

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

MAESTRÍA EN CIENCIAS GENÓMICAS

*“Estudio de las proteínas de secreción de
Trichomonas vaginalis durante la interacción con células
prostáticas DU 145 en presencia y ausencia de Zn_2^+ ”*

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA

MARA JAQUELINE RAMOS MILLÁN

Directora de tesis

Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez

Ciudad de México, enero de 2017.

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.

UACMS TDV 412

Tutor

Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez

Profesor Investigador del Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Asesores

Dr. Mauricio Castañón Arreola

Profesor Investigador del Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dr. Jonathan Puente Rivera

Miembro del núcleo académico básico en estancia posdoctoral
Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

M. en C. Alma María de la Luz Villalobos Osnaya

Estudiante de Doctorado en el Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio 1 del Posgrado en Ciencias Genómicas de las Universidad Autónoma de la Ciudad de México bajo la dirección de la Dra. María Elizbeth Álvarez Sánchez y bajo la asesoría del Dr. Mauricio Castañón Arreola, Dr. Jonathan Puente Rivera y la M. en C. Alma María de la Luz Villalobos Osnaya.

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

La estudiante recibió beca por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con número de CVU 632827

Sumario

LISTA DE ABREVIATURAS.....	5
LISTA DE FIGURAS.....	7
RESUMEN.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
Tricomoniasis.....	9
Manifestaciones clínicas.....	9
<i>Trichomonas vaginalis</i>	10
Biología del parásito.....	10
Genoma, transcriptoma y proteoma.....	12
Mecanismos de virulencia.....	14
Citoadherencia.....	14
Citotoxicidad.....	15
Evasión de la respuesta inmune.....	16
Fagocitosis y apoptosis.....	16
Papel regulador del Zn ²⁺ en los mecanismos de virulencia.....	17
Proteínas de secreción en el estudio de patógenos.....	18
Proteínas de secreción en <i>Trichomonas vaginalis</i>	19
ANTECEDENTES DIRECTOS.....	20
JUSTIFICACIÓN.....	21
HIPÓTESIS.....	21
OBJETIVOS.....	22
Objetivo General.....	22
Objetivos Particulares.....	22
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	23
METODOLOGÍA.....	24
RESULTADOS.....	28
DISCUSIÓN.....	51
CONCLUSIONES.....	53
PERSPECTIVAS.....	53
BIBLIOGRAFÍA.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrilo
AP65	Proteína de adhesión de 65 kDa
AP33	Proteína de adhesión de 33 kDa
AP51	Proteína de adhesión de 51 kDa
AP23	Proteína de adhesión de 23 kDa
AP120	Proteína de adhesión de 120 kDa
BspA	Familia de proteínas ricas en leucina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CPS	Cisteína proteinasas
CP30	Cisteína proteinasa de 30 kDa
CP39	Cisteína proteinasa de 39 kDa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMEM	Medio Dulbecco Eagle Modificado
DU 145	Línea celular de adenocarcinoma prostático
dNTPs	Deoxinucleótidos trifosfatados
Fe ²⁺	Hierro
g	Gramos
h	Horas
HeLa	Línea celular de cáncer cervical
HGMN01	Aislado de <i>Trichomonas vaginalis</i> proveniente de paciente masculino
ITS	Infecciones de transmisión sexual
kDa	Kilodaltones
μl	Microlitros
μm	Micrómetros
min	Minutos
mM	Milimoles
mg	Miligramos
ml	Mililitros

NH_4HCO_3	Hidrogenotrioxidocarbonato de amonio
nm	Nanómetros
PAGE	Electroforesis en gel de proliacrilamida
pb	Pares de bases
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Protencial hidrógeno
PSA	Persulfato de amonio
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscriptasa
SDS	Dodecilsulfato de Sodio
SFB	Suero Fetal Bovino
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
TYM	Tripticaseína y extracto de levadura con maltosa
V	Volts
VECs	Células del epitelio vaginal
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
WHO	World Health Organization
Zn^{2+}	Zinc
ZnCl_2	Cloruro de zinc

