols.] en interconexión con otro parásito 5000x.

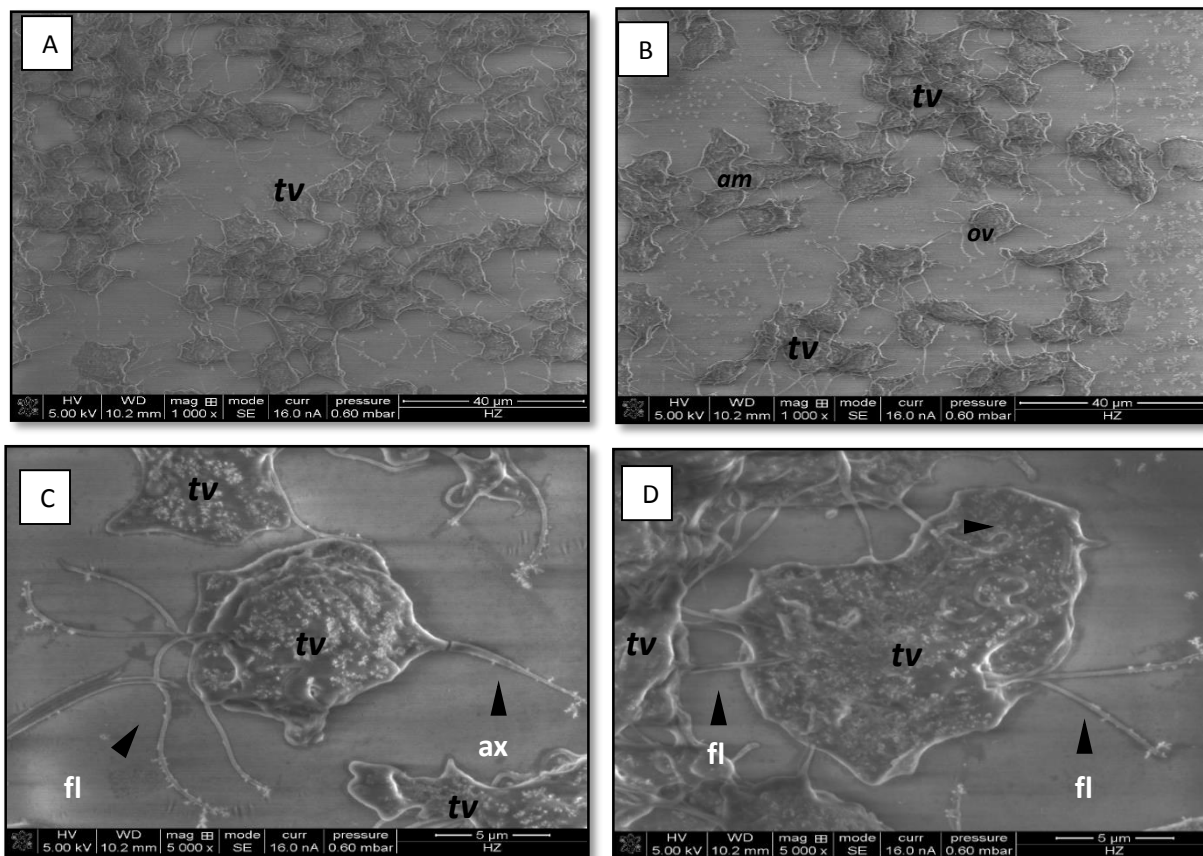


Figura 6. Morfología del aislado HGMN01 de *T. vaginalis* en presencia de Zn^{2+} . A) Agrupaciones de *Trichomona vaginalis* (tv) sobre superficie de vidrio mostrando morfología ovoide (ov) y ameboide (am), 1000x B) Morfología ovoide (ov) y ameboide (am) al contacto de la superficie e interdigitación entre los parásitos 1000x C) Morfología ovoide, se observa la presencia del axostilo (ax) y flagelos 5000x D) Morfología ameboide, se observa flagelos adosados al cuerpo y flagelos en interconexión con otro parásito 5000x.

12.1.2. Interacción de *T. vaginalis* con células DU145 en presencia de Zn^{2+}

La interacción de *T. vaginalis* del aislado HGMN01 con células prostáticas DU145 fue evaluada por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). La morfología del parásito al contacto con DU145 en presencia de Zn^{2+} es similar a la morfología que presenta *T. vaginalis* del aislado CNCD145 en interacción con células DU145 en ausencia de Zn^{2+} . La morfología del parásito muestra ser ovoide y no completa la transformación ameboide (**figura 7**). Después de 5 min de incubación *T. vaginalis* muestra adherencia hacia las células DU145 observándose la interacción del parásito a su célula blanco en presencia del catión. Se continuó este experimento evaluando la interacción del parásito por microscopía confocal en presencia y ausencia de Zn^{2+} con células DU145 a los 15 min, 1 h y 8 h de incubación, observándose que sigue conservando su morfología ovoide y conforme pasa el tiempo se observa daño a la membrana (**Anexo 1**).

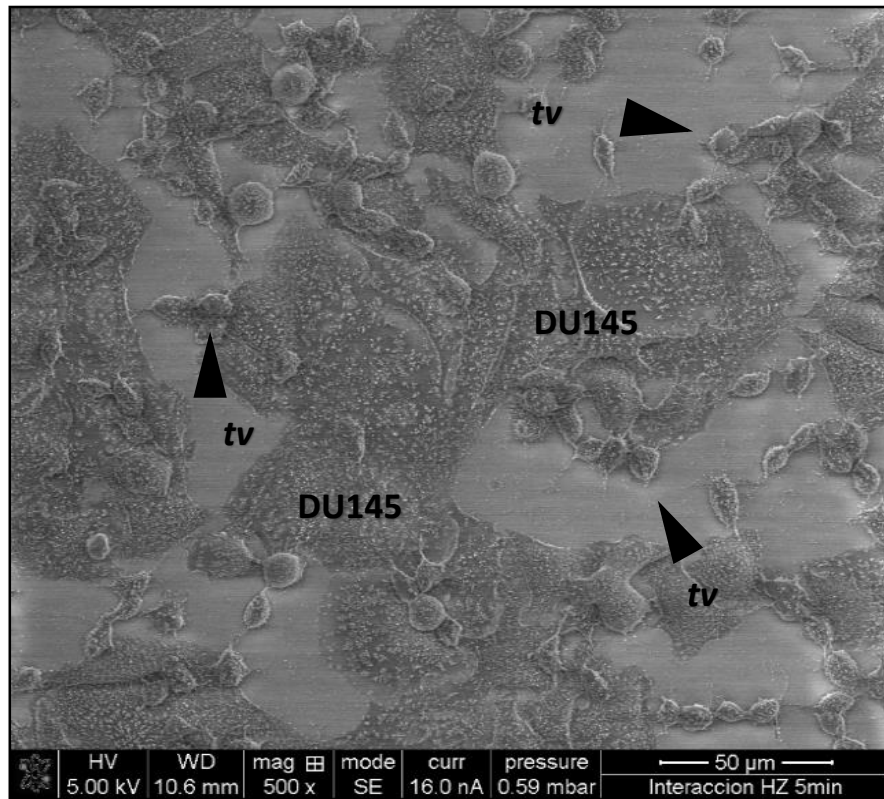


Figura 7. Morfología de la Interacción de *T. vaginalis* (HGMN01) con células prostáticas DU145. Los parásitos fueron incubados por 5 min con células DU145 en presencia de Zn^{2+} . Fotomicrografía de barrido de la Interacción de *T. vaginalis* con células DU145 manteniendo una morfología ovoide 500x.

12.2. Efecto del Zn^{2+} en la adhesión del aislado HGMN01 de *T. vaginalis* durante la interacción con células DU145

El efecto del Zn^{2+} en la adhesión de *T. vaginalis* se analizó en el aislado HGMN01 de *T. vaginalis* durante la interacción con células prostáticas DU145.

En los experimentos se adicionó Zn^{2+} en el medio de interacción de los parásitos. Se utilizaron parásitos del aislado HGMN01 cultivados en ausencia de Zn^{2+} en medio de interacción sin Zn^{2+} (HNN) y se comparó con parásitos del mismo aislado cultivados en presencia de Zn^{2+} y en medio de interacción con Zn^{2+} (HZZ) para evaluar el efecto del catión en esta propiedad de virulencia. La adhesión de los parásitos se evaluó a los 30 min y 1 h después de su interacción con células DU145.

En la figura 8 se muestran imágenes obtenidas por contraste de fase mediante Microscopía confocal; para cada condición (HNN y HZZ) se realizó un conteo visual de cada campo obtenido para cada tiempo evaluado. La condición HNN fue considerado como el 100% de adhesión, para comparar la adhesión de parásitos en la condición HZZ. Los niveles de adhesión del aislado HGMN01 a las células DU145 disminuyeron en presencia del catión para ambos tiempos; observándose un 45 % de adhesión a los 30 min y un 38 % a la hora de interacción en presencia de Zn^{2+} (**Figura 9**). En conclusión se observó que el Zn^{2+} afecta los niveles de adhesión del aislado HGMN01 independientemente del tiempo. En el anexo 2 se observan imágenes de acercamientos a zonas de interacción de *T. vaginalis* hacia células DU145 en presencia y ausencia de Zn^{2+} .

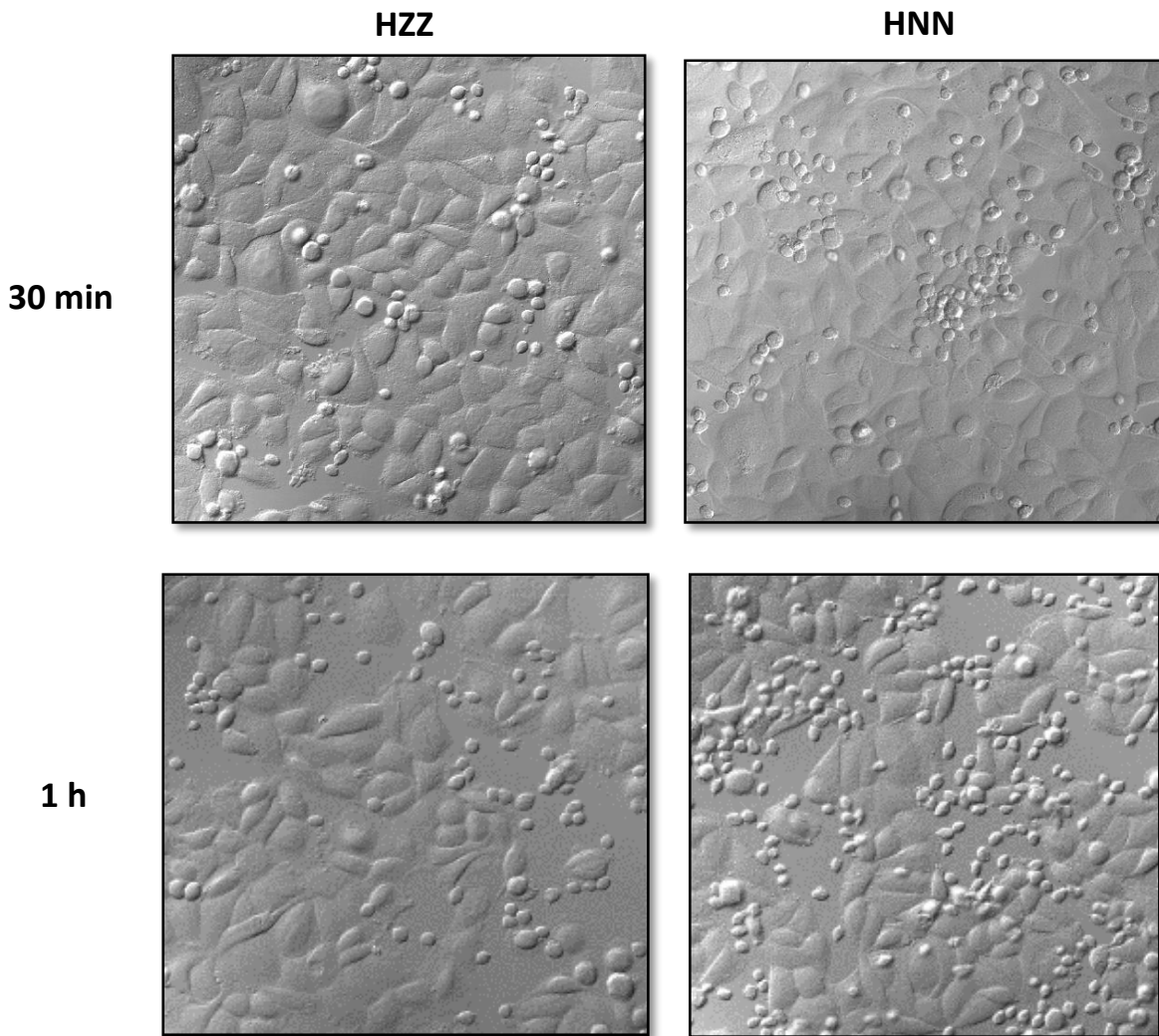


Figura 8. Interacción de *T. vaginalis* (HGMN01) con células prostáticas DU145 en presencia de Zn^{2+} . Los parásitos fueron cocultivados por 30 min y 1 h con células DU145 en las condiciones HNN y HZZ. Se muestran imágenes representativas de experimentos realizados por duplicado. 40x

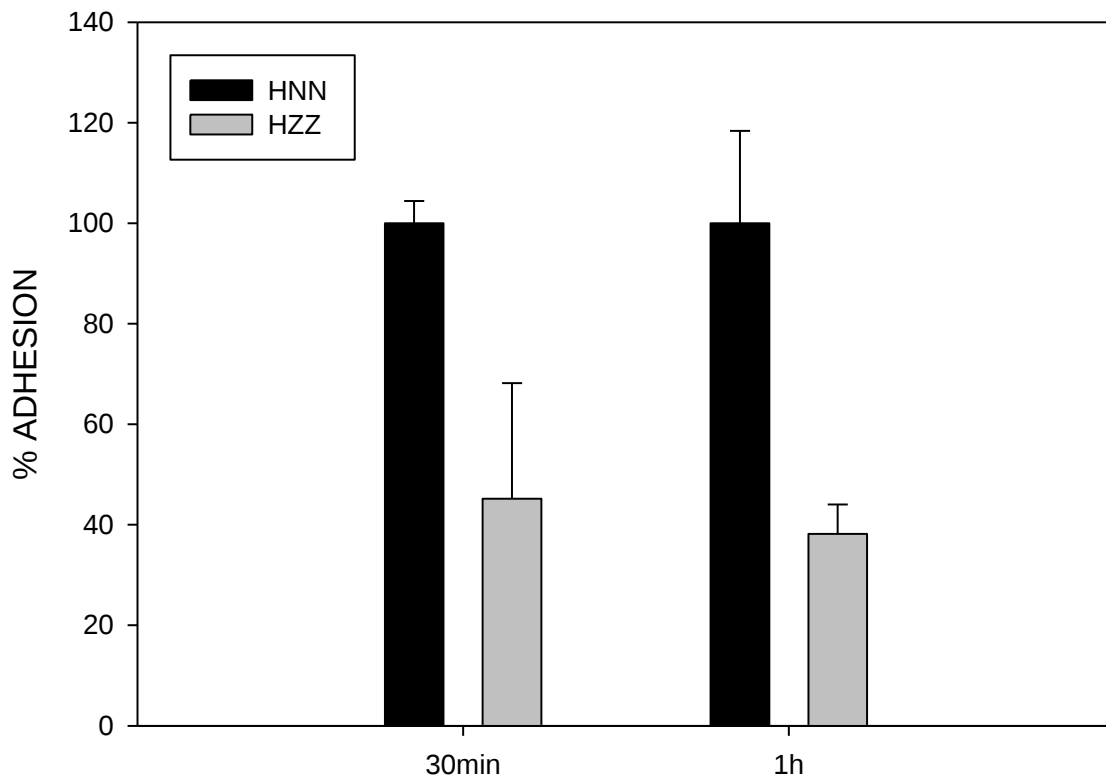


Figura 9. Efecto del Zn^{2+} en la adhesión de *T. vaginalis* HGMN01 durante la interacción con células prostáticas DU145. Parásitos cultivados en ausencia (HN) o en presencia de Zn^{2+} (HZ) fueron colocados en medio de interacción normal (HNN) o en medio de interacción con Zn^{2+} (HZZ) y puestos en co-cultivo por 30 min y 1 h con células DU145

12.3. Efecto del Zn^{2+} en la citotoxicidad de *T. vaginalis* en células HeLa y DU145

Se analizó el efecto del Zn^{2+} en la citotoxicidad de dos aislados de *T. vaginalis*, uno proveniente de una mujer (CNCD147) y otro proveniente de un hombre infectado (HGMN01) utilizando las líneas celulares HeLa y DU145.

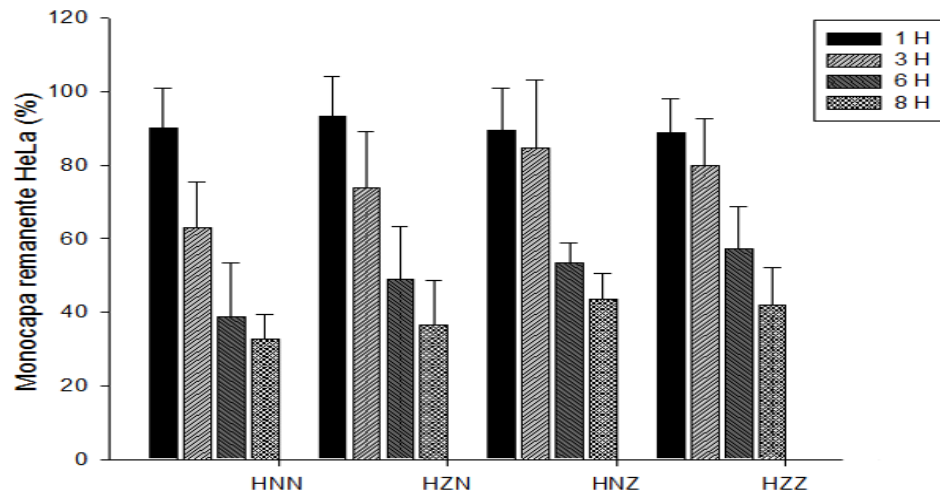
Anteriormente se reportó la citotoxicidad del aislado CNCD147 hacia células HeLa y DU145, por lo que estos datos fueron utilizados como referencia [Vazquez-Carrillo y cols. 2011]. En este estudio se evaluó el efecto del Zn^{2+} sobre esta propiedad de virulencia, a diferencia de estudios anteriores, se incluyó el Zn^{2+} en el medio de interacción de los parásitos. Parásitos del aislado HGMN01 cultivados en ausencia de Zn^{2+} fueron colocados en medio de interacción con Zn^{2+} (HNZ) o en medio de interacción sin Zn^{2+} (HNN). Adicionalmente, parásitos del mismo aislado cultivados en presencia de Zn^{2+} fueron colocados en medio de interacción con Zn^{2+} (HZZ) o en medio de interacción sin Zn^{2+} (HZN). Los parásitos cultivados en las cuatro distintas condiciones descritas anteriormente, fueron cocultivados con células HeLa (**Figura 10, panel A**) y células DU145 (**Figura 10, panel B**) por 1, 3, 6 y 8 horas de interacción.