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Perfil total de proteínas de secreción de <i>T. vaginalis</i> aislado HGMN01 en presencia y ausencia de zinc en PBS-Maltosa 15mM (1DE).....	30
Figura 2. Perfil total de proteínas de secreción de <i>T. vaginalis</i> HGMN01 en presencia y ausencia de zinc en medio DMEM:TYM (1DE).....	33
Figura 3. Perfil de actividad proteolítica de proteínas de secreción de <i>T. vaginalis</i> HGMN01 en presencia y ausencia de zinc (1DE)	36
Figura 4. Perfil total de proteínas de secreción de <i>T. vaginalis</i> HGMN01 en interacción con células DU 145 en presencia y ausencia de zinc (1DE)	39
Figura 5. Perfil de actividad proteolítica de proteínas de secreción de <i>T. vaginalis</i> HGMN01 en interacción con células DU 145 en presencia y ausencia de zinc (1DE)	42
Figura 6. Perfil de proteínas secretadas de <i>T. vaginalis</i> HGMN01 en presencia y ausencia de zinc (2DE).....	45
Figura 7. Perfil de proteínas secretadas de <i>T. vaginalis</i> HGMN01 en interacción con células DU 145 en presencia y ausencia de zinc (2DE).....	48
Figura 8. Gel maestro con pesos moleculares aproximados y punto isoelectrico de los principales spots diferenciales del perfil de proteínas secretadas de <i>T. vaginalis</i> HGMN01 incubadas con células prostáticas DU 145 en ausencia de zinc.....	50

RESUMEN

Trichomonas vaginalis es el agente causal de la tricomonosis, la enfermedad de transmisión sexual no viral con mayor prevalencia a nivel mundial. Éste parásito infecta el tracto genital del humano. En pacientes masculinos, en la mayoría de los casos, la infección es autolimitante y asintomática debido a la presencia de altas concentraciones de Zn^{2+} (>1.6 mM). Se ha descrito que algunas proteínas de secreción son importantes mediadores de la interacción patógeno-hospedero, regulando los mecanismos de patogenicidad, siendo parte fundamental de las estrategias biológicas que los parásitos poseen para lograr establecerse en su hospedero. El objetivo de este estudio fue analizar las proteínas secretadas por *T. vaginalis* durante su interacción con células prostáticas en presencia de Zn^{2+} . Para obtener los perfiles proteínicos y los zimogramas de las proteínas secretadas por *T. vaginalis* durante su interacción con las células prostáticas se obtuvieron los sobrenadantes de cultivo después de 1 y 3 h de interacción con células DU 145 en presencia y ausencia de Zn^{2+} . Las proteínas obtenidas se analizaron en geles SDS-PAGE y en geles SDS-PAGE copolimerizados con gelatina, para detectar actividad proteolítica. Las proteínas totales de secreción se analizaron en electroforesis de dos dimensiones (2DE). Los datos obtenidos indican que las proteínas y proteinasas secretadas por el parásito durante la interacción con células prostáticas aumentan en número y abundancia con respecto al tiempo en presencia del catión, mostrando la expresión diferencial de al menos 3 proteinasas con pesos moleculares aproximados de ~ 50 , ~ 39 y ~ 30 kDa. Los perfiles de 2DE indican la expresión diferencial de al menos 3 proteínas de *T. vaginalis* durante su interacción con células prostáticas en ausencia de Zn^{2+} , de las cuales fue posible identificar una proteína no descrita para el parásito que podría estar asociada a cambios estructurales del parásito durante el contacto con células DU 145.

INTRODUCCIÓN

Tricomonosis

Las infecciones de transmisión sexual son una de las principales causas de enfermedad e infertilidad a nivel mundial y se han descrito más de 30 especies de patógenos bacterianos, virales y parásitos que pueden ser transmitidos por contacto sexual. En adultos entre los 15 y los 49 años de edad se estimó que para el 2008 ocurrieron 498.9 millones de nuevas infecciones de transmisión sexual a nivel mundial, de las cuales alrededor de 276.4 millones fueron por *Trichomonas vaginalis*, convirtiéndolo en el agente causante del mayor número de infecciones de transmisión sexual de origen no viral (WHO, 2012). La incidencia de la infección depende de muchos factores, entre ellos la edad, las costumbres sexuales, número de parejas, la presencia de otras enfermedades de transmisión sexual, la fase del ciclo menstrual y la eficiencia de las técnicas de diagnóstico utilizadas (Van der Pol y cols., 2005). El humano es el único huésped natural de *T. vaginalis* y la transmisión se realiza exclusivamente por contacto sexual.

Manifestaciones clínicas

En las mujeres el parásito infecta principalmente el epitelio escamoso del tracto genital. La infección se caracteriza por presentar descarga vaginal maloliente, irritación e inflamación de la vulva y micro hemorragias puntuales en el cérvix, condición conocida como cérvix de fresa (Wolner-Hanssen y cols. 1989), así como dispareunia, disuria y dolor abdominal. La tricomonosis se ha asociado a distintas comorbilidades, entre ellas la enfermedad pélvica inflamatoria (Cherpes y cols. 2006) y complicaciones obstétricas en las mujeres (Cotch y cols. 1997) e infertilidad (El-Shazly y cols., 2001).

En el hombre, la infección en el 90% de los casos es asintomática y se resuelve espontáneamente en alrededor de tres semanas, a menos que exista reinoculación o que el protozoo haya infectado el tracto genital en regiones tales como la próstata o las vesículas seminales, provocando cuadros de uretritis y prostatitis que pueden volverse

crónicas (Krieger y cols, 1996). Las complicaciones más comúnmente notificadas son la alteración de la motilidad del espermatozoides e infertilidad (Martínez García y cols., 1996) , así como predisposición al cáncer de próstata (Stark y cols. 2009). Las infecciones asintomáticas pueden permitir la persistencia del patógeno en la uretra masculina con un riesgo de subir a la glándula prostática. Al llegar a la próstata el protozoo podría dar lugar a una infección asintomática crónica (Coutss y Tallman, 1959). Por otra parte, la lisis del tejido epitelial de la próstata causada por *T. vaginalis* es restaurada en condiciones de estrés inflamatorio, siendo la inflamación crónica un factor que induce a la progresión del cáncer de próstata. El protozoario, a través de adhesinas, podría desencadenar un mecanismo de cascada que involucra la participación de protooncogenes, tales como *Pim1*, *c-Myc*, y *HMGA1*, y que podría resultar en la carcinogénesis (Sutcliffe, 2006).

La tricomonosis se asocia con una mayor susceptibilidad a la infección por el VIH, reportándose una alta incidencia de tricomonosis en pacientes infectados con el virus (Gatsky y cols., 2010; Mavedzenge y cols, 2010). Ésta susceptibilidad se relaciona con el incremento de la respuesta inflamatoria, alteraciones de la respuesta inmune del hospedero y con las microulceraciones que acompañan a la infección por el parásito (McClelland y cols., 2007).

Trichomonas vaginalis

Biología del parásito

T. vaginalis es un eucarionte unicelular flagelado que pertenece a la clase Parabasalia. Fue descrito por primera vez en 1836 por (Donné, 1836). Presenta únicamente el estadio de trofozoíto con una morfología ovoide que puede variar ante estímulos ambientales, como la interacción con células del epitelio vaginal (Arroyo y cols., 1993) que promueve un cambio a forma ameboide. No se han descrito formas quísticas en su ciclo de vida. Su tamaño oscila entre los 7-23 µm de longitud. El parásito posee cuatro flagelos anteriores de alrededor de 12 µm y un quinto flagelo adosado al margen de una membrana ondulante, la cual se extiende alrededor de dos tercios de la longitud del

parásito. El trofozoíto tiene un solo núcleo que contiene seis cromosomas y la división celular involucra la formación de un huso extranuclear durante la mitosis, sin la desaparición de la membrana nuclear (Honinberg, 1990); presenta aparato de Golgi asociado al retículo endoplásmico y se caracteriza por la ausencia de mitocondrias, destacando en su lugar otros orgánulos parecidos y característicos del género, llamados hidrogenosomas, que tienen un diámetro entre 0.5 y 1.0 μm y constituyen aproximadamente el 6% del volumen celular (Muller, 1993). Los hidrogenosomas poseen doble membrana y contienen una matriz granular y un núcleo. Las proteínas citoplasmáticas que necesitan ser transportadas hacia este orgánulo poseen un péptido señal amino-terminal, que se elimina inmediatamente después de la entrada, como ocurre en las mitocondrias. Estos organelos no contienen DNA. Las reacciones bioquímicas que se producen en estos orgánulos representan una parte integral del metabolismo energético de *T. vaginalis*. Este protozoario carece de algunas rutas metabólicas fundamentales, por lo que le es necesario captar numerosos metabolitos de las células huésped o bacterias presentes en el medio, convirtiéndolo en un parásito obligado. Es microaerófilico y su principal fuente de energía son carbohidratos tales como glucosa, maltosa y galactosa; sacarosa y manosa. El metabolismo de los carbohidratos es fermentativo, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, la glucosa se oxida completamente y sus productos de degradación metabólica incluyen acetato, lactato, glicerol y CO_2 . (Linmark y cols., 1989). *T. vaginalis* no es capaz de sintetizar ácidos grasos de novo.