Los niveles de citotoxicidad del aislado HGMN01 hacia células HeLa aumentaron en función de los tiempos de interacción, observándose que conforme pasa el tiempo aumenta el daño hacia la monocapa (**Figura 10, panel A**). Sin embargo, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en el grado de citotoxicidad a 1 y 3 h en las diferentes condiciones evaluadas respecto a sus controles. A partir de las 6 y 8 horas de interacción, la citotoxicidad aumento hasta un 65% (**Figura 10, panel A**). De acuerdo a los análisis estadísticos realizados, únicamente encontramos diferencias significativas ($p < 0.001$) a las 6 y 8 horas de interacción con respecto a los controles. Cabe mencionar que no encontramos diferencias significativas entre los distintos tratamientos empleados, es decir, la presencia del Zn^{2+} en el medio de interacción no influyó en esta propiedad de virulencia de este aislado durante su interacción con células HeLa.

Adicionalmente, los parásitos cultivados en las cuatro condiciones descritas anteriormente (HNN, HZN, HNZ y HZZ), fueron cocultivados con células DU145 (**Figura 10, panel B**) por 1, 3, 6 y 8 horas. La citotoxicidad aumento en función de los tiempos (**Figura 10, panel B**) A 1

y 3 h de interacción, no observamos diferencias estadísticamente significativas en el grado de citotoxicidad de las distintas condiciones evaluadas respecto a sus controles. A las 6 y 8 h de interacción, se observó un aumento en los niveles de citotoxicidad de hasta un 70%, las diferencias significativas ($p < 0.001$) se encontraron a las 6 y 8 horas de interacción con respecto a los controles (**Figura 10 panel B**). Es importante mencionar que no se encontraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos empleados, lo que implica que la presencia del Zn^{2+} en el medio de interacción no influyó en esta propiedad de virulencia de este aislado durante la interacción con células DU145.

A



B

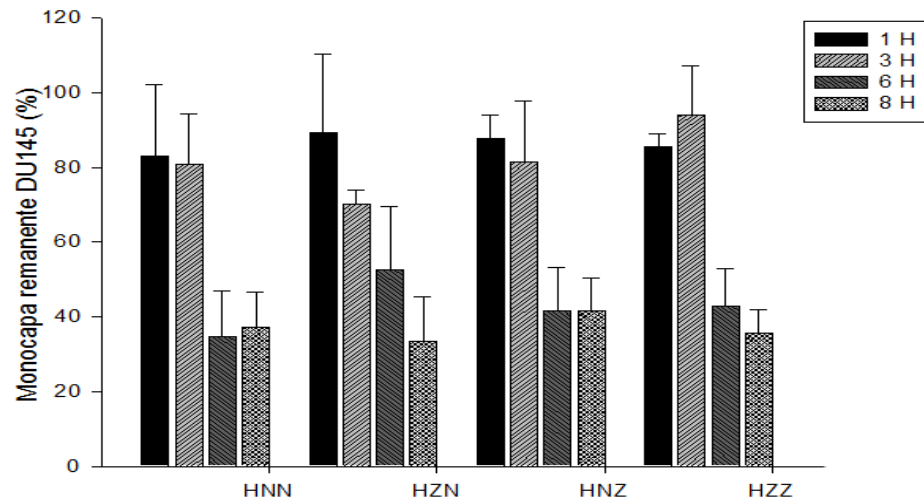


Figura 10. Efecto del Zn^{2+} en la citotoxicidad del aislado HGMN01 de *T. vaginalis* durante su interacción con células HeLa (A) y células DU145 (B). Parásitos cultivados en ausencia (HN) o en presencia de Zn^{2+} (HZ) colocados en medio de interacción normal (HNN y HZN, respectivamente) o en un medio de interacción con Zn^{2+} (HNZ y HZZ, respectivamente) y cocultivos por 1, 3, 6 y 8 h con células HeLa (A) y células DU145 (B). Los datos de la citotoxicidad de *T. vaginalis* hacia células HeLa y DU145 fueron normalizados a 100% para su comparación. El promedio de los porcentajes de monocapa remanente de tres experimentos independientes están representados por las barras. La desviación estándar de tres experimentos independientes, cada uno con tres réplicas experimentales se incluye en las gráficas representado por una línea de error (T). Los asteriscos (*) indican la existencia de diferencia significativa de cada una de las condiciones analizadas con su control respectivo (monocapa sin parásitos) ($p < 0.001$).

Por otra parte, los parásitos del aislado CNCD147 fueron cultivados en ausencia de Zn^{2+} y colocados en medio de interacción con Zn^{2+} (MNZ) o en medio de interacción sin Zn^{2+} (MNN). Adicionalmente, parásitos de este aislado fueron cultivados en presencia de Zn^{2+} y colocados en medio de interacción con Zn^{2+} (MZZ) o en medio de interacción sin Zn^{2+} (MZN). Estas condiciones fueron utilizadas para realizar ensayos de interacción con células HeLa (**Figura 11, panel A**) y células DU145 (**Figura 11, panel B**) a 1, 3, 6 y 8 horas. El grado de citotoxicidad del aislado CNCD147 hacia células HeLa aumento en función del tiempo de interacción, la citotoxicidad fue similar a la 1 y 3 h después de la interacción en todas las condiciones no encontrándose diferencias estadísticamente significativas (**Figura 11, panel A**). Al igual que en el aislado HGMN01, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en el grado de citotoxicidad de las diferentes condiciones evaluadas respecto a sus controles a 1 y 3 horas de interacción.

La citotoxicidad a las 6 y 8 h de interacción disminuyeron por la presencia del catión durante la interacción (**Figura 11, panel A**), el análisis estadístico de los datos evidenciaron diferencias significativas ($p < 0.001$) a las 6 y 8 h de interacción con respecto a los controles y además se encontró una diferencia significativa ($p < 0.010$) en el grado de citotoxicidad de los parásitos cultivados en presencia de Zn^{2+} en un medio de interacción con Zn^{2+} (MZZ) con respecto a los parásitos en un medio de interacción en ausencia de Zn^{2+} (MZN) y con respecto a los parásitos cultivados en ausencia de Zn^{2+} en un medio de interacción en ausencia de Zn^{2+} (MNN) ($p < 0.009$) (**Figura 11, panel A**).

Al comparar el grado de citotoxicidad de los parásitos cultivados en ausencia de Zn^{2+} en un medio de interacción en ausencia del catión (MNN) con respecto a los parásitos crecidos en ausencia de Zn^{2+} en un medio de interacción en presencia de Zn^{2+} (MNZ) también mostraron diferencias significativas ($p < 0.013$) (**Figura 11, panel A**). La citotoxicidad disminuyó a las 8 h de interacción con las células HeLa cuando el medio de interacción contenía Zn^{2+} observándose hasta un 35 % en los niveles de citotoxicidad (**Figura 11, panel A**). Por lo que para el caso del aislado CNCD147, la presencia del catión en el medio de interacción afectó

el grado de citotoxicidad de los parásitos cultivados en presencia de Zn^{2+} hacia las células HeLa.

De la misma manera, parásitos cultivados bajo las mismas condiciones anteriores (MNN, MZN, MNZ y MZZ), se interactuaron por 1, 3, 6 y 8 horas con células DU145 (**Figura 11, panel B**). La citotoxicidad fue similar a la 1 y 3 h después de la interacción en todas las condiciones no encontrándose diferencias estadísticamente significativas (**Figura 11, panel B**). Por otro lado, a las 6 horas de interacción, la citotoxicidad se incrementaron hasta un 70% (**Figura 11, panel B**), mientras que a las 8 h de interacción, se observó hasta un 75 % de citotoxicidad (**Figura 11, panel B**). El análisis estadístico indica que existen diferencias significativas ($p < 0.001$) solamente a las 6 y 8 h de interacción de cada una de las condiciones evaluadas con sus respectivos controles (**Figura 11, panel B**). Es importante mencionar que no encontramos diferencias significativas entre los distintos tratamientos empleados, es decir, la presencia del Zn^{2+} en el medio de interacción no influyó en la citotoxicidad del aislado CNCD147 durante la interacción con células DU145. Los resultados obtenidos, indicaron que la citotoxicidad se vio afectada por la presencia del Zn^{2+} tanto en el medio de interacción como en el cultivo de los parásitos. El Zn^{2+} presente en el medio de interacción afectó la citotoxicidad de los parásitos de forma gradual y negativa, *T. vaginalis* presentó un mayor efecto citotóxico en un ambiente libre del catión con respecto a un microambiente con presencia de Zn^{2+} .

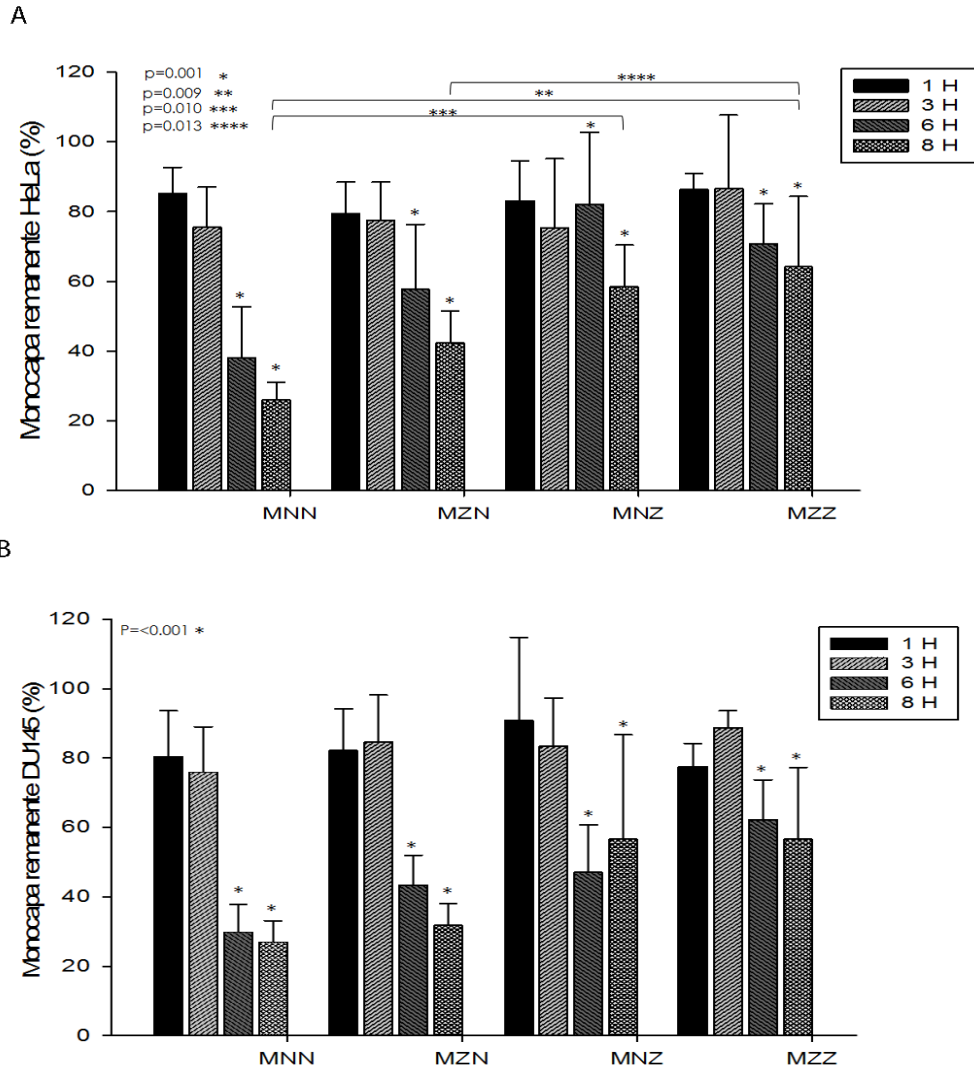


Figura 11. Efecto del Zn^{2+} en la citotoxicidad del aislado CNCD147 de *T. vaginalis* durante su interacción con células HeLa (A) y células DU145 (B). Parásitos cultivados en ausencia (MN) o en presencia de Zn^{2+} (MZ) fueron colocados en medio de interacción normal (MNN y MZN, respectivamente) o en un medio de interacción con Zn^{2+} (MNZ y MZZ, respectivamente) e interaccionados por 1, 3, 6 y 8 h con células HeLa (A) o células DU145 (B). Los datos de la citotoxicidad de *T. vaginalis* hacia células HeLa y DU145 fueron normalizados a 100% para comparación. El promedio de los porcentajes de monocapa remanente de tres experimentos independientes están representados por las barras. La desviación estándar de tres experimentos independientes, cada uno con tres réplicas experimentales se incluye en las gráficas representado por una línea de error (T). Los asteriscos (*) indican la existencia de diferencia significativa de cada una de las condiciones analizadas con su control respectivo (monocapa sin parásitos) ($p < 0.001$). Se indica la diferencia significativa entre las condiciones de interacción hacia células HeLa a las 8 h, (**)(***)(****) ($p < 0.009$, $p < 0.0010$, $p < 0.0013$, respectivamente)

A través de análisis estadísticos se comparó el grado de citotoxicidad entre las distintas líneas celulares y aislados de *T. vaginalis*, solo se encontraron diferencias significativas entre los aislados CNCD147 y HGMN01 cultivados en presencia de Zn^{2+} en un medio de interacción en presencia del catión (MZZ y HZZ, respectivamente) cocultivados con células (HeLa para MZZ y DU145 para HZZ) presentaron distintos grados de citotoxicidad a las 8 horas de interacción. MZZ presentó una citotoxicidad del 35% hacia células HeLa a las 8 horas de interacción, mientras que HZZ presentó un valor de 65% de citotoxicidad hacia células DU145 al mismo tiempo de interacción. De acuerdo con los análisis estadísticos, existe una diferencia significativa entre estos valores ($p < 0.005$) (**Figura 12**).

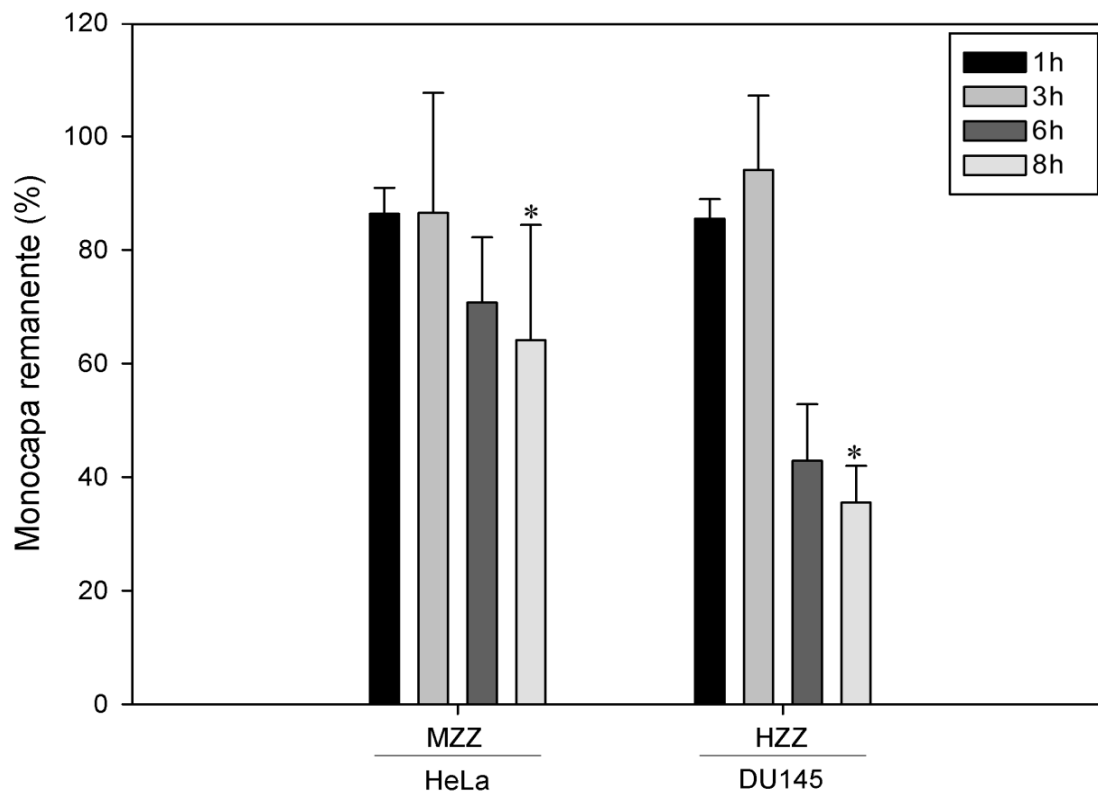


Figura 12. Análisis comparativo del efecto del Zn^{2+} en la citotoxicidad de los aislados CNCD147 y HGMN01 en interacción con sus células hospederas. Parásitos del aislado CNCD147 crecidos en presencia de Zn^{2+} colocados en un medio de interacción con Zn^{2+} (MZZ), fueron cocultivados con la línea celular HeLa por 1, 3, 6 y 8 horas. Parásitos del aislado HGMN01 crecidos en presencia de Zn^{2+} colocados en un medio de interacción con Zn^{2+} (HZZ), fueron cocultivados con la línea celular DU145 por 1, 3, 6 y 8 horas. Las barras representan el promedio de los valores experimentales de tres réplicas biológicas. Los errores estándares están indicados en las barras representado por la línea de error (T). Los asteriscos (*) indican las diferencias significativas entre MZZ y HZZ a las 8 horas de interacción con células HeLa y DU145, respectivamente ($p < 0.005$).

12.4. Efecto del Zn^{2+} en la expresión de genes de dos aislados de *T. vaginalis* durante su interacción con células DU145

A partir de RNAm de *T. vaginalis* de los aislados HGMN01 y CNCD147 crecidos en presencia (1.6mM) y en ausencia de Zn^{2+} , en medio de interacción sin Zn^{2+} y con Zn^{2+} para ambos aislados, fueron cocultivados con células DU145 en un periodo de 8h. El cDNA se utilizó para amplificar mediante RT-PCR semicuantitativa fragmentos de los genes *ap65*, *ap33*, *enolasa*, *gapdh*, *tvcp39*, *mp50*, *tvfim1* y β -*tubulina* para determinar el efecto del Zn^{2+} durante la interacción con células DU145 (**Figura 13 y 14, panel A**). Los valores de intensidad se normalizaron con el gen constitutivo β -*tubulina* de la condición control (ausencia de Zn^{2+}) y fueron utilizados como referencia para las otras condiciones asignándole el valor de uno. De acuerdo con el análisis densitométrico para el aislado HGMN01 de *T. vaginalis* los niveles relativos de RNAm de los genes *ap65*, *gapdh*, *tvcp39*, *mp50* y *tvfim1* muestran una regulación positiva en presencia del catión, los genes *ap65*, *mp50* y *tvfim1* presentan 2 veces más la expresión de su transcrito; mientras que para *gapdh* y *tvcp39* solo se observa un ligero incremento con respecto al grupo control. En el caso de *ap33* y *enolasa* existe una disminución de 0.2 y 0.6 veces en la expresión de los transcritos en presencia del catión respecto a su control (**Figura 13, panel B**).

La expresión de estos genes durante la interacción con células DU145 en presencia de Zn^{2+} colocados en medio de interacción con Zn^{2+} muestra un incremento de 2 veces la expresión de *gapdh* respecto a su control, para los demás genes se observó una disminución en la expresión de los transcritos, para *ap65*, *ap33*, *enolasa*, *gapdh*, *mp50*, *tvcp39* y *tvfim1*, los niveles de los transcritos disminuyeron 0.7, 0.8, 0.1, 0.3, 0.9 y 0.7 veces respectivamente con respecto a su expresión basal (**Figura 14, panel B**); por tanto la presencia de Zn^{2+} y el contacto con células DU145 disminuye la expresión de la mayoría de los genes, sugiriendo un efecto negativo en la expresión de los genes en presencia de Zn^{2+} durante el evento de interacción. En la muestra control (RT-) no se observó ningún amplicon, lo que indica que la amplificación de los genes *ap65*, *ap33*, *enolasa*, *gapdh*, *tvcp39*, *mp50*, *tvfim1* y β -*tubulina* corresponden a los transcritos presentes en las distintas muestras analizadas (**Figuras 13 y 14, panel A**).

Los transcritos obtenidos de RT-PCR del aislado CNCD147 de *T. vaginalis* fueron analizados en geles de agarosa (**Figura 15 y 16, panel A**). De acuerdo al análisis densitométrico los niveles relativos de expresión de los genes *tvcp39*, *mp50* y *tvfim1* fueron regulados de manera positiva en presencia de Zn^{2+} ; *tvcp39* incrementó 1.8 veces la expresión del transcrito, para *mp50* se observó un incremento de 2.5 veces en la expresión del transcrito y *tvfim1* aumentó 5.5 veces respecto a su control. En el caso de los genes *ap33*, *gapdh* y *enolasa* fueron regulados de manera negativa, con respecto a su expresión basal, para *ap65* no se observaron diferencias en la expresión del gen respecto a su control (**Figura 15, panel B**).

Comparando la expresión de los transcritos de ambos aislados se observó que el efecto del Zn^{2+} incrementó la expresión en los genes *mp50*, *tvcp39* y *tvfim1*, sin embargo, para el aislado HGMN01 también hay una expresión positiva de los genes *ap65* y *gapdh* sugiriendo un comportamiento diferente del aislado en presencia del catión (**Figura 14, panel B**). La expresión de genes *ap65*, *ap33*, *gapdh*, *enolasa* y *tvcp39* durante la interacción con células DU145 del aislado CNCD147 disminuyó 0.8, 0.7, 0.95, 0.7 y 0.85 veces respectivamente, en su expresión basal, para el caso de *mp50* y *tvfim1* no se observó niveles relativos de expresión respecto a su control en presencia del catión y en contacto con células DU145. Al comparar la expresión de estos genes con el aislado HGMN01 se pudo observar un comportamiento similar, la expresión de los genes disminuyó en presencia de Zn^{2+} durante el evento de interacción (**Figuras 14 y 16**), indicando que el efecto del catión en el proceso de interacción tiene un efecto negativo en la expresión de los genes. En la muestra control (RT-) no se observó ningún amplicón lo que indica que la amplificación de los genes *ap65*, *ap33*, *enolasa*, *gapdh*, *tvcp39*, *mp50*, *tvfim1* y *β -tubulina* corresponden a los transcritos presentes en las distintas muestras analizadas (**Figuras 15 y 16 panel A**). Como control de carga se utilizó el transcrito de *β -tubulina* de 112 pb; la cantidad de este transcrito no fue afectado por la presencia de Zn^{2+} .

Adicionalmente se comparó la expresión de los genes de cada uno de los aislados crecidos en medio con Zn^{2+} y durante el evento de interacción con células DU145 en presencia del catión. Para el aislado HGMN01 de *T. vaginalis* se observó que los niveles

relativos de RNAm de *gapdh* y *enolasa* en el proceso de interacción con células DU145 en presencia de Zn^{2+} se encuentran regulados de manera positiva respecto a los parásitos crecidos en Zn^{2+} , por lo tanto se puede sugerir la regulación positiva de los transcritos cuando existe el contacto con células DU145 en presencia del catión **(Figura 17 panel A)**. Para el aislado CNCD147 se observó que la expresión de los transcritos de todos los genes fueron regulados de manera negativa durante la interacción con células DU145 respecto a los parásitos crecidos en Zn^{2+} , por lo que para el aislado CNCD147 el Zn^{2+} se tuvo un efecto negativo en la expresión de genes durante su interacción con células DU145, sugiriendo un comportamiento diferente en la regulación de genes en presencia de Zn^{2+} y durante el contacto celular **(Figura 17 panel B)**.

Debido a que las muestras utilizadas se obtuvieron a partir de la interacción de *T. vaginalis* con células DU145 fue necesario verificar la especificidad de los oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes *gapdh* y *enolasa*, ya que estos genes se expresan en humanos. A partir de RNAm de células DU145 se sintetizó cDNA para amplificar fragmentos de los genes *gapdh* y *enolasa* de *T. vaginalis* mediante RT-PCR semicuantitativa; como control se utilizó el gen *gapdh* de humano en el que se observó amplificación del gen **(Figura 18)**. Se observó que los oligonucleótidos para *gapdh* y *enolasa* de *T. vaginalis* no amplificaron a partir de ADN de células DU145 lo que nos indica son específicos de *T. vaginalis* **(Figura 18)**.

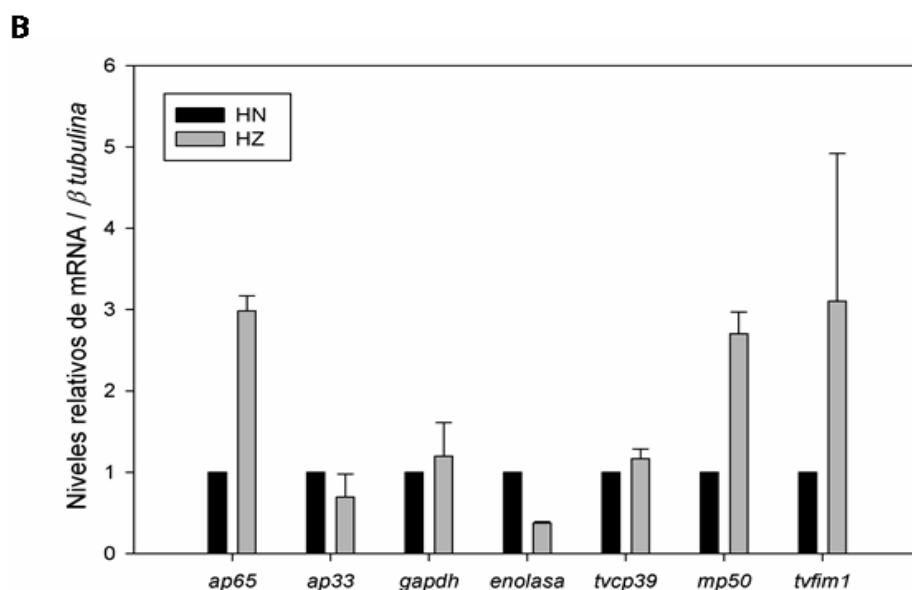
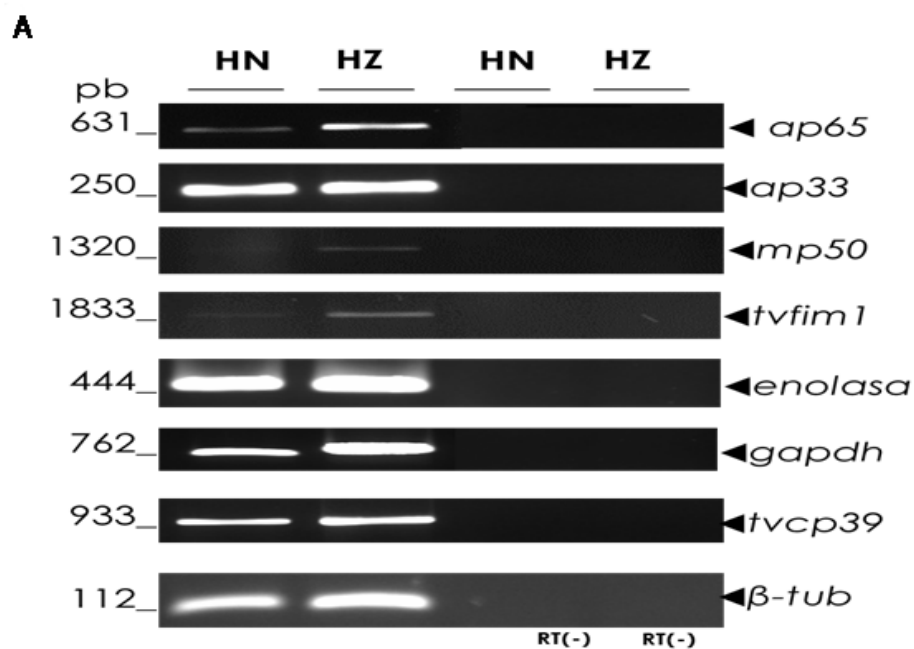


Figura 13: Análisis semicuantitativo en la expresión de los transcritos de *T. vaginalis* aislado HGMN01 **A)** Perfil de expresión de los genes *ap65*, *ap33*, *gapdh*, *enolasa*, *tvcp39*, *mp50* y *tvfim1* en ausencia (HN) y presencia (HZ) de Zn^{2+} en geles de agarosa al 1 y 2 %. Los productos se visualizaron con Red-Gel en el fotodocumentador Chemi-Doc (Bio-Rad) **B)** Análisis densitométrico de la expresión de los genes *ap65*, *ap33*, *gapdh*, *enolasa*, *tvcp39*, *mp50* y *tvfim1* de parásitos del aislado HGMN01 cultivados en ausencia (HN)(barras oscuras) y en presencia (HZ)(barras grises) de Zn^{2+} . La desviación estándar se representa en las gráficas con una línea de error (T).

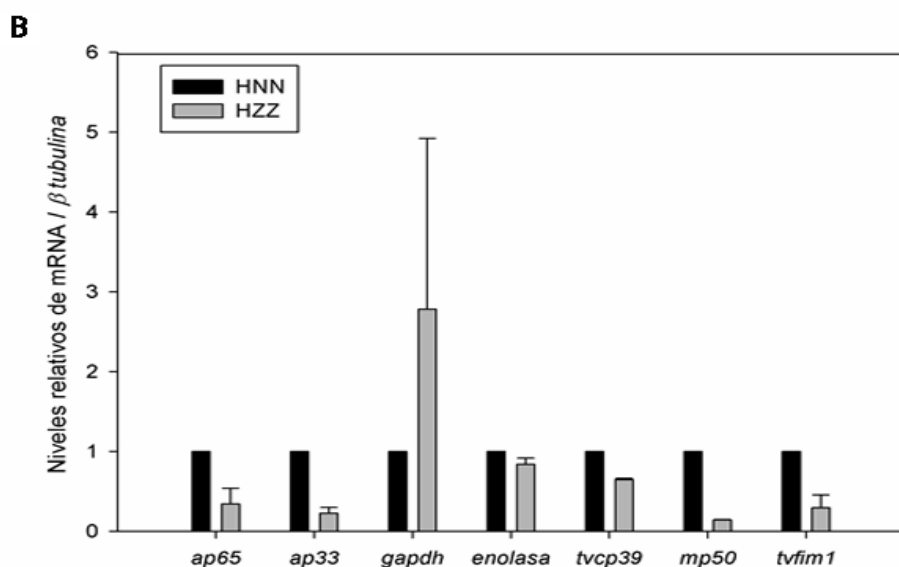
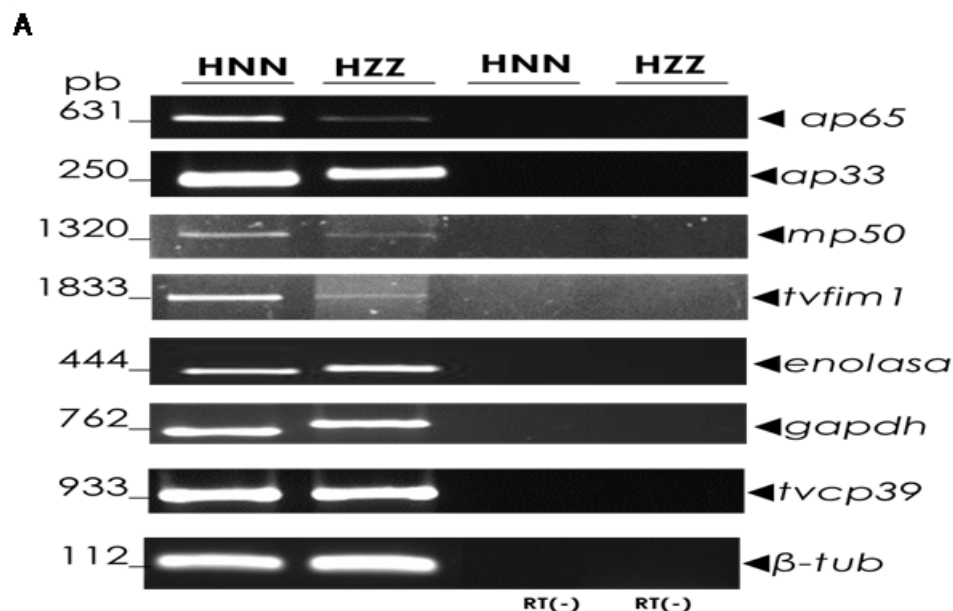


Figura 14: Análisis semicuantitativo de la expresión de los transcritos de *T. vaginalis* aislado HGMN01 durante la interacción con células DU145. A) Perfil de expresión de los genes *ap65*, *ap33*, *gapdh*, *enolasa*, *tvcp39*, *mp50* y *tvfim1* en ausencia (HNN) y presencia (HZZ) de Zn^{2+} en geles de agarosa al 1 y 2 %. Los productos se visualizaron con Red-Gel en el fotodocumentador Chemi-Doc (Bio-Rad) **B)** Análisis densitométrico de la expresión de los genes *ap65*, *ap33*, *gapdh*, *enolasa*, *tvcp39*, *mp50* y *tvfim1* de parásitos del aislado HGMN01 cultivados en ausencia y en presencia de Zn^{2+} colocados en medio de interacción normal (HNN) (barras oscuras) y en medio de interacción con Zn^{2+} (HZZ) (barras grises) cocultivados con células DU145 por 8 horas. La desviación estándar se representa en las gráficas con una línea de error (T).

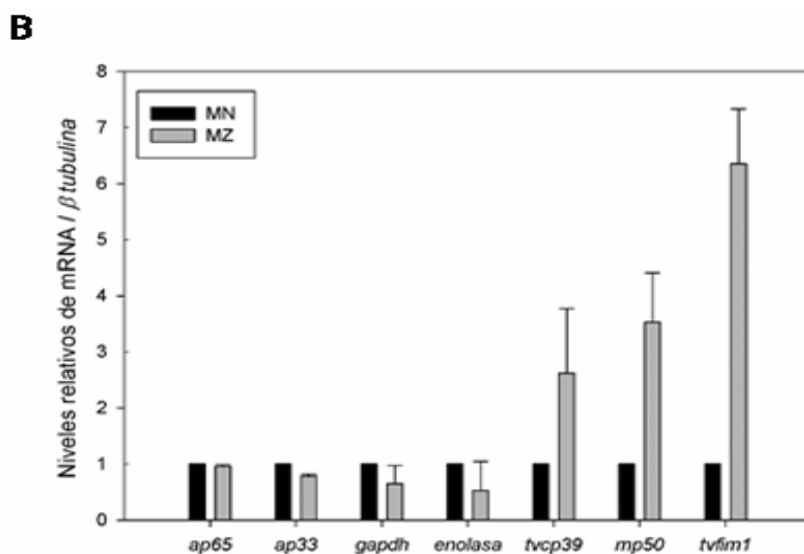
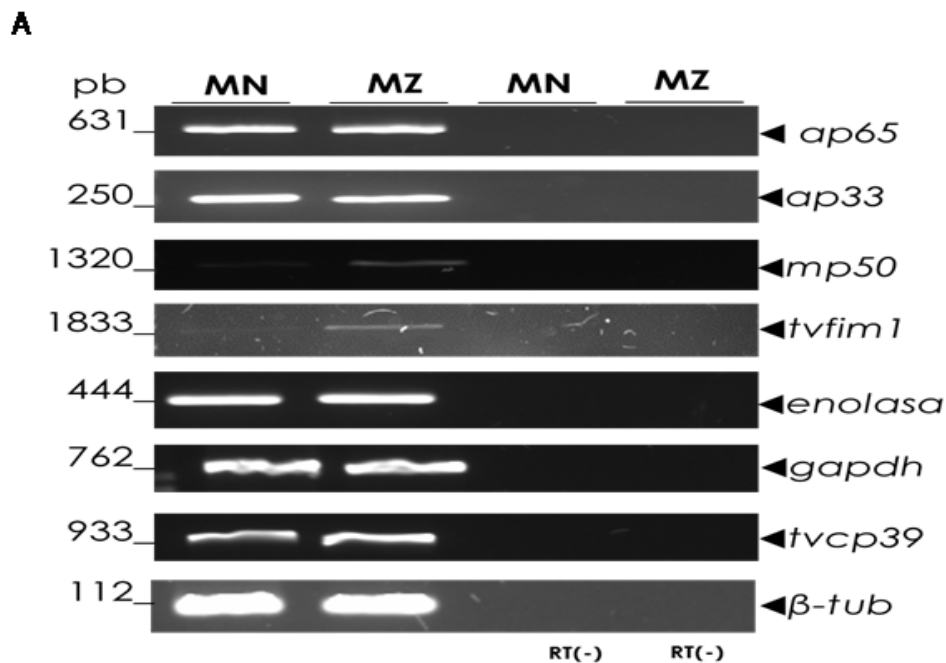


Figura 15: Análisis semicuantitativo de los niveles de expresión de los transcritos de *T. vaginalis* aislado CNCD147 **A)** Perfil de expresión de los genes *ap65*, *ap33*, *gapdh*, *enolasa*, *tvcp39*, *mp50* y *tvfim1* en ausencia (MN) y presencia (MZ) de Zn^{2+} en geles de agarosa al 1 y 2 %. Los productos se visualizaron con Red-Gel en el fotodocumentador Chemi-Doc (Bio-Rad) **B)** Análisis densitométrico de la expresión de los genes *ap65*, *ap33*, *gapdh*, *enolasa*, *tvcp39*, *mp50* y *tvfim1* de parásitos del aislado CNCD147 cultivados en ausencia (MN)(barras oscuras) y en presencia (MZ)(barras grises) de Zn^{2+} . La desviación estándar se representa en las gráficas con una línea de error (T).