Para conocer la interacción del parásito con los componentes de la microbiota vaginal se han realizado diversos estudios, observándose que en muestras de 394 mujeres, 11 resultaron infectadas con *T. vaginalis*, de las cuales 8 presentaron niveles bajos de lactobacilos en la vagina y altos niveles de *Mycoplasma sp.*, *Parvimonas sp.* Y *Sneathia sp.*. Aún cuando no es posible establecer una correlación específica, se sugiere que el ácido láctico puede actuar como un agente protector a la infección por *T. vaginalis* (Brotman y cols., 2012).

Se conoce muy poco acerca de la diversidad genética y estructura de poblaciones de *T. vaginalis*. Un panel de 27 marcadores moleculares específicos para el parásito, formado por 21 microsatélites y 6 SNP's, ha proporcionado evidencia acerca de la posible existencia de distintos tipos genéticos del mismo en un estudio realizado con 254 aislados de *T. vaginalis* provenientes de distintas regiones (Conrad y cols., 2012). En este estudio se demostró que existe un gran número de diferencias en cuatro de los seis cromosomas, permitiendo determinar dos tipos genéticos, denominados Tipo 1 y Tipo 2. Además existen diferencias en la frecuencia de infecciones por el virus de *T. vaginalis* (TVV) y la resistencia a metronidazol. Éstas diferencias podrían estar relacionadas a la habilidad de algunos aislados para colonizar preferencialmente el tracto genital masculino. Los aislados del Tipo 1 se encuentran localizados predominantemente en África y el Tipo 2 principalmente en México, mientras que en el resto del mundo es posible localizar ambos tipos.

Genoma, transcriptoma y proteoma

En 2007 se obtuvo la secuencia del genoma de *T. vaginalis*, determinando un tamaño de ~160 Mb, con ~60,000 genes codificantes para proteínas, haciendo notable que se trata de un genoma especialmente grande para un parásito en comparación, por ejemplo, con los ~11.7 Mb que posee el genoma de *Giardia lamblia* (Morrison y cols., 2007). Al menos el 65% del genoma de *T. vaginalis* son secuencias repetidas y se identifican ~65 genes con intrones, tRNA para los 20 aminoácidos esenciales y ~250 rRNA. La presencia de 152 posibles casos de transferencia lateral de genes (LGT) se ha sugerido a partir de procariontes (Carlton, 2007). Debido a el tamaño del genoma, el alto número de repetidos, la presencia de pocos polimorfismos y la evidencia de una expansión de repetidos después de la divergencia de *T. vaginalis* y *T. tenax* se sugiere que el parásito sufrió un incremento substancial en el tamaño de su genoma debido a un cambio de hábitat, favoreciendo la acumulación y duplicación de algunas familias génicas. El genoma contiene elementos que sugieren la presencia del mecanismo de RNA de interferencia (iRNA), solo se ha conseguido identificar un microRNA, *tvamiR-1* que regula negativamente a la malato deshidrogenasa (Wei-Chen y cols., 2009)

Dada la amplia capacidad codificante del parásito, los estudios proteómicos y transcriptómicos son indispensables para identificar y caracterizar las proteínas clave de *T. vaginalis* que participan en el establecimiento de la infección. Los datos de transcriptoma disponibles reflejan la complejidad del genoma, aunque únicamente la mitad de los genes codificados aparecen expresados (Gould y cols., 2013). El parásito posee cientos de pseudogenes codificados por RNA largos no codificantes (lncRNAs) (Woehle y cols., 2014). Los análisis de transcriptoma han demostrado que los miembros individuales de distintas familias génicas se regulan de manera diferente ante estímulos específicos y cambios ambientales, tales como la presencia de hierro, (Horváthová y cols. 2012), la restricción de nutrientes (Huang y cols., 2014) y cambios en la concentración de oxígeno y dióxido de carbono (Paget y cols., 1990).

El genoma de *T. vaginalis* posee 446 genes que codifican para proteinasas, haciéndolo uno de los degradomas más complejos. En extractos totales del parásito analizados en geles de poliacrilamida copolimerizados con gelatina se han identificado 23 cisteína proteinasas distintas, con pesos moleculares entre 23 y 110 kDa (Neale y Alderete, 1990), proteinasas de tipo metalo (Quintas-Granados y cols, 2013) y una serín proteinasa de tipo subtilisina de ~ 82 kDa (Hernández-Romano y cols., 2010).