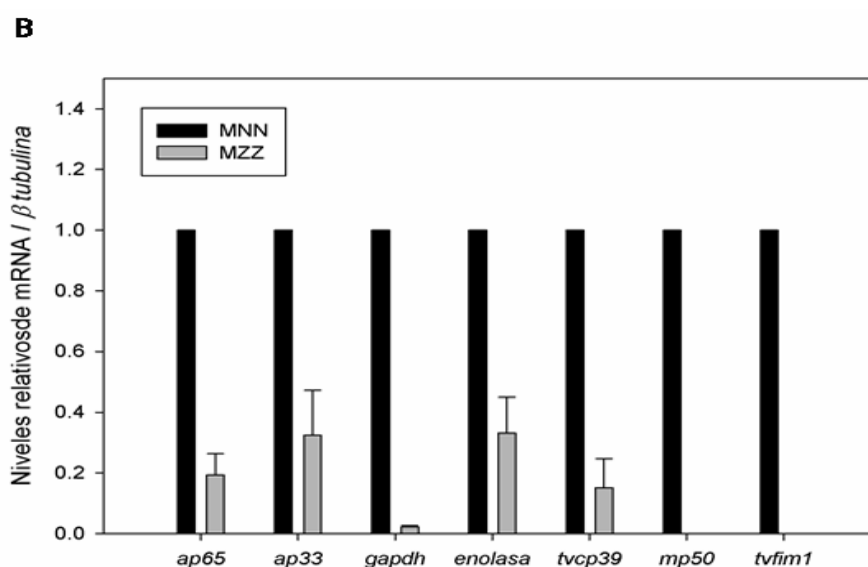
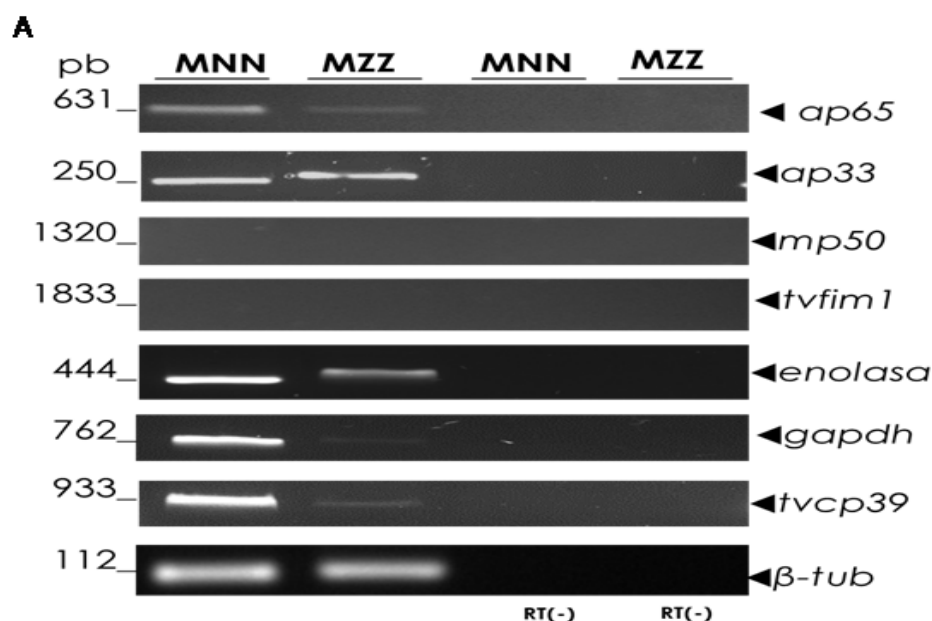


Figura 16: Análisis semicuantitativo de la expresión de los transcritos de *T. vaginalis* aislado CNCD147 durante la interacción con células DU145. A) Perfil de expresión de los genes *ap65*, *ap33*, *gapdh*, *enolasa*, *tvcp39*, *mp50* y *tvfim1* en ausencia (MN) y presencia (MZ) de Zn^{2+} durante la interacción con células DU145, en geles de agarosa al 1 y 2 %. Los productos se visualizaron con Red-Gel en el fotodocumentador Chemi-Doc (Bio-Rad) **B)** Análisis densitométrico de la expresión de los genes *ap65*, *ap33*, *gapdh*, *enolasa*, *tvcp39*, *mp50* y *tvfim1* de parásitos del aislado CNCD147 cultivados en ausencia y en presencia de Zn^{2+} colocados en medio de interacción normal (MNN) (barras oscuras) y en medio de interacción conteniendo Zn^{2+} (MZZ) (barras grises) fueron cocultivados con células DU145 por 8 horas. La desviación estándar se representa en las gráficas con una línea de error (T).

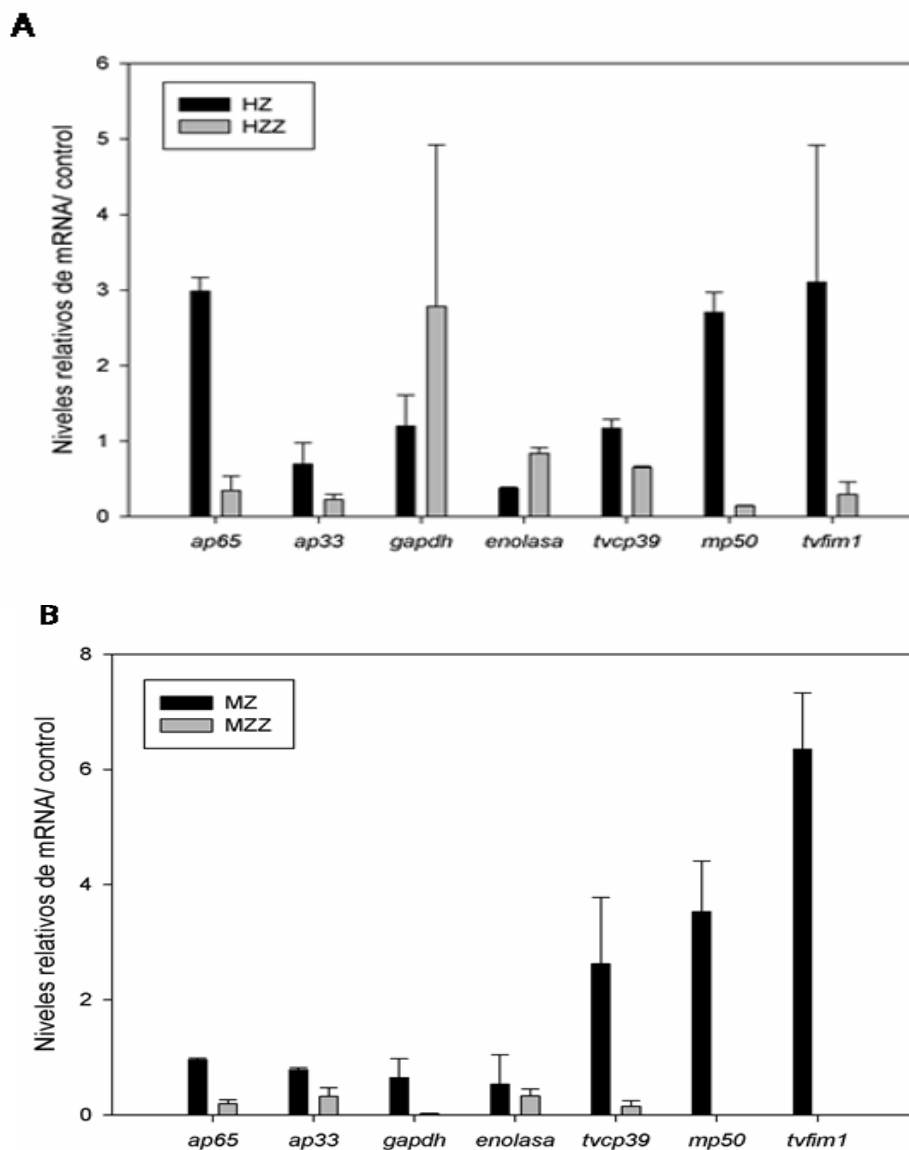


Figura 17: Análisis comparativo de la expresión de los transcritos de dos aislados de *T. vaginalis* expresados durante su interacción con células DU145. A) Análisis densitométrico de la expresión de los genes *ap65*, *ap33*, *gapdh*, *enolasa*, *tvcp39*, *mp50* y *tvfim1* de parásitos del aislado HGMN01 cultivados en presencia de Zn^{2+} (HZ) (barras negras) y de parásitos del mismo aislado cultivado en presencia de Zn^{2+} colocados en medio de interacción en presencia de Zn^{2+} cocultivados con células DU145 por 8 h (HZZ)(barras grises) fue utilizado para amplificar fragmentos de los transcritos de los genes *ap65*, *ap33*, *gapdh*, *enolasa*, *tvcp39*, *mp50* y *tvfim1*. **B)** Análisis densitométrico de la expresión de los genes *ap65*, *ap33*, *gapdh*, *enolasa*, *tvcp39*, *mp50* y *tvfim1* de parásitos del aislado CNCD147 cultivados en presencia de Zn^{2+} (MZ) (barras negras) y de parásitos del mismo aislado cultivado en presencia de Zn^{2+} colocados en medio de interacción en presencia de Zn^{2+} cocultivados con células DU145 por 8 h (MZZ)(barras grises. La desviación estándar se representa en las gráficas con una línea de error (T).

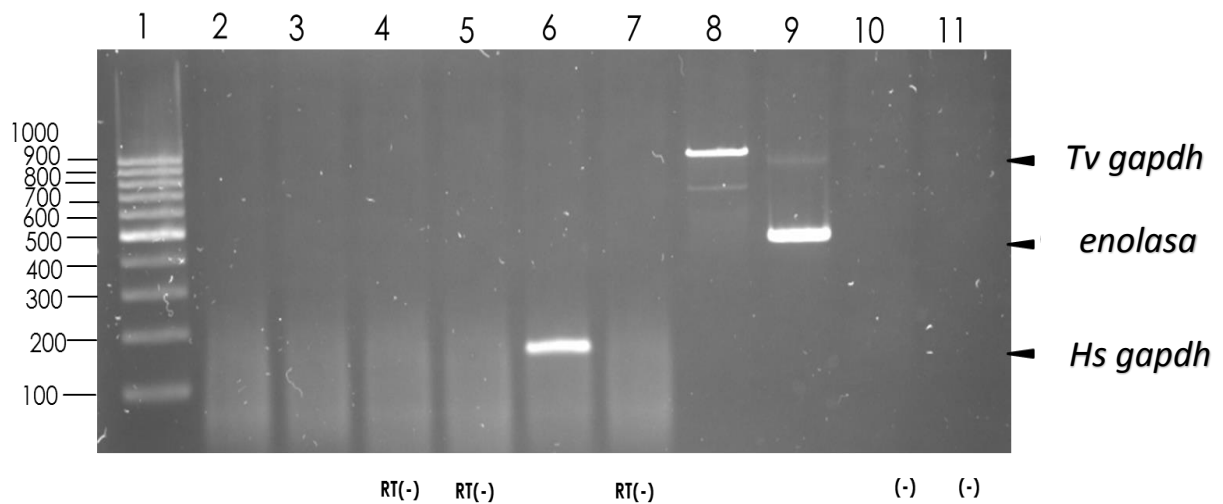


Figura 18: Evaluación de la especificidad de los oligonucleótidos *enolasa* y *gapdh* en células DU145. cDNA obtenido a partir de mRNA extraído de células DU145, fue utilizado para amplificar fragmentos de los transcritos de los genes, *Tv gapdh*, *enolasa*, de *T. vaginalis*. Carril 1 Marcador, carril 2 producto de pcr del gen *Tv gapdh*, carril 3 gen *enolasa*, no se observa amplicón debido a la especificidad de los primers, carril 6 y 7 gen *Hs gapdh*, *Hs (homo sapiens)* (control), carriles 4,5 y 7 RT(-) carriles 8-11 DNAg de *T. vaginalis*.

13. Discusión

Trichomonas vaginalis es un parásito que infecta el tracto urogenital humano, en el cual se enfrenta a dos microambientes distintos, en el que existen variaciones de pH, temperatura, poliaminas, en el caso de la mujer presenta concentraciones de Fe^{2+} cambiantes en función del flujo menstrual y en el hombre se presentan altas concentraciones de Zn^{2+} . El Zn^{2+} tiene una función primordial en la actividad y plegamiento de una gran diversidad de enzimas importantes del cuerpo, siendo la segunda traza esencial del humano [Rubio y cols. 2007]. En el tracto urogenital masculino se encuentra el Zn^{2+} como primer barrera de defensa, el cual no permite el establecimiento de patógenos; este catión se encuentra presente en los fluidos prostáticos en concentraciones fisiológicas que van de 4.5 a 7mM de Zn^{2+} . Estudios previos asocian la autolimitación de la tricomoniasis masculina, debido a que el Zn^{2+} presenta un efecto tricomonocida a las concentraciones fisiológicas [Krieger y cols. 1982]. Estudios *in vitro* sugieren que el efecto antitricomonocida se observa en concentraciones superiores a 1.6 mM de sales de Zn^{2+} como ZnCl_2 y ZnSO_4 , sin embargo, se reportan casos de hombres con concentraciones menores a 1.6 mM de Zn^{2+} (concentración mínima tricomonocida) que han desarrollado prostatitis crónica [Krieger y cols. 1982].

Debido a lo anterior, en el tracto urogenital masculino este parásito se enfrenta a un microambiente adverso en donde no se duplica el parásito, a diferencia del tracto urogenital femenino en el que el parásito es favorecido por el microambiente. Kriger y Rein en 1982 describen que los parásitos pueden perder movilidad y mantenerse viables observando un efecto antitricomonocida a 1.6mM y pueden mantener una variación en la sensibilidad hacia el Zn^{2+} , sugiriendo que la presencia del catión afecta a cada generación del parásito. Recientemente el grupo de la Dra. Álvarez-Sánchez describió curvas de crecimiento en ausencia y en concentraciones crecientes de Zn^{2+} , observando que el número de duplicaciones se afecta en función de la concentración de este catión [Figuerola-Angulo y cols. 2012]. Estos datos confirman que en cultivos *in vitro*, el Zn^{2+} afecta la viabilidad del parásito, sin embargo, en la búsqueda de entender cómo logra sobrevivir este parásito en el microambiente masculino, este estudio propuso utilizar la presencia del catión aunado a la interacción hacia monocapas de células DU145 (células de cáncer prostático) utilizadas como modelo en el laboratorio, buscando recrear el microambiente masculino.

En este trabajo se analizó la tricomoniasis desde el punto de vista del hombre, es decir, evaluando algunas propiedades de virulencia como la adhesión y la citotoxicidad, así como los cambios morfológicos durante la interacción del parásito con su célula hospedera y además evaluamos la expresión de algunos genes involucrados en las propiedades de virulencia mencionadas, ya que se ha considerado al Zn^{2+} como un factor que puede alterar el comportamiento molecular del parásito.

De acuerdo con los resultados obtenidos, este catión no afectó la viabilidad del parásito. Estos hallazgos están en concordancia con antecedentes directos previamente reportados por el grupo de investigación [Vázquez Carrillo, y cols., 2011]. Otros estudios a nivel *in vitro*, sugieren que *T. vaginalis* es capaz de sobrevivir en fluidos prostáticos caninos, sin embargo la tasa de muerte de los parásitos utilizados en el estudio reportado por Krieger y Rein (1982) es proporcional a la concentración de Zn^{2+} presente en los mismos [Krieger y cols. 1982], es decir, que la sobrevivencia del parásito depende del balance que existe entre el contenido de Zn^{2+} y la sensibilidad del aislado. También el objetivo de este trabajo fue evaluar la interacción de parásitos crecidos por 24 h en presencia de Zn^{2+} , los cuales fueron colocados en medio de interacción con este catión, para su posterior interacción con células DU145 es decir a los parásitos crecidos por 24 h en presencia de Zn^{2+} fueron transferidos a un medio de interacción en presencia del catión y ya que en los estudios realizados previamente no se había evaluado el cultivo de *T. vaginalis* en un medio de interacción con Zn^{2+} , fue necesario evaluar el efecto del Zn^{2+} en esta condición. En base a nuestros resultados, el parásito es capaz de sobrevivir en el medio de interacción con este catión.

Cabe mencionar que los cambios morfológicos del parásito durante su interacción con células prostáticas, fueron abordados en el estudio previo reportado por Vázquez-Carrillo y colaboradores [Vazquez-Carrillo y cols. 2011], sin embargo, no evaluaron el efecto del Zn^{2+} sobre la morfología del parásito. Por lo tanto en este trabajo el interés también se centró en evaluar la morfología del parásito durante la interacción con células prostáticas y además analizar el efecto del Zn^{2+} sobre la morfología de *T. vaginalis*.

Las evidencias indican que este parásito puede presentar diferentes morfologías: ovoide, ameboidea y esférica dependiendo de la condición en la que se encuentre el mismo [Ovcinnikov y cols. 1975]. Estudios previos han reportado los estadios morfológicos de *T. vaginalis* bajo diferentes condiciones, por ejemplo, cuando *T. vaginalis* interacciona con células VECs el parásito sufre una rápida transformación morfológica de la forma ovoide a ameboide [Arroyo y cols. 1993]. Sin embargo, esta transformación morfológica no fue reportada durante el contacto del aislado CNCD147 con células prostáticas DU145, en este

caso sólo se observaron parásitos en su forma ovoide, pero también se observaron interdigitaciones entre el parásito y la célula prostática [Vazquez y cols. 2011]. Algunos autores sugieren que la transformación morfológica del parásito está relacionada con su capacidad de virulencia [Arroyo y cols. 1993].

Se evaluó la morfología de los parásitos del aislado HGMN01 crecidos por 24 h en presencia y ausencia de Zn^{2+} . En ausencia del catión, no todos los parásitos observados presentaron la misma morfología, mientras que la mayoría se observó en forma ameboide adherida a la superficie del plástico, algunos parásitos mantenían una estructura ovoide. En presencia del catión, observamos parásitos con forma ovoide y ameboide, sin embargo, la diferencia más evidente entre estos dos tratamientos fue la forma y estructura de los flagelos. En presencia de Zn^{2+} en estos organelos se observó una mayor rigidez, es decir, lucían de manera “estirada” adoptando formas lineales, mientras que otros se observaron formando curvas; en presencia del catión, los flagelos de los parásitos no se observan adosados al cuerpo del mismo, sino más bien estas estructuras simulaban una red entre un conjunto de parásitos, formando un gran número de interconexiones; mientras que en ausencia de Zn^{2+} , estas estructuras se observaron “laxas” formando ondas, no fueron observadas estructuras lineales y se observaron un menor número de interconexiones. Estas diferencias morfológicas en los flagelos, una estructura de motilidad del parásito, posiblemente se deban al efecto de este catión en el reordenamiento y polimerización de las proteínas de citoesqueleto. El Zn^{2+} tiene un efecto en varias proteínas del citoesqueleto, generando un reordenamiento de estas moléculas. No hay que olvidar que existen componentes en el microambiente vaginal, como el Fe^{2+} el cual influye en la transformación morfológica del parásito ya que la presencia de este catión permite una transformación morfológica ameboide, sin embargo, la quelación del catión favorece el cambio morfológico de ovoide o ameboide a pseudoquiste [De Jesus y cols. 2007]; además otras investigaciones sugieren que la transformación ameboidea de *T. vaginalis* involucra un reordenamiento del citoesqueleto, ya que se ha evidenciado la participación de algunas proteínas de unión a actina, alfa-actina y coronina durante este evento, lo que sugiere la formación de rearreglos de actina en el citoesqueleto [Brugerolle y cols. 1996, Bricheux y cols. 1997], que aunado a la polimerización de esta proteína le permite al parásito adherirse a superficies plásticas [Gold y cols. 1992]. Por lo que la presencia de cationes en el microambiente puede generar la participación de diversas proteínas así como una transformación morfológica.

En este estudio, las diferencias morfológicas observadas en los flagelos de los parásitos posiblemente puedan deberse a que el Zn^{2+} está afectando la organización y estructura de

las proteínas del citoesqueleto de los parásitos. Se necesitarían más pruebas experimentales para demostrar esta aseveración, como generar un anticuerpo(s) específico(s) para TvFim u otra proteína(s) del citoesqueleto unido a un anticuerpo secundario que contenga un fluoróforo para inmunolocalizar a esta(s) proteína(s) en los parásitos y verificar si, en presencia Zn^{2+} , existe o no un reordenamiento del citoesqueleto.

Por otra parte, se conoce que algunas proteínas del citoesqueleto contienen dominios de unión de actina y dominios tipo “EF-hand” [Hurt y cols., 2009]. Reportes previos han mostrado que en las fimbrinas, la unión de Ca^{2+} en los dominios “EF-hand” permite su unión a filamentos de actina, lo cual impacta la morfología del parásito [Korenbaum y cols. 2002]. Durante nuestros experimentos, los parásitos estuvieron expuestos a concentraciones elevadas, pero no tricomonocidas de Zn^{2+} y siendo éste un catión divalente al igual que el Ca^{2+} , pudiera unirse a proteínas del citoesqueleto como las fimbrinas de *T. vaginalis* [Kusdian y cols. 2013 y Vazquez-Carrillo y cols. 2011] mediante los dominios tipo “EF-hand” causando la reestructuración de los flagelos e infringiéndoles rigidez. Sin embargo, se requieren pruebas utilizando la(s) fimbrina(s) de *T. vaginalis* obtenidas de manera recombinante, y generar mutantes en los dominio tipo “EF-hand” de estas proteínas, para generar evidencias que indiquen si el Zn^{2+} es capaz de unirse a estos dominios.

Las evidencias sugieren que algunas proteínas que forman parte del citoesqueleto son sobreexpresadas en presencia de este Zn^{2+} , por ejemplo, TvFim1, mp50, aldolasa, actina, etc [Vazquez-Carrillo y cols. 2011]. Debido a que las evidencias sugieren que la transformación de ovoide a ameboide puede ser atribuible a la activación de proteínas como TvFim1, proteína de agrupación de actina que participa en la plasticidad fenotípica del parásito [Kusdian y cols. 2013] y siendo esta molécula regulada por Zn^{2+} , era necesario conocer el efecto de este catión sobre la morfológica del parásito durante el contacto con células prostáticas. De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, el aislado HGMN01 proveniente de un paciente masculino con tricomonosis presentó una morfología ovoide durante el contacto con células prostáticas, además se observaron interdigitaciones entre los parásitos y las células hospederas. Este hallazgo es relevante, ya que hasta la fecha, no se había evaluado el efecto del Zn^{2+} en la morfología de *T. vaginalis* durante el contacto con células prostáticas. Reportes previos reportan que *T. vaginalis* al entrar en contacto con células HeLa, no se observa el cambio morfológico a su forma ameboide como sucede con las células VECs. El fenotipo ovoide de *T. vaginalis* durante el contacto con células prostáticas y HeLa [Vazquez-Carrillo y cols. 2011 1993] puede deberse a la existencia de receptores de alta densidad y movilidad de receptores generando la ausencia en la

transformación morfológica [Gingell y cols. 1992]. En este estudio, no observamos la forma ameboide de los parásitos durante el contacto con células prostáticas concordando con lo reportado por Vázquez Carrillo (2011), posiblemente se deba a que no se encendieron las vías de señalización, que depende de interacciones específicas tipo ligando/receptor, responsables de este evento biológico.

La infección causada por *T. vaginalis* es muy compleja, debido a que depende de mecanismos patogénicos y procesos de interacción hospedero-parásito [Figueroa-Angulo y cols. 2012]. El éxito de la colonización y de una eventual infección son favorecidos por varios mecanismos de virulencia en la unión y degradación hacia componentes de la mucosa y de la matriz extracelular (ME), así como de la participación de propiedades como adhesión y citotoxicidad del parásito hacia células como VECs y DU145 [Midlej y cols. 2010]. La citoadherencia es un paso crítico en la fase de inicio de la infección y de su posterior patogénesis del parásito hacia su célula huésped [Engbring y cols. 1998]; es un proceso complejo que involucra proteínas denominadas “adhesinas” así como proteínas de citoesqueleto; se ha observado que proteínas como: AP23, AP33, AP51, AP65 Y AP120 son reguladas de manera positiva por la presencia de hierro y el contacto celular, incrementando el proceso de adhesión [Garcia y cols. 2003]. Sin embargo, la expresión de algunos genes depende del microambiente y del tipo de aislado.

Como se mencionó anteriormente, la adhesión es un evento fundamental para el establecimiento de la infección, que puede ser regulada por el microambiente del hospedero. En el caso del hombre, el Zn^{2+} presente en la próstata, parece tener un efecto negativo en los niveles de adhesión de *T. vaginalis*, es por ello que en este trabajo evaluamos el efecto del Zn^{2+} en los niveles de adhesión del aislado HGMN01 de *T. vaginalis* durante su interacción con células prostáticas en medio de interacción acondicionado con Zn^{2+} . Se conoce que cuando ocurre la transmisión de la tricomonosis, el parásito cambia bruscamente de un microambiente femenino al masculino, o viceversa, y tratando de simular este evento, en el laboratorio utilizamos parásitos crecidos en un medio normal que fueron cocultivados con células prostáticas manteniendo el Zn^{2+} en medio de interacción. De acuerdo con nuestros resultados, el Zn^{2+} afecta la adhesión de manera negativa. Estos hallazgos pueden explicarse debido al efecto tricomonocida de este catión, pero a concentraciones inferiores a 1.6 mM de Zn^{2+} el parásito puede sobrevivir y adherirse a su célula huésped; como lo reporta Vázquez Carrillo (tesis de maestría) quien menciona que conforme se incrementan las concentraciones de Zn^{2+} la adhesión disminuye, observándose un 60% de adhesión en presencia de 1.6mM de Zn^{2+} , sin embargo, a una concentración de

0.25mM de Zn^{2+} se observa una mayor adhesión, sugiriendo que este aumento en la adhesión del parásito se deba a un sistema de resistencia del parásito por las secreciones prostáticas y que a concentraciones mayores del catión el parásito se encuentre adaptado al ambiente [Vázquez Carrillo, tesis de maestría; 2009]. Aún no se sabe si este catión regula la expresión de algunas de las proteínas de adhesión del parásito, sin embargo, en este trabajo evaluamos la expresión de genes de algunas de las adhesinas que participan en este fenómeno. En párrafos posteriores discutiremos a detalle sobre el efecto del Zn^{2+} en la expresión de los transcritos de algunos genes. De acuerdo con nuestros hallazgos, el Zn^{2+} afecta negativamente la adhesión, lo que sugiere que este catión posiblemente tiene un efecto negativo a nivel transcripcional o post-transcripcional, en la expresión de las proteínas involucradas en la adhesión. En el grupo de la Dra. Álvarez, se están realizando experimentos que pretenden conocer el mecanismo por el cual el Zn^{2+} regula la expresión de genes involucrados en la degradación de proteínas, y hasta la fecha las evidencias experimentales encontradas sugieren que se trata de un mecanismo transcripcional en el que participan proteínas de unión a DNA como MTF1 (Villalpando-Aguilar, Tesis de doctorado en proceso). Posiblemente algunas proteínas de adhesión sean reguladas de manera transcripcional mediante factores de transcripción que contengan dominios tipo dedos de Zn^{2+} . Se sabe que varios motivos se encuentran presentes en la regulación transcripcional de proteínas y que son estabilizadas por Zn^{2+} incluyendo dedos de Zn^{2+} , ya que existen proteínas que presentan estos dominios [Vazquez-Carrillo y cols. 2011]. Estos dominios se encuentran dispersos en el genoma de organismos eucariontes y están involucrados en la unión específica hacia el DNA o RNA. Los dedos de Zn^{2+} se unen a ácidos nucleicos participando en procesos de regulación transcripcional y traduccional [Gupta y cols. 2012]. Incluso, existen docenas de proteínas involucradas en mecanismos de homeostasis de Zn^{2+} ; familias de transportadores de Zn^{2+} que se encargan de exportar el catión del citosol y transportadores que lo importan hacia el citosol; la dinámica de estos transportadores permiten el control del Zn^{2+} a nivel celular; estos transportadores están regulados transcripcional y traduccionalmente mediante la formación de heterómeros, fosforilación y proteólisis [Wolfgang Mare 2013]. En base a esto se podrían realizar análisis *in silico* para conocer si algunas de las proteínas involucradas en la adhesión de *T.vaginalis* tienen dominios tipo dedos de Zn^{2+} o bien, si alguno de los factores de transcripción que las regula tienen este tipo de dominios.

Aun cuando evaluamos a nivel experimental una de las propiedades de virulencia de *T. vaginalis*, se requieren de estudios en el ámbito molecular para dar una explicación profunda y detallada del efecto del Zn^{2+} sobre la adhesión hacia las células prostáticas. Por

lo que se propone evaluar el perfil proteómico de *T. vaginalis* durante la interacción con células DU145 en presencia de Zn^{2+} . Actualmente se conoce que el Zn^{2+} afecta el proteoma de *T. vaginalis*, ya que se reportó una expresión diferencial de 27 proteínas en presencia del catión por lo que se piensa que el parásito tiene la capacidad de adaptarse a diferentes ambientes y la expresión diferencial de proteína puede estar correlacionada con propiedades de virulencia como adhesión y citotoxicidad [Vazquez-Carrillo y cols. 2011].

La adhesión de los parásitos desencadena cambios estructurales y biológicos en la célula hospedera, por ejemplo, da Costa y colaboradores (2005) reportaron que durante el evento de adhesión *T. vaginalis* perturba la unión de células epiteliales, alterando la distribución de proteínas de unión como E-cadherina y ZO-1, y ampliando los espacios de las células epiteliales; es decir, los efectos sobre la célula hospedera son dependientes de la virulencia del parásito [da Costa y cols. 2005]. Se conoce que la adhesión de *T. vaginalis* hacia su célula blanco causa cambios morfológicos y moleculares en los parásitos, sin embargo poco se sabe de los cambios que sufre la célula hospedera. En este estudio analizamos los cambios morfológicos de los parásitos originados durante el contacto con las células prostáticas, así como el análisis de algunas de las propiedades de virulencia y la expresión de algunos genes involucrados en éstas, es decir el análisis realizados se centró desde el punto de vista del parásito. Sin embargo, se propone que para tener una visión global de la interacción con las células prostáticas es necesario evaluar los cambios, tanto morfológicos y moleculares, que sufren las células cuando son expuestas a *T. vaginalis* y también evaluar el efecto de Zn^{2+} sobre las mismas. Los resultados que se obtengan de esta propuesta enriquecerán, sin duda, el conocimiento de la triconomosis masculina.

Otra propiedad de virulencia que se evaluó en este trabajo fue la citotoxicidad, que es un mecanismo dependiente del contacto que involucra la expresión de diversas moléculas como proteinasas o moléculas de secreción como el factor de desprendimiento celular, fosfolipasas, porinas, etc. [Lushbaugh y cols. 1989, Garber y cols. 1990], así como otros eventos biológicos que resultan en la citolisis, fagocitosis y desprendimiento celular [Alderete y cols. 1984]. Cabe resaltar que la citotoxicidad, así como otras propiedades de virulencia, son afectadas por el microambiente en el que se desarrolla el parásito, en particular cationes como el Fe^{2+} o el Zn^{2+} pueden regular de manera positiva o negativa la expresión de diferentes proteínas involucradas en estas propiedades. Como se mencionó anteriormente, el parásito es capaz de expresar proteínas diferencialmente en presencia de ciertos cationes, por ejemplo, en presencia de Zn^{2+} se reportó la expresión de asparagilendopeptidasas, amino peptidasas y metaloproteasas [Vazquez-Carrillo y cols.

2011]. Evaluamos el efecto del Zn^{2+} en la citotoxicidad durante la interacción hacia células HeLa y DU145 de los aislados CNCD147 y HGMN01 de *T. vaginalis*. De acuerdo con antecedentes previos obtenidos por el grupo de investigación, la citotoxicidad del aislado CNCD147 hacia células HeLa y DU145 en presencia de Zn^{2+} ya fue evaluada, encontrando que el catión afecta de manera negativa la citotoxicidad en células DU145, pero no afecta para células HeLa [Vázquez-Carrillo y cols. 2011]. Sin embargo a diferencia de lo reportado por Vázquez Carrillo, se evaluó el efecto del Zn^{2+} presente en el medio de interacción así como el efecto de este catión sobre los parásitos, con el objetivo de simular el microambiente masculino para compararlo con el microambiente femenino y conocer detalles que ayuden a explicar las diferencias de esta parasitosis en ambos sexos.

Los resultados obtenidos respecto al efecto del Zn^{2+} en la citotoxicidad del aislado CNCD147 hacia dos líneas celulares, HeLa y DU145. Los resultados indican que la citotoxicidad del aislado CNCD147 se vio afectada por el Zn^{2+} presente tanto en el medio de interacción como en el cultivo de los parásitos. En primera instancia quisiera señalar que el Zn^{2+} afectó gradual y negativamente la citotoxicidad del aislado CNCD147, es decir, el Zn^{2+} presente en el medio de interacción afectó la citotoxicidad de los parásitos, ya que éstos presentaron un mayor efecto citotóxico en un ambiente libre del catión en comparación con un ambiente en el que el catión se encontraba presente. Este hallazgo probablemente se deba a la capacidad *per se* del aislado de provocar daño, debido a la expresión de algunas proteínas que le permiten adaptarse a las condiciones cambiantes del medio, a las interacciones específicas tipo ligando/receptor y a la existencia de receptores de alta y baja densidad que permiten la interacción. Por otra parte, la citotoxicidad de parásitos previamente cultivados con Zn^{2+} por 24 h, comparativamente fue menos afectada que la citotoxicidad de los parásitos cultivados sin el catión cuya interacción se realizó en un medio enriquecido con Zn^{2+} , esto nos sugiere que al entrar a un ambiente distinto la conducta del parásito puede variar de acuerdo con la capacidad del mismo para adecuarse a su nuevo ambiente y a las condiciones del mismo como el Zn^{2+} pero también a la capacidad de los parásitos de expresar proteínas que le ayuden a su supervivencia. De manera interesante observamos que la citotoxicidad del parásito es similar en ambas líneas celulares, lo que sugiere que el parásito no exhibe una tropismo hacia una u otra línea celular y que el Zn^{2+} parece ser el principal factor que afecta la citotoxicidad del parásito.

De manera interesante, la citotoxicidad del aislado HGMN01 tuvo un comportamiento distinto comparándola con la del aislado CNCD147. De acuerdo con nuestros resultados la citotoxicidad del aislado HGMN01 fue similar ante las líneas celulares HeLa y DU147, sin

embargo, esta propiedad de virulencia no se vio afectada por la presencia de Zn^{2+} en ninguna de las condiciones evaluadas. Cabe señalar que este aislado proveniente de un hombre infectado por el parásito es capaz de presentar mecanismos de adaptación al microambiente del hombre que, de manera natural, contiene concentraciones de Zn^{2+} , las cuales debieron estar por debajo de la concentración tricomonocida, ya que el parásito estaba colonizando al individuo. En el hombre las concentraciones de Zn^{2+} presentes en la próstata pueden inhibir la actividad de CPs de *T. vaginalis* afectando su citotoxicidad [Vazquez-Carrillo, Quintas-Granados y cols. 2011]. De acuerdo a reportes previos, el Zn^{2+} afecta la actividad de algunas de las proteínas involucradas en la citotoxicidad de *T. vaginalis*, como son TvCP65, TvCP39, TvCP25, TvCP20 y TvCP70 [Vazquez-Carrillo, Quintas-Granados y cols. 2011]. Estudios más detallados sobre la actividad proteolítica de ambos aislados durante la interacción con las líneas celulares son necesarios para conocer, de manera molecular, el efecto del Zn^{2+} durante la interacción. Además se sabe que las propiedades de virulencia de *T. vaginalis* varían en cada uno de los aislados, muy probablemente debido a los mecanismos de regulación de la expresión génica. De manera interesante, el Zn^{2+} tiene efectos diferentes en los aislados analizados en este estudio, los cuales pueden atribuirse a diferentes factores, algunos de los cuales fueron mencionados en párrafos anteriores. Cabe señalar que polimorfismos en el genoma y diferencias en los mecanismos de regulación de la expresión de los genes en ambos aislados podrían ayudarnos a comprender las sutiles, pero importantes diferencias entre ambos. Actualmente los métodos de secuenciación masiva, como NGS (Next Generation Sequencing), pirosecuenciación y otros, podrían utilizarse para conocer cambios a nivel genómico entre los aislados CNCD147 y HGMN01, que nos puedan ayudar a entender las diferencias en las propiedades de virulencia de estos dos aislados.

Nuestro trabajo contribuye al entendimiento de la tricomonosis masculina, debido a que, hasta la fecha, no se habían reportado evidencias sobre el efecto del Zn^{2+} en el aislado HGMN01 proveniente de un paciente masculino. Pero *T. vaginalis* no es el único parásito afectado por este catión, los estudios revelan que la replicación y adhesión de *Entamoeba histolítica* (parásito causante de la amibiasis), disminuye en presencia de Zn^{2+} generando una disminución de la patogenicidad, y además la presencia del catión inhibe la actividad de CPs [Vega Robledo y cols. 1999], [Franco y cols. 1999].