El proteoma de referencia de *T. vaginalis*, obtenido mediante electroforesis en doble dimensión (2DE), mostró predominantemente proteínas ácidas, con un peso molecular de entre 11 y 72 kDa en un total de 247 spots que representan 164 proteínas en el trofozoíto. Éstas incluyen numerosas proteínas involucradas en el metabolismo de carbohidratos, citoesqueleto, de respuesta a estrés, metabolismo de nucleótidos y algunas proteínas con función en la patogénesis, como cisteína proteinasas (Huang y cols., 2009). Otros estudios más detallados se han enfocado en conocer el proteoma de superficie en procesos de adhesión (Huang y cols., 2012) o comparando diferentes aislados de *T. vaginalis* (de Miguel y cols., 2010), observándose una expresión diferencial proteínas en relación a la adherencia de los parásitos.

Mecanismos de virulencia

Citoadherencia

La adhesión de *T. vaginalis* a las células diana es un paso crítico en la patogénesis del parásito. En numerosos experimentos (Heath, 1981; Alderete y Pearlman, 1984; Alderete y Garza, 1985) se observó la destrucción de monocapas de células después del contacto con los protozoos, sugiriéndose que el contacto entre *T. vaginalis* y las células del hospedero es un factor importante en la patogénesis. El parásito se aloja en el tracto genitourinario femenino y masculino, se conoce que no presenta un ciclo de vida complejo, es posible distinguir cambios en la morfología del parásito de una forma ovoide a una ameboide cuando se adhiere a las células del epitelio vaginal (VECs) Arroyo y cols., 1993) sin embargo en contacto con células de adenocarcinoma prostático (DU 145) el parásito conserva su morfología ovoide (Vázquez-Carrillo y cols. , 2011). El protozoario debe responder a una serie de condiciones adversas, tales como variaciones drásticas en el pH, descamación y para asegurar su supervivencia y mantener una infección. Para establecerse en el tracto genital de mujeres y hombres, el parásito se adhiere y degrada la capa mucosa de las células vaginales y cervicales (Lehker y Alderete, 2000) y de adenocarcinoma de próstata humano (Vázquez-Carrillo y cols., 2011), respectivamente, evento que es mediado por una interacción tipo ligando-receptor altamente específica. En este sentido, se han descrito varias adhesinas y cisteína proteinasas, destacando entre las proteínas de superficie las adhesinas AP120, AP65, AP51, AP33 y AP23 (Arroyo y cols., 1992 y Moreno-Brito y cols., 2005). El hierro regula positivamente la síntesis de estas proteínas a nivel postranscripcional (Lehker y cols., 1991) y es adquirido, en gran parte, mediante la lisis de eritrocitos (Cárdenas-Guerra y cols., 2013). El contacto inicial con la célula huésped determina un cambio en la morfología del protozoario en forma ameboide, con la producción de pseudópodos seguido de un aumento en la síntesis de las adhesinas que está regulado por la disponibilidad de hierro y cisteína proteinasas (Alderete y cols., 1995; Alderete y cols., 2001). Este cambio en la morfología del protozoario, es una consecuencia de la reorganización del citoesqueleto (Fiori y cols, 1999; Arroyo y cols., 1993). El uso de herramientas transcriptómicas ha proporcionado información sobre la transición,

incluyendo genes que regulan el metabolismo del oxígeno, morfología y adhesión (Gould y cols., 2013; Huang y cols., 2012)

GAPDH se ha propuesto como proteína de adhesión (Lama y cols., 2009), al igual que hidratos de carbono de unión a lectina (Choromanski y cols., 1985) presentes en la superficie de *T.vaginalis* y que se correlacionan con la lisis los eritrocitos (de Carli y cols., 1994), la fagocitosis de las células diana (Benchimol y de Souza, 1995) y con la susceptibilidad a fármacos (Dias Filho y cols., 1992). Los glicoconjugados son capaces de unirse específicamente a las células huésped mediante la unión a la galectina-1 (Okimura y cols., 2008). Por otra parte algunas proteínas de membrana pertenecientes a la familia BspA son capaces de unirse a fibronectina. Otras proteínas encontradas en la superficie son TvENO-1 (Mundodi y cols., 2008), las cuales tienen una actividad de unión a ligando y podrían tener un papel importante en la colonización e invasión (Figueroa-Angulo y cols., 2012).

Citotoxicidad

Cuando el protozoo entra en contacto con una célula diana