Interesantemente el Zn^{2+} tiene efectos diferentes en las propiedades de virulencia, para el aislado HGMN01, la presencia de Zn^{2+} no parece afectar su citotoxicidad pero si disminuye su adhesión, mientras que en el caso del aislado CNCD147, la citotoxicidad se ve afectada,

lo que sugiere que los diferentes aislados son capaces de emplear diferentes mecanismos para causar daño durante la interacción con células epiteliales. Lustig Gola y colaboradores (2013) examinaron la adherencia y citólisis de 26 aislados de *T. vaginalis* de diferentes zonas geográficas de E.U.A durante su interacción con células del epitelio ectocervical (Ect1) y células de hiperplasia benigna prostática (BPH-1) y encontraron que en los aislados con bajo nivel de adhesión, la citólisis también era baja, es decir ambas propiedades correlacionaban. Sin embargo, en aquellos aislados cuyo grado de adhesión era alto, no se observó tal correlación, sugiriendo que los mecanismos de citólisis son independientes a la adhesión del parásito. Estos autores además observaron comportamientos diferentes en los aislados, así como variaciones en adhesión y citotoxicidad sugiriendo que *T. vaginalis* puede comportarse de una manera muy diversa y que puede tener diferentes mecanismos moleculares que pueden ser empleados por el parásito que permiten la interacción con diferentes células del hospedero [Lustig y cols. 2013]. Los resultados obtenidos correlacionan con lo reportado por Lustig Gila y colaboradores (2013), ya que observamos, que las propiedades de virulencia de dos aislados de *T. vaginalis* tienen comportamientos diferentes. Sin embargo, en nuestro estudio evaluamos también el efecto del Zn^{2+} , el cual influye en la interacción del parásito con la célula blanco, sobre algunas de las propiedades de virulencia, lo que enriquece el conocimiento de la infección en el hombre. Aunque de manera general los diferentes aislados, podrían estar utilizando mecanismos comunes para causar daño, algunas moléculas de superficie o de secreción, así como la presencia de receptores de alta y baja densidad, podrían ser específicos para cada aislado, confiriéndoles una mejor adaptación a los diversos microambientes.

Para tratar de correlacionar el efecto del Zn^{2+} en las propiedades de virulencia, se evaluó la expresión de algunos genes que se encuentran involucrados en la adhesión, la citotoxicidad y el cambio morfológico de los parásitos. Se sabe que el mecanismo de patogénesis de los parásitos es multifactorial y que la virulencia está en gran medida influida por el microambiente, por ejemplo García y col (2003) reportaron que algunas proteínas de superficie como las adhesinas AP65, AP51, AP120, AP33 y AP23, que interactúan con la célula huésped vía ligando receptor, están reguladas positivamente por Fe^{2+} [Garcia y cols. 2003], [Figueroa-Angulo y cols. 2012]. A diferencia de lo reportado previamente, en este estudio se evaluó el efecto del Zn^{2+} sobre la expresión de los genes *ap65*, *ap33*, además evaluamos la expresión de *gapdh* y *enolasa*, cuyas proteínas se han localizado en la superficie del parásito, son reguladas de manera positiva por Fe^{2+} y cuya síntesis se incrementa al contacto con células VECs. También se evaluó la expresión de los genes *mp50*, *tvfim1* y *tvcp39*, los dos primeros se expresan positivamente en presencia de Zn^{2+} ; mientras

que *tvcp39* participa en la citotoxicidad y es regulado de manera negativa por Fe^{2+} . Uno de los aportes principales de este trabajo, fue que evaluamos la expresión de los genes mencionados previamente durante la interacción de dos aislados, uno proveniente de una mujer y otro proveniente de un hombre infectados con este parásito, con células DU145 a evidenciando el efecto del Zn^{2+} en la expresión de dichos genes. En el caso de del aislado HGMN01 en presencia de Zn^{2+} , el catión afectó de manera positiva la expresión de *ap65*, *gapdh*, *tvcp39*, *mp50* y *tvfim1*, mientras que los niveles de *ap33* y *enolasa* disminuyeron en presencia de este catión. Por otro lado, durante el evento de interacción hacia células DU145 los niveles de mRNA de este mismo aislado, se expresaron de manera diferente mostrando solo un aumento para *gapdh* y una disminución para los demás genes. En el caso del aislado CNCD147 se incrementa la expresión de *tvcp39*, *mp50* y *tvfim1* en presencia del catión, sin embargo, la expresión de los genes *ap33*, *gapdh* y *enolasa* disminuyeron su expresión y durante la interacción de este mismo aislado con células DU145, la expresión de todos los genes analizados disminuyeron.

Tal como se había reportado [Quintas-Granados y cols. 2013], nuestros resultados corroboran que la expresión de los transcritos de *mp50* y *tvfim1* es de manera positiva en presencia de Zn^{2+} . Además encontramos que en el aislado HGMN01 se regulan de manera positiva cinco genes, mientras que éstos son regulados de manera negativa en el aislado CNCD147. Estas diferencias en los niveles de expresión de los transcritos en dos aislados diferentes sometidos al mismo estrés, nos sugiere un probable mecanismo regulado por la presencia del catión. Algunos estudios previos refieren que los iones presentes en el microambiente del hospedero, el Fe^{2+} en el caso de los pacientes femeninos, regulan los mecanismos de regulación de la expresión génica en *T. vaginalis*, nuestros resultados apuntan a este hecho, el Zn^{2+} , presente en el microambiente de la próstata de los pacientes masculinos, influye en la expresión de los transcritos de *T. vaginalis*, y además durante el contacto del parásito con células DU145, se sugiere la participación de vías de señalización cuyo objetivo es el control de la expresión de los genes del parásito. De acuerdo con nuestros resultados, podemos sugerir que para el aislado HGMN01, los mecanismos de regulación de la expresión génica pueden llevarse a cabo por vías independientes, ya sea que durante el contacto con la célula blanco se activen ciertas señales para el control de la expresión o bien por un mecanismo de regulación mediado por Zn^{2+} . *T. vaginalis* es un parásito muy complejo en el que se expresan una diversidad de moléculas que participan en la patogénesis, durante el contacto del parásito con su célula blanco, tanto los cationes como el contacto *per se*, tienen un efecto en la expresión de factores de virulencia indispensables para el establecimiento de la infección.

14. Conclusiones.

La presencia del Zn^{2+} en *T. vaginalis* altera de manera variable el comportamiento del parásito, a nivel morfológico, citotóxico, de adhesión y de regulación génica, observando que el parásito es capaz de adaptarse a un microambiente en presencia del catión.

Los resultados nos indican como el Zn^{2+} afecta la actividad del parásito en eventos importantes de la patogénesis de *T. vaginalis* como la adhesión, citotoxicidad y morfología considerando la importancia del Zn^{2+} en la tricomoniasis masculina.

15. Perspectivas

- Analizar el proteoma de la interacción de los aislados HGMN01 y CNCD147 de *T. vaginalis* con células DU145 en presencia de Zn^{2+}
- Analizar el secretoma de los aislados HGMN01 y CNCD147 de *T. vaginalis* cultivados en presencia de Zn^{2+} así como de la interacción con células DU145.
- Analizar el secretoma de los aislados HGMN01 y CNCD147 de *T. vaginalis* durante la interacción con células DU145 en presencia de Zn^{2+}
- Caracterizar la morfología del aislado HGMN01 de *T. vaginalis* durante su interacción con un cultivo primario de células prostáticas en presencia y ausencia de Zn^{2+}
- Determinar la expresión de genes de un cambio microambiental de Fe^{2+} a un microambiente de Zn^{2+} y viceversa.
- Inmunolocalizar proteínas en presencia de Zn^{2+}

16. Bibliografía

- Alderete, J. F. (1999). "Iron modulates phenotypic variation and phosphorylation of p270 in double-stranded RNA virus-infected *Trichomonas vaginalis*." *Infect. Immun.* **67**: 4298-4302.
- Alderete, J. F., Benchimol, M., Lehker, M. W. y Crouch, M. L. (2002). "The complex fibronectin--*Trichomonas vaginalis* interactions and Trichomonosis." *Parasitol Int* **51**(3): 285-292.
- Alderete, J. F. y Garza, G. E. (1988). "Identification and properties of *Trichomonas vaginalis* proteins involved in cytoadherence." *Infect Immun* **56**(1): 28-33.
- Alderete, J. F., Millsap, K. W., Lehker, M. W. y Benchimol, M. (2001). "Enzymes on microbial pathogens and *Trichomonas vaginalis*: molecular mimicry and functional diversity." *Cell Microbiol* **3**(6): 359-370.
- Alderete, J. F. y Pearlman, E. (1984). "Pathogenic *Trichomonas vaginalis* cytotoxicity to cell culture monolayers." *British J. Ven. Dis.* **60**: 99-105.
- Alvarez-Sanchez, M. E., Avila-Gonzalez, L., Becerril-Garcia, C., Fattel-Facenda, L. V., Ortega-Lopez, J. y Arroyo, R. (2000). "A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity." *Microb Pathog* **28**(4): 193-202.
- Alvarez-Sánchez, M. E., Avila-González, L., Becerril-García, C., Fattel-Facenda, L. V., Ortega-López, J. y Arroyo, R. (2000). "A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity." *Microbial Pathog.* **28**(4): 193-202.
- Anderson, I. J. y Loftus, B. J. (2005). "Entamoeba histolytica: observations on metabolism based on the genome sequence." *Exp Parasitol* **110**(3): 173-177.
- Arroyo, R., Engbring, J. y Alderete, J. F. (1992). "Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*." *Mol. Microbiol.* **6**(7): 853-862.
- Arroyo, R., Gonzalez-Robeles, A., Martinez-Palomo, A. y Alderete, J. F. (1993). "Signalling of *Trichomonas vaginalis* for amoeboid transformation and adhesin synthesis follows cytoadherence." *Mol. Microbiol.* **7**(2): 299-309.
- Arroyo, R., Gonzalez-Robles, A., Martinez-Palomo, A. y Alderete, J. F. (1993). "Signalling of *Trichomonas vaginalis* for amoeboid transformation and adhesion synthesis follows cytoadherence." *Mol Microbiol* **7**(2): 299-309.
- Bozner, P. y Demes, P. (1990). "Proteinases in *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas mobilensis* are not exclusively of cysteine type." *Parasitol.* **102**(113-115).
- Bricheux, G. y Brugerolle, G. (1997). "Molecular cloning of actin genes in *Trichomonas vaginalis* and phylogeny inferred from actin sequences." *FEMS Microbiol Lett* **153**(1): 205-213.
- Bruckner, P. (2010). "Suprastructures of extracellular matrices: paradigms of functions controlled by aggregates rather than molecules." *Cell Tissue Res* **339**(1): 7-18.
- Brugerolle, G., Bricheux, G. y Coffe, G. (1996). "Actin cytoskeleton demonstration in *Trichomonas vaginalis* and in other trichomonads." *Biol Cell* **88**(1-2): 29-36.
- Carlton, J. M., Hirt, R. P., Silva, J. C., Delcher, A. L., Schatz, M., Zhao, Q., Wortman, J. R., Bidwell, S. L., Alsmark, U. C. M., Besteiro, S., Sicheritz-Ponten, T., Noel, C. J., Dacks, J. B., Foster, P. G., Simillion, C., Van de Peer, Y., Miranda-Saavedra, D., Barton, G. J., Westrop, G. D., Muller, S., Dessi, D., Fiori, P. L., Ren, Q., Paulsen, I., Zhang, H., Bastida-Corcuera, F. D., Simoes-Barbosa, A., Brown, M. T., Hayes, R. D., Mukherjee, M., Okumura, C. Y., Schneider, R., Smith, A. J., Vanacova, S., Villalvazo, M., Haas, B. J., Perte, M., Feldblyum, T. V., Utterback, T. R., Shu, C.-L., Osoegawa, K., de Jong, P. J., Hardy, I., Horvathova, L., Zubacova, Z., Dolezal, P., Malik, S.-B., Logsdon, K. M. J., Henze, K., Gupta, A., Wang, C. C., Dunne, R. L., Upcroft, J. A., Upcroft, P., White, O., Salzberg, S. L., Tang, P., Chiu, C.-H., Lee, Y.-S., Embley, T. M., Coombs, G. H., Mottram, J. C., Tachezy, J., Fraser-Liggett, C. M. y Johnson, P. J. (2007). "Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*." *Science* **31**(5): 207-212.

- Carrillo, J. E., Shekhani, N. S., Deland, E. L., Fleck, E. M., Mucaria, J., Guimento, R., Kaplan, S., Polf, W. A., Carrillo, V. A., Pardes, H. y Corwin, S. J. (2011). "A regional health collaborative formed By NewYork-Presbyterian aims to improve the health of a largely Hispanic community." Health Aff (Millwood) **30**(10): 1955-1964.
- Carvajal-Gamez, B. I., Quintas-Granados, L. I., Arroyo, R., Vazquez-Carrillo, L. I., Ramon-Luing Lde, L., Carrillo-Tapia, E. y Alvarez-Sanchez, M. E. (2014). "Putrescine-dependent re-localization of TvCP39, a cysteine proteinase involved in *Trichomonas vaginalis* cytotoxicity." PLoS One **9**(9): e107293.
- Casadevall, A. y Pirofski, L. (2001). "Host-pathogen interactions: the attributes of virulence." J Infect Dis **184**(3): 337-344.
- Conrad, M. D., Gorman, A. W., Schillinger, J. A., Fiori, P. L., Arroyo, R., Malla, N., Dubey, M. L., Gonzalez, J., Blank, S., Secor, W. E. y Carlton, J. M. (2012). "Extensive genetic diversity, unique population structure and evidence of genetic exchange in the sexually transmitted parasite *Trichomonas vaginalis*." PLoS Negl Trop Dis **6**(3): e1573.
- Conrad, M. D., Kissinger, P., Schmidt, N., Martin, D. H. y Carlton, J. M. (2013). "Genetic diversity of *Trichomonas vaginalis* reinfection in HIV-positive women." Sex Transm Infect **89**(6): 473-478.
- Cosar, C. y Julou, L. (1959). "[The activity of 1-(2-hydroxyethyl)-2-methyl-5-nitroimidazole (R. P. 8823) against experimental *Trichomonas vaginalis* infections]." Ann Inst Pasteur (Paris) **96**(2): 238-241.
- Cotch, M. F., Pastorek II, J. G., Nugent, R. P. y Hillier, S. L. (1997). "*Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery." Sexually Trans. Dis. **24**: 353-360.
- da Costa, R. F., de Souza, W., Benchimol, M., Alderete, J. F. y Morgado-Diaz, J. A. (2005). "*Trichomonas vaginalis* perturbs the junctional complex in epithelial cells." Cell Res **15**(9): 704-716.
- Dacks, J. B., Dyal, P. L., Embley, T. M. y van der Giezen, M. (2006). "Hydrogenosomal succinyl-CoA synthetase from the rumen-dwelling fungus *Neocallimastix patriciarum*; an energy-producing enzyme of mitochondrial origin." Gene **373**: 75-82.
- Dailey, D. C., Chang, T. H. y Alderete, J. F. (1990). "Characterization of *Trichomonas vaginalis* haemolysis." Parasitol. **101**: 171-175.
- de Brätter, V. N., Brätter, P., Mohn, L. y Sitzer, G. (1995). "Minerales y oligoelementos." Fundación Bertelsmann, Güterslohn.
- De Jesus, J. B., Cuervo, P., Junqueira, M., Britto, C., Costa e Silva-Filho, F., Jose Soares, M., Cupolillo, E., Fernandes, O. y Barbosa Domont, G. (2007). "A further proteomic study on the effect of iron in the human pathogen *Trichomonas vaginalis*." Proteomics **7**: 1961-1972.
- De Jesus, J. B., Cuervo, P., Junqueira, M., Britto, C., Costa e Silva-Filho, F., Soares, M. J., Cupolillo, E., Fernandes, O. y Domont, G. B. (2007). "A further proteomic study on the effect of iron in the human pathogen *Trichomonas vaginalis*." PROTEOMICS **7**(12): 1961-1972.
- El-Shazly, A. M., El-Naggar, H. M., Soliman, M., El-Negeri, M., El-Nemr, H. E., Handousa, A. E. y Morsy, T. A. (2001). "A study on trichomoniasis vaginalis and female infertility." J. Egypt. Soc. Parasitol. **31**(2): 545-553.
- Engbring, J. A. y Alderete, J. F. (1998). "Three genes encode distinct AP33 proteins involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence." Mol Microbiol **28**(2): 305-313.
- Epidemiológica, S. N. d. V. (2015). Boletín de Epidemiología.
- Esteche, M. G. (1996). Elementos traza en biopatología y neuropsicología, Fundación MAPFRE.
- Favier, A. E. (1992). "Hormonal effects of zinc on growth in children." Biol Trace Elem Res **32**: 383-398.
- Figueroa-Angulo, E. E., Rendon-Gandarilla, F. J., Puente-Rivera, J., Calla-Choque, J. S., Cardenas-Guerra, R. E., Ortega-Lopez, J., Quintas-Granados, L. I., Alvarez-Sanchez, M. E. y Arroyo,

- R. (2012). "The effects of environmental factors on the virulence of *Trichomonas vaginalis*." Microbes Infect **14**(15): 1411-1427.
- Figuerola-Angulo, E. E., Rendón-Gandarilla, F. J., Puente-Rivera, J., Calla-Choque, J. S., Cárdenas-Guerra, R. E., Ortega-López, J., Quintas-Granados, L. I., Alvarez-Sánchez, M. E. y Arroyo, R. (2012). "The effects of environmental factors on the virulence of *Trichomonas vaginalis*." Microbes and Infection **14**(15): 1411-1427.
- Franco, E., de Araujo Soares, R. M. y Meza, I. (1999). "Specific and reversible inhibition of *Entamoeba histolytica* cysteine-proteinase activities by Zn²⁺: implications for adhesion and cell damage." Arch Med Res **30**(2): 82-88.
- Furtado, M. B. y Benchimol, M. (1998). "Observation of membrane fusion on the interaction of *Trichomonas vaginalis* with human vaginal epithelial cells." Parasitol Res **84**(3): 213-220.
- Garber, G. E. y Lemchuk-Favel, L. T. (1990). "Association of production of cell-detaching factor with the clinical presentation of *Trichomonas vaginalis*." J Clin Microbiol **28**(11): 2415-2417.
- Garcia, A. F., Benchimol, M. y Alderete, J. F. (2005). "Trichomonas vaginalis Polyamine Metabolism Is Linked to Host Cell Adherence and Cytotoxicity." Infection and Immunity **73**(5): 2602-2610.
- Garcia, A. F., Chang, T.-H., Benchimol, M., Klumpp, D. J., Lehker, M. W. y Alderete, J. F. (2003). "Iron and contact with host cells induce expression of adhesins on surface of *Trichomonas vaginalis*." Molecular microbiology **47**(5): 1207-1224.
- Garcia, A. F., Chang, T. H., Benchimol, M., Klumpp, D. J., Lehker, M. W. y Alderete, J. F. (2003). "Iron and contact with host cells induce expression of adhesins on surface of *Trichomonas vaginalis*." Mol. Microbiol. **47**: 1207-1224.
- Gilbert, R. O., Elia, G., Beach, D. H., Klaessig, S. y Singh, B. N. (2000). "Cytopathogenic effect of *Trichomonas vaginalis* on human vaginal epithelial cells cultured in vitro." Infect Immun **68**(7): 4200-4206.
- Gingell, D. y Owens, N. (1992). "How do cells sense and respond to adhesive contacts? Diffusion-trapping of laterally mobile membrane proteins at maturing adhesions may initiate signals leading to local cytoskeletal assembly response and lamella formation." Journal of Cell Science **101**(2): 255-266.
- Gold, D. y Ofek, I. (1992). "Adhesion of *Trichomonas vaginalis* to plastic surfaces: requirement for energy and serum constituents." Parasitology **105** (Pt 1): 55-62.
- Gomez-Conde, E., Mena-Lopez, R., Hernandez-Jauregui, P., Gonzalez-Camacho, M. y Arroyo, R. (2000). "Trichomonas vaginalis: chromatin and mitotic spindle during mitosis." Exp Parasitol **96**(3): 130-138.
- Correll, T. E. (1985). "Effect of culture medium content on the biochemical composition and metabolism of *Trichomonas vaginalis*." J. Bacteriol. **161**: 1228-1230.
- Grifantini, R., Bartolini, E., Muzzi, A., Draghi, M., Frigimelica, E., Berger, J., Randazzo, F. y Grandi, G. (2002). "Gene Expression Profile in *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* upon Host-Cell Contact." Annals of the New York Academy of Sciences **975**(1): 202-216.
- Gupta, S. K., Rai, A. K., Kanwar, S. S. y Sharma, T. R. (2012). "Comparative analysis of zinc finger proteins involved in plant disease resistance." PLoS One **7**(8): e42578.
- Han, Q., Liu, J., Wang, T., Xiao, H. y Fang, Z. (2004). "Influence of the metabolite produced by *Trichomonas vaginalis* on human sperm motility in vitro." Zhonghua Nan Ke Xue **10**(4): 272-274.
- Harp, D. F. y Chowdhury, I. (2011). "Trichomoniasis: evaluation to execution." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **157**(1): 3-9.

- Hernández-Gutiérrez, R., Avila-González, L., Ortega-López, J., Cruz-Talonia, F., Gómez-Gutiérrez, G. y Arroyo, R. (2004). "*Trichomonas vaginalis*: characterization of a 39-kDa cysteine proteinase found in patient vaginal secretions." Exp. Parasitol. **107**(3-4): 125-135.
- Hirt, R. P., Harriman, N., Kajava, A. V. y Embley, T. M. (2002). "A novel potential surface protein in *Trichomonas vaginalis* contains a leucine-rich repeat shared by micro-organisms from all three domains of life." Mol Biochem Parasitol **125**(1-2): 195-199.
- Hirt, R. P., Noel, C. J., Sicheritz-Ponten, T., Tachezy, J. y Fiori, P. L. (2007). "*Trichomonas vaginalis* surface proteins: a view from the genome." TRENDS in Parasitol. **23**(11): 540-547.
- Honigberg, B. M. (1990). Trichomonads parasitic in humans. New York, Springer-Verlag.
- Hosogi, Y. y Duncan, M. J. (2005). "Gene expression in *Porphyromonas gingivalis* after contact with human epithelial cells." Infect Immun **73**(4): 2327-2335.
- Kim, N., Marcus, E. A., Wen, Y., Weeks, D. L., Scott, D. R., Jung, H. C., Song, I. S. y Sachs, G. (2004). "Genes of *Helicobacter pylori* regulated by attachment to AGS cells." Infect Immun **72**(4): 2358-2368.
- Korenbaum, E. y Rivero, F. (2002). "Calponin homology domains at a glance." Journal of Cell Science **115**(18): 3543-3545.
- Krieger, J. N., Ravdin, J. I. y Rein, M. F. (1985). "Contact-dependent cytopathogenic mechanisms of *Trichomonas vaginalis*." Infect. Immun. **50**: 778-786.
- Krieger, J. N. y Rein, M. F. (1982). "Canine prostatic secretions kill *Trichomonas vaginalis*." Infect. Immun. **37**(1): 77-81.
- Krieger, J. N. y Rein, M. F. (1982). "Zinc sensitivity of *Trichomonas vaginalis*: in vitro studies and clinical implications." J Infect Dis **146**(3): 341-345.
- Kucknoor, A., Mundodi, V. y Alderete, J. F. (2005). "*Trichomonas vaginalis* adherence mediates differential gene expression in human vaginal epithelial cells." Cellular microbiology **7**(6): 887-897.
- Kucknoor, A. S., Mundodi, V. y Alderete, J. F. (2005). "Adherence to human vaginal epithelial cells signals for increased expression of *Trichomonas vaginalis* genes." Infect. Immun. **73**(10): 6472-6478.
- Kusdian, G., Woehle, C., Martin, W. F. y Gould, S. B. (2013). "The actin-based machinery of *Trichomonas vaginalis* mediates flagellate-amoeboid transition and migration across host tissue." Cell Microbiol **15**(10): 1707-1721.
- Lama, A., Kucknoor, A., Mundodi, V. y Alderete, J. F. (2009). "Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a surface-associated, fibronectin-binding protein of *Trichomonas vaginalis*." Infect Immun **77**(7): 2703-2711.
- Langley, J. G., Goldsmid, J. M. y Davies, N. (1987). "Venereal trichomoniasis: role of men." Genitourin. Med. **63**: 264-267.
- Lehker, M. W. y Alderete, J. F. (1990). "Properties of *Trichomonas vaginalis* grown under chemostat controlled growth conditions." Genitourin Med **66**(3): 193-199.
- Lehker, M. W. y Alderete, J. F. (1992). "Iron regulates growth of *Trichomonas vaginalis* and the expression of immunogenic trichomonad proteins." Mol Microbiol **6**(1): 123-132.
- Lehker, M. W. y Alderete, J. F. (2000). "Biology of trichomonosis." Current Opinion in Infectious Diseases **13**(1): 37-45.
- Lehker, M. W., Arroyo, R. y Alderete, J. F. (1991). "The regulation by iron of the synthesis of adhesins and cytoadherence levels in the protozoan *Trichomonas vaginalis*." J. Exp. Med. **174**: 311-318.
- Lehker, M. W., Chang, T. H., Dailey, D. C. y Alderete, J. F. (1990). "Specific erythrocyte binding is an additional nutrient acquisition system for *Trichomonas vaginalis*." J. Exp. Med. **171**(2165-2170).

- Leon-Sicaire, C. R., Leon-Felix, J. y Arroyo, R. (2004). "tvcp12: a novel *Trichomonas vaginalis* cathepsin L-like cysteine proteinase-encoding gene." *Microbiology* **150**(Pt 5): 1131-1138.
- Lin, W. C., Chang, W. T., Chang, T. Y. y Shin, J. W. (2015). "The Pathogenesis of Human Cervical Epithelium Cells Induced by Interacting with *Trichomonas vaginalis*." *PLoS One* **10**(4): e0124087.
- Liston, D. R. y Johnson, P. J. (1999). "Analysis of a ubiquitous promoter element in a primitive eukaryote: early evolution of the initiator element." *Mol. Cell. Biol.* **19**: 2380-2388.
- Lossick, J. G. y Kent, H. L. (1991). "Trichomoniasis: trends in diagnosis and management." *Am J Obstet Gynecol* **165**(4 Pt 2): 1217-1222.
- Lushbaugh, W. B., Turner, A. C., Gentry, G. A. y Klykken, P. C. (1989). "Characterization of a secreted cytoactive factor from *Trichomonas vaginalis*." *Am J Trop Med Hyg* **41**(1): 18-28.
- Lustig, G., Ryan, C. M., Secor, W. E. y Johnson, P. J. (2013). "Trichomonas vaginalis contact-dependent cytolysis of epithelial cells." *Infect Immun* **81**(5): 1411-1419.
- Lynch, S. R., Beard, J. L., Dassenko, S. A. y Cook, J. D. (1984). "Iron absorption from legumes in humans." *Am J Clin Nutr* **40**(1): 42-47.
- Ma, L., Meng, Q., Cheng, W., Sung, Y., Tang, P., Hu, S. y Yu, J. (2011). "Involvement of the GP63 protease in infection of *Trichomonas vaginalis*." *Parasitol Res* **109**(1): 71-79.
- Marczak, R., Gorrell, T. E. y Müller, M. (1983). "Hydrogenosomal ferredoxin of the anaerobic protozoon, *Trichomonas foetus*." *Journal of Biological Chemistry* **258**(20): 12427-12433.
- Mendoza-Lopez, M. R., Becerril-Garcia, C., Fattel-Facenda, L. V., Avila-Gonzalez, L., Ruiz-Tachiquin, M. E., Ortega-Lopez, J. y Arroyo, R. (2000). "CP30, a cysteine proteinase involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence." *Infect. Immun.* **6**(9): 4907-4912.
- Midlej, V. y Benchimol, M. (2010). "Trichomonas vaginalis kills and eats--evidence for phagocytic activity as a cytopathic effect." *Parasitology* **137**(1): 65-76.
- Mundodi, V., Kucknoor, A. S. y Alderete, J. F. (2008). "Immunogenic and Plasminogen-Binding Surface-Associated α -Enolase of *Trichomonas vaginalis*." *Infection and Immunity* **76**(2): 523-531.
- Muñoz García, M., Pérez Menéndez-Conde, C. y Bermejo Vicedo, T. (2011). "Avances en el conocimiento del uso de micronutrientes en nutrición artificial." *Nutrición Hospitalaria* **26**(1): 37-47.
- Neale, K. A. y Alderete, J. F. (1990). "Analysis of the proteinases of representative *Trichomonas vaginalis* isolates." *Infect. Immun.* **58**(1): 157-162.
- Neale, K. A. y Alderete, J. F. (1990). "Analysis of the proteinases of representative *Trichomonas vaginalis* isolates." *Infect Immun* **58**(1): 157-162.
- Ovcinnikov, N. M., Delektorskij, V. V., Turanova, E. N. y Yashkova, G. N. (1975). "Further studies of *Trichomonas Vaginalis* with transmission and scanning electron microscopy." *British Journal of Venereal Diseases* **51**(6): 357-375.
- Ovcinnikov, N. M., Delektorskij, V. V., Turanova, E. N. y Yashkova, G. N. (1975). "Further studies of *Trichomonas Vaginalis* with transmission and scanning electron microscopy." *Br J Vener Dis* **51**(6): 357-375.
- Peterson, K. M. y Alderete, J. F. (1984). "Iron uptake and increased intracellular enzyme activity follow host lactoferrin binding by *Trichomonas vaginalis* receptors." *J Exp Med* **160**(2): 398-410.
- Petrin, D., Delgaty, K., Bhatt, R. y Garber, G. (1998). "Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*." *Clin. Microbiol. Rev.* **11**(2): 300-317.

- Piña-Vázquez, C., Reyes-López, M., Ortiz-Estrada, G., de la Garza, M. y Serrano-Luna, J. (2012). "Host-Parasite Interaction: Parasite-Derived and -Induced Proteases That Degrade Human Extracellular Matrix." Journal of Parasitology Research **2012**: 748206.
- Prasad, A. S. (1991). "Discovery of human zinc deficiency and studies in an experimental human model." Am J Clin Nutr **53**(2): 403-412.
- Provenzano, D. y Alderete, J. F. (1995). "Analysis of human immunoglobulin-degrading cysteine proteinase of *Trichomonas vaginalis*." Infect. Immun. **63**: 3388-3395.
- Quintas-Granados, L. I., Villalpando, J. L., Vázquez-Carrillo, L. I., Arroyo, R., Mendoza-Hernández, G. y Álvarez-Sánchez, M. E. (2013). "TvMP50 is an Immunogenic Metalloproteinase during Male Trichomoniasis." Molecular & Cellular Proteomics **12**(7): 1953-1964.
- Quintas-Granados, L. I., Villalpando, J. L., Vázquez-Carrillo, L. I., Arroyo, R., Mendoza-Hernández, G. y Álvarez-Sánchez, M. E. (2013). "TvMP50 is an Immunogenic Metalloproteinase during Male Trichomoniasis." Molecular & Cellular Proteomics : MCP **12**(7): 1953-1964.
- Ramon-Luing, L. A., Rendon-Gandarilla, F. J., Cardenas-Guerra, R. E., Rodriguez-Cabrera, N. A., Ortega-Lopez, J., Avila-Gonzalez, L., Angel-Ortiz, C., Herrera-Sanchez, C. N., Mendoza-Garcia, M. y Arroyo, R. (2010). "Immunoproteomics of the active degradome to identify biomarkers for *Trichomonas vaginalis*." Proteomics **10**: 435-444.
- Ramón-Luing, L. d. I. Á., Rendón-Gandarilla, F. J., Puente-Rivera, J., Ávila-González, L. y Arroyo, R. (2011). "Identification and characterization of the immunogenic cytotoxic TvCP39 proteinase gene of *Trichomonas vaginalis*." Int. J. Biochem. Cell Biol. **43**(10): 1500-1511.
- Rasmussen, S. E., Nielsen, M. H., Lind, I. y Rhodes, J. M. (1986). "Morphological studies of the cytotoxicity of *Trichomonas vaginalis* to normal human vaginal epithelial cells in vitro." Genitourin Med **62**(4): 240-246.
- Rawlings, N. D., Waller, M., Barrett, A. J. y Bateman, A. (2014). "MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors." Nucleic Acids Research **42**(Database issue): D503-D509.
- Rein, M. y Chapel, T. (1975). "Trichomoniasis, candidiasis, and the minor venereal diseases." Clin Obstet Gynecol **18**(1): 73-88.
- Ribeiro, K. C., Pereira-Neves, A. y Benchimol, M. (2002). "The mitotic spindle and associated membranes in the closed mitosis of trichomonads." Biol Cell **94**(3): 157-172.
- Rubio, C., González Weller, D., Martín-Izquierdo, R., Revert, C., Rodríguez, I. y Hardisson, A. (2007). "El zinc: oligoelemento esencial." Nutrición hospitalaria **22**(1): 101-107.
- Sandstead, H. H., Penland, J. G., Alcock, N. W., Dayal, H. H., Chen, X. C., Li, J. S., Zhao, F. y Yang, J. J. (1998). "Effects of repletion with zinc and other micronutrients on neuropsychologic performance and growth of Chinese children." Am J Clin Nutr **68**(2 Suppl): 470S-475S.
- Schmid, G., Narcisi, E., Mosure, D., Secor, W. E., Higgins, J. y Moreno, H. (2001). "Prevalence of metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis* in a gynecology clinic." J Reprod Med **46**(6): 545-549.
- Schumacher, M. A., Lau, A. O. y Johnson, P. J. (2003). "Structural basis of core promoter recognition in a primitive eukaryote." Cell **115**(4): 413-424.
- Schwebke, J. R. y Hook, E. W. (2003). "High Rates of *Trichomonas vaginalis* among Men Attending a Sexually Transmitted Diseases Clinic: Implications for Screening and Urethritis Management." Journal of Infectious Diseases **188**(3): 465-468.
- Sehgal, R., Goyal, K. y Sehgal, A. (2012). "Trichomoniasis and lactoferrin: future prospects." Infect Dis Obstet Gynecol **2012**: 536037.
- Sena, A. C., Miller, W. C., Hobbs, M. M., Schwebke, J. R., Leone, P. A., Swygard, H., Atashili, J. y Cohen, M. S. (2007). "*Trichomonas vaginalis* infection in male sexual partners: implications for diagnosis, treatment, and prevention." Clin Infect Dis **44**(1): 13-22.

Silva Filho, F. C. e., Ortega-López, J. y Arroyo, R. (1998). "YIGSR Is the Preferential Laminin-1 Residing Adhesion Sequence for *Trichomonas vaginalis*." Experimental Parasitology **88**(3): 240-242.

Singh, B. N., Hayes, G. R., Lucas, J. J., Sommer, U., Viseux, N., Mirgorodskaya, E., Trifonova, R. T., Sassi, R. R., Costello, C. E. y Fichorova, R. N. (2009). "Structural details and composition of *Trichomonas vaginalis* lipophosphoglycan in relevance to the epithelial immune function." Glycoconj J **26**(1): 3-17.

Smith, A. y Johnson, P. (2011). "Gene expression in the unicellular eukaryote *Trichomonas vaginalis*." Res Microbiol **162**(6): 646-654.

Smith, A. J., Chudnovsky, L., Simoes-Barbosa, A., Delgadillo-Correa, M. G., Jonsson, Z. O., Wohlschlegel, J. A. y Johnson, P. J. (2011). "Novel core promoter elements and a cognate transcription factor in the divergent unicellular eukaryote *Trichomonas vaginalis*." Mol Cell Biol **31**(7): 1444-1458.

Smith, K., Harrington, K., Wingood, G., Oh, M., Hook, I. E. y DiClemente, R. J. (2001). "Self-obtained vaginal swabs for diagnosis of treatable sexually transmitted diseases in adolescent girls." Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine **155**(6): 676-679.

Torres-Romero, J. C. y Arroyo, R. (2009). "Responsiveness of *Trichomonas vaginalis* to iron concentrations: Evidence for a post-transcriptional iron regulation by an IRE/IRP-like system." Infect., Genetics and Evol. **9**(6): 1065-1074.

Tuttle, J. P., Jr., Holbrook, T. W. y Derrick, F. C. (1977). "Interference of human spermatozoal motility by *trichomonas vaginalis*." J Urol **118**(6): 1024-1025.

Van Agtmael, T. y Bruckner-Tuderman, L. (2010). "Basement membranes and human disease." Cell Tissue Res **339**(1): 167-188.

Vargas-Villarreal, J., Mata-Cardenas, B. D., Palacios-Corona, R., Gonzalez-Salazar, F., Cortes-Gutierrez, E. I., Martinez-Rodriguez, H. G. y Said-Fernandez, S. (2005). "*Trichomonas vaginalis*: identification of soluble and membrane-associated phospholipase A1 and A2 activities with direct and indirect hemolytic effects." J Parasitol **91**(1): 5-11.

Vazquez-Carrillo, L. I., Quintas-Granados, L. I., Arroyo, R., Mendoza-Hernández, G., González-Robles, A., Carvajal-Gamez, B. I. y Alvarez-Sánchez, M. E. (2011). "The effect of Zn²⁺ on prostatic cell cytotoxicity caused by *Trichomonas vaginalis*." J. Integrated Omics: 198-210.

Vazquez, F., Jose Garcia, M., Perez, F. y Palacio, V. (2001). "[*Trichomonas vaginalis*: treatment and resistance to nitroimidazoles]." Enferm Infecc Microbiol Clin **19**(3): 114-124.

Vega Robledo, G. B., Carrero, J. C. y Ortiz-Ortiz, L. (1999). "Effect of zinc on *Entamoeba histolytica* pathogenicity." Parasitol Res **85**(6): 487-492.

Wei, S. Y., Lou, Y. C., Tsai, J. Y., Ho, M. R., Chou, C. C., Rajasekaran, M., Hsu, H. M., Tai, J. H., Hsiao, C. D. y Chen, C. (2012). "Structure of the *Trichomonas vaginalis* Myb3 DNA-binding domain bound to a promoter sequence reveals a unique C-terminal beta-hairpin conformation." Nucleic Acids Res **40**(1): 449-460.

WHO (2005). Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections overview and estimates. WHO. W. H. Organization. Geneva: 27-29.

17. Apéndice

Medio TYM

Bacto triptona	20 g
Extracto de levadura	10 g
Maltosa	5 g
Cisteina	1 g
Ac. Ascórbico	0.2 g
K ₂ HPO ₄	0.8 g
KH ₂ PO ₄	0.8 g

Se agregan 800 ml de agua destilada, se ajusta pH a 6.2 y se afora a 1L, se filtra y se esteriliza por autoclave

Medio DMEM alto en Glucosa

HEPES	5.96 g
Bicarbonato de Sodio	3.7 g

Se disuelve el sobre de medio Dulbecco's Modified en 700 ml de agua destilada, se ajusta pH a 7.2 y se afora a 900 ml, se filtra por 0.22 micras

Medio DMEM bajo en Glucosa

Bicarbonato de Sodio	1.5 g
----------------------	-------

Se disuelve el sobre de medio Dulbecco's Modified en 800 ml de agua destilada, se ajusta pH a 7.2 y se afora a 1 L, se filtra por 0.22 micras

Gel de agarosa al 1%

Agarosa (Gibco BRL)	1 g
TBE 1X	100 ml
Red Gel	1 µl x cada 6 µl de BM2x

Amortiguador de TBE 5X

Tris base	54 g
Ácido Bórico	27.5 g
EDTA 0.5 M	4.6 g

Se afora a 1 L con H₂O destilada, se ajusta pH a 8.0

Amortiguador de Fosfatos PBS

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	0.65 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g

Se ajusta el pH a 7.4; se afora a 1 L con H₂O destilada y se esteriliza por autoclave

PBS-EDTA 0.2%

PBS pH7	500 ml
EDTA	1 g

Esterilizar por autoclave

Etanol 50%

Para 50 ml

Etanol al 100%	25 ml
H ₂ O destilada	25 ml

SDS 1% Etanol 50%

Etanol	50%
SDS	500 mg

Formaldehido 2%

Formaldehido 37%	5.4 ml
PBS pH 7	94.6 ml

Formaldehido 3.75%

Formaldehido	10.13 ml
Amortiguador live cells	89.86 ml

Cristal violeta 0.13%

Para 100 ml

Formaldehido	28.57 ml
Etanol 100%	71.42 ml
Cristal violeta	130 mg

Solución de Zn²⁺ 25mM

Medio TYM	20 ml
Zn ²⁺	0.068 g

Filtrar por 0.22 micras

Medio de interacción

Para 50 ml

Medio TYM	16.66 ml
Medio DMEM	33.33 ml

Medio de interacción con Zn²⁺

Para 50 ml

Medio TYM	13.4 ml
Medio TYM con Zn ²⁺	3.2 ml
Medio DMEM	33.33 ml

18. Anexos

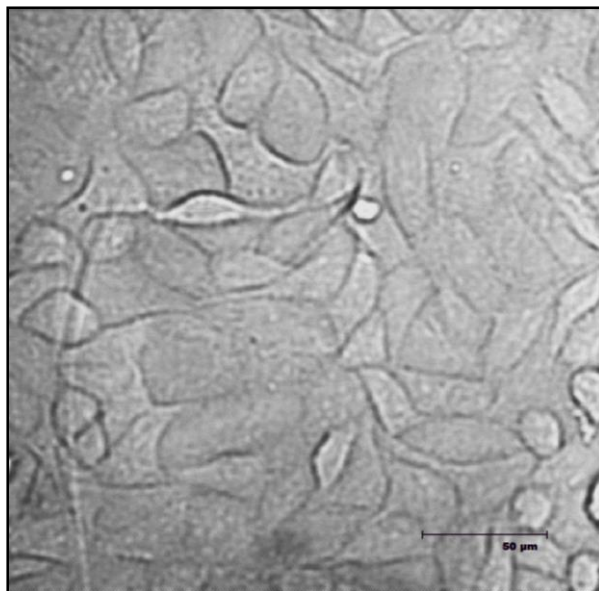
Anexo 1. Fotomicrografías de células DU145, *T. vaginalis* y su interacción en presencia y ausencia de Zn^{2+}

Anexo 2. Fotomicrografías de la interacción de *T. vaginalis* hacia células DU145 en presencia y ausencia de Zn^{2+}

Anexo 3. Artículo presentado en el V Foro Nacional de Divulgación Científica y Tecnológica, Xalapa, Veracruz.

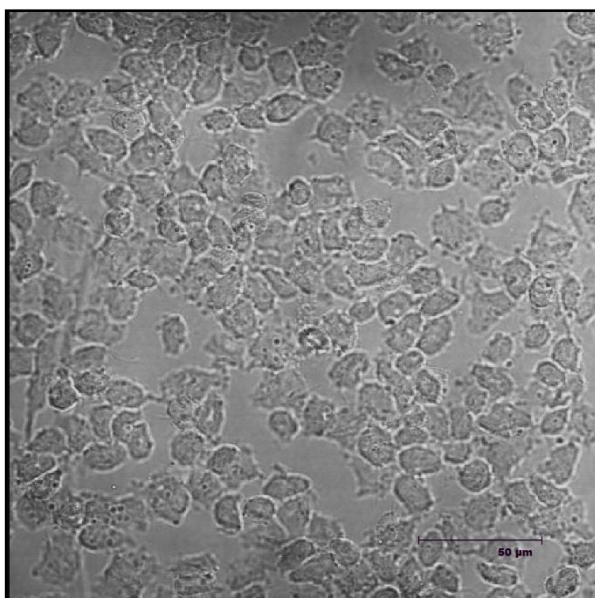
Anexo 1

A) DU-145

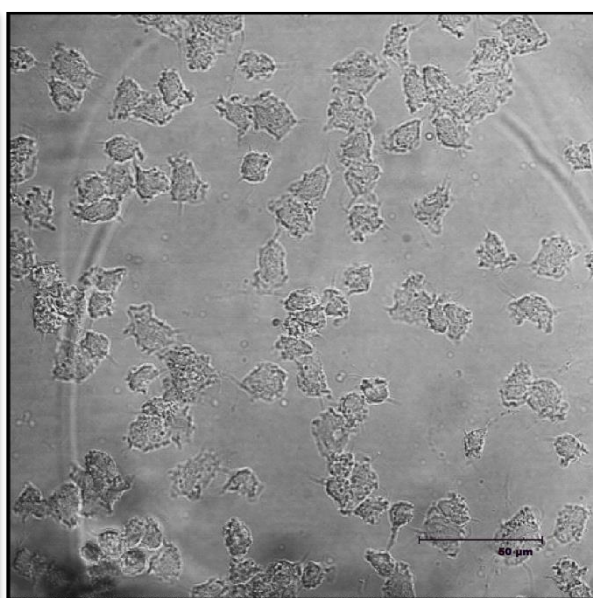


B)

HGMN01 en ausencia de Zn^{2+}



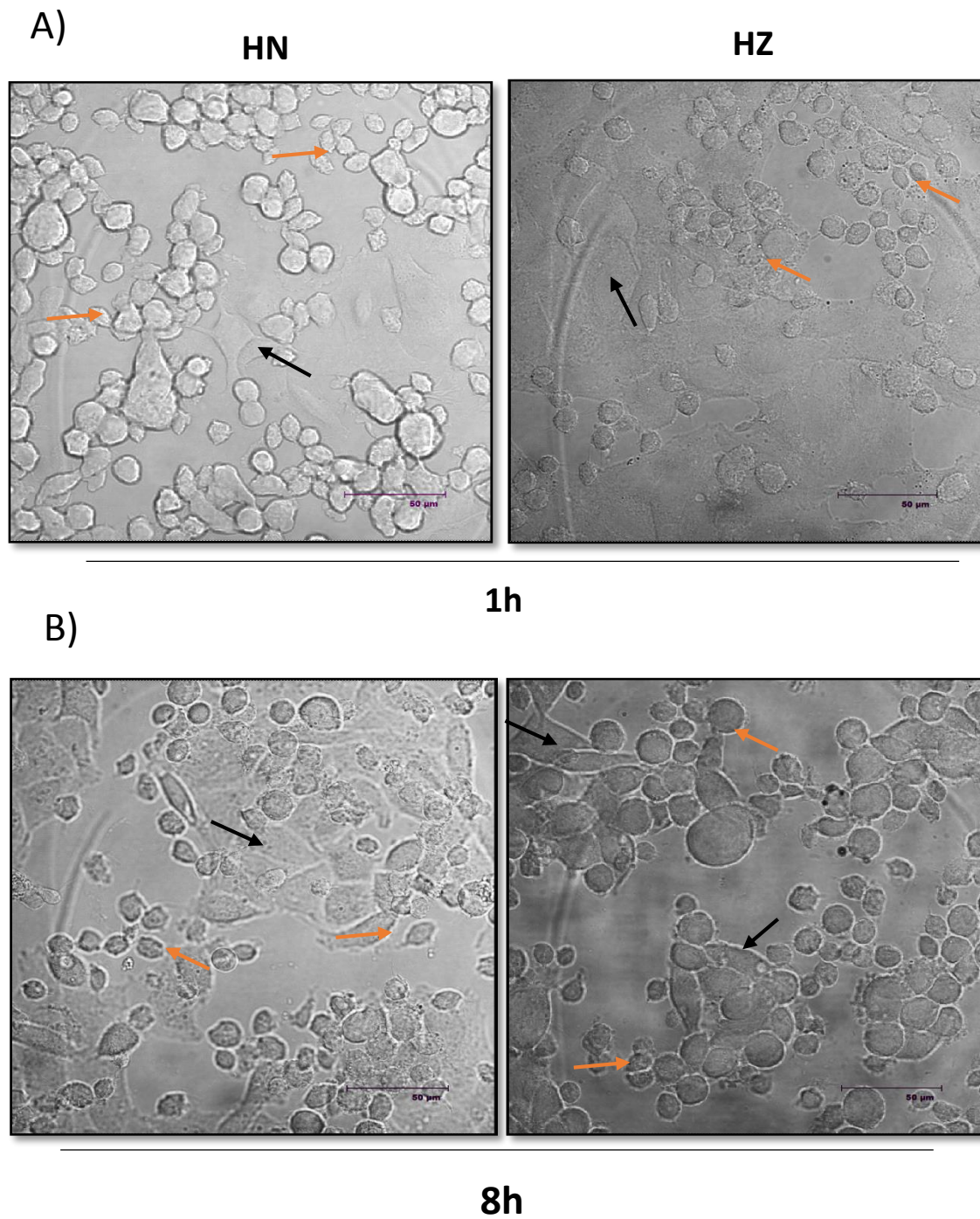
HGMN01 en presencia de Zn^{2+}



A) Fotomicrografía de Células DU145.

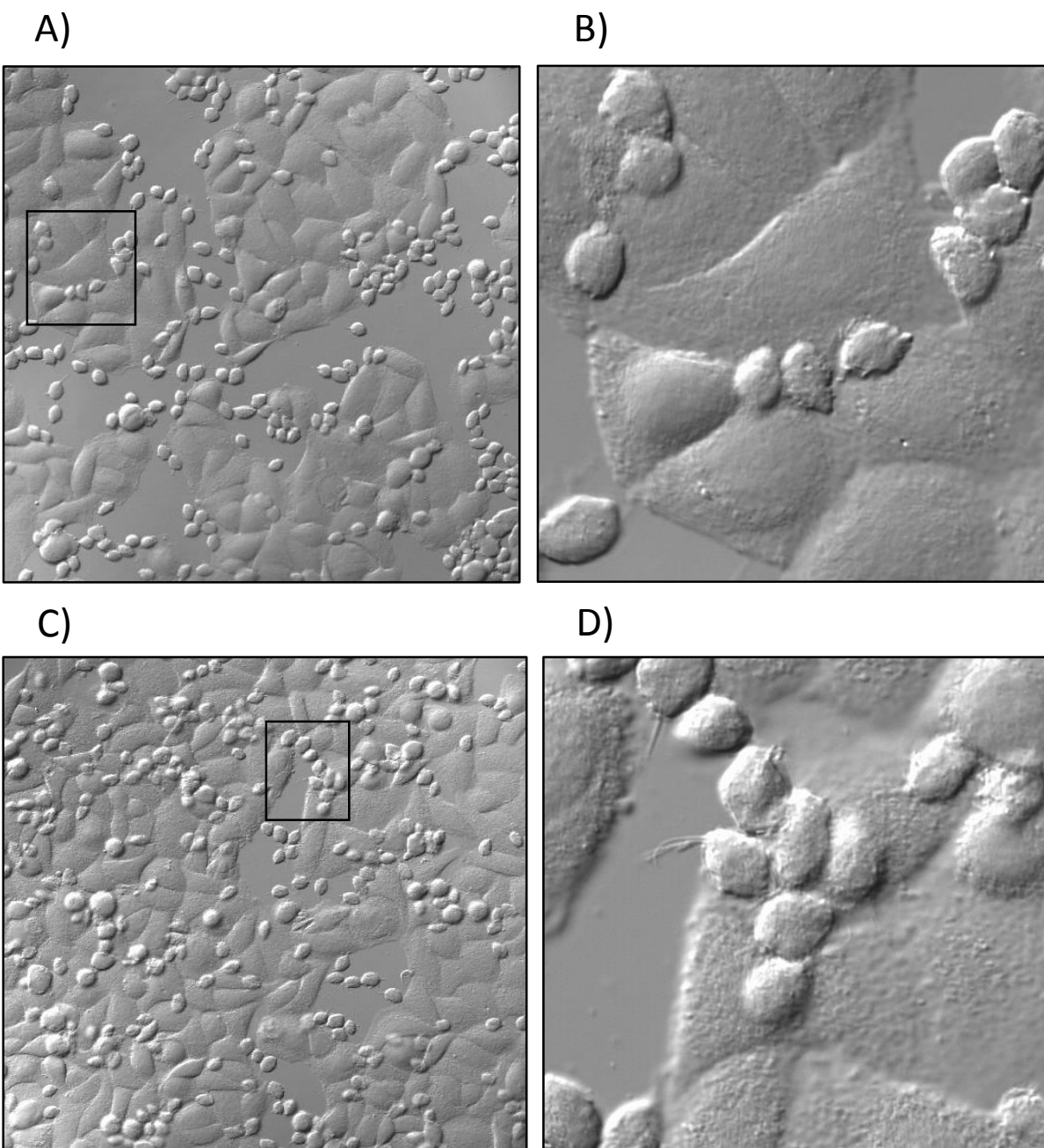
B) Fotomicrografía del aislado HGMN01 en ausencia y presencia de Zn^{2+} .

Imágenes tomadas con Microscopio confocal modelo Leica TSSP2 63x



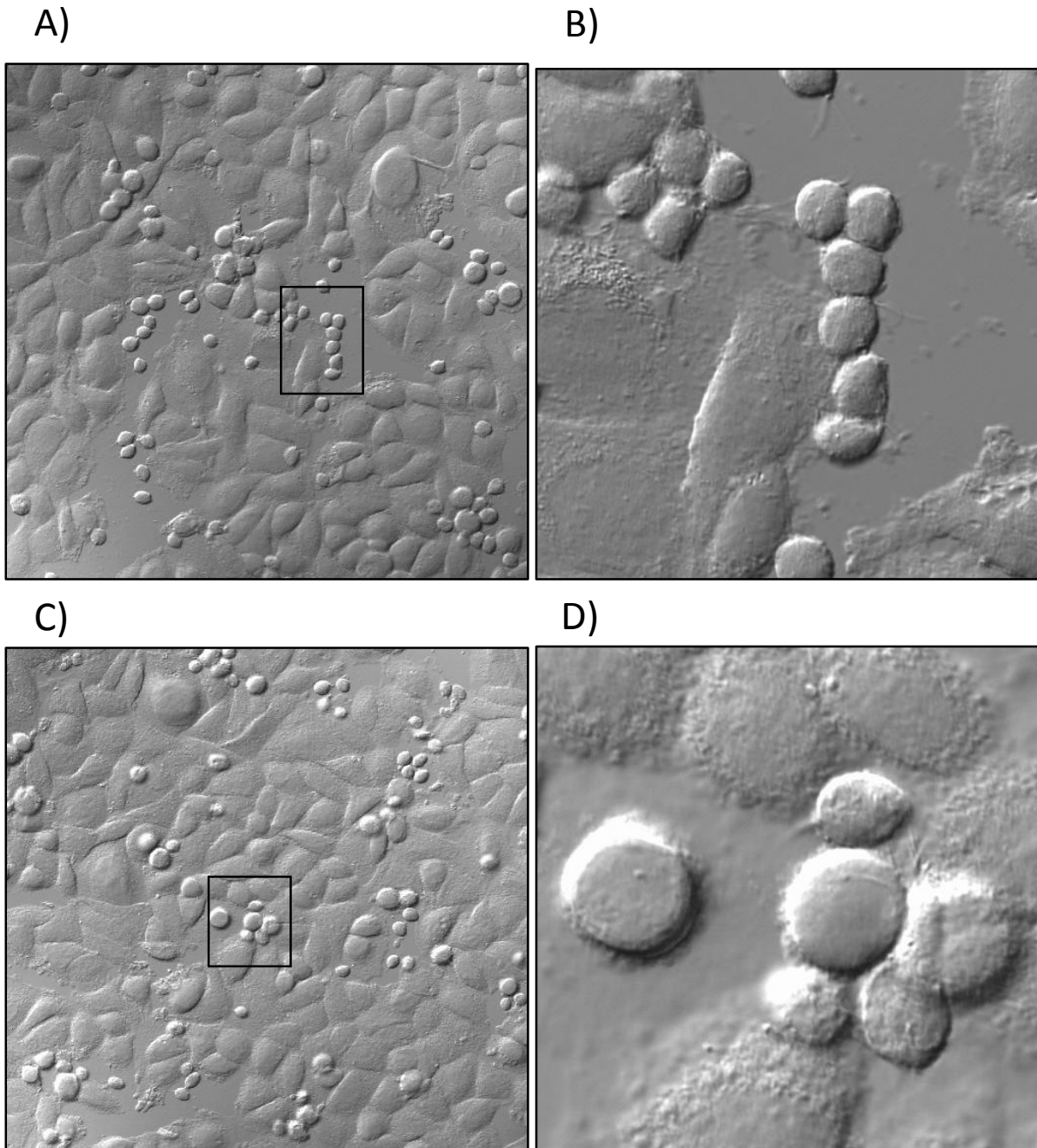
Fotomicrografía de la Interacción de *T. vaginalis* (HGMN01) con células prostáticas DU145 en presencia de Zn^{2+} A) interacción a 1 h B) 8 h en ausencia (HN) y presencia (HZ) de Zn^{2+} . La flecha en negro señala las células DU145 y la flecha naranja señala a *T. vaginalis*. Imágenes tomadas con Microscopio confocal modelo Leica TSP2 63x

Anexo 2



Fotomicrografía de la Interacción de *T. vaginalis* (HGMN01) hacia células DU145 en ausencia de Zn^{2+} .

A) interacción a 1h **B)** Aumento digital de la zona enmarcada en negro. **C)** Interacción a 30 min **D)** Aumento digital de la zona enmarcada en negro. Imágenes tomadas con Microscopio confocal modelo Leica TSSP2 en contraste de fases. 40x



Fotomicrografía Interacción de *T. vaginalis* (HGMN01) hacia células DU145 en presencia de Zn^{2+} .

A) interacción a 1h **B)** Aumento digital de la zona enmarcada en negro. **C)** Interacción a 30 min **D)** Aumento digital de la zona enmarcada en negro. Imágenes tomadas con Microscopio confocal modelo Leica TSSP2 en contraste de fases. 40x

Anexo 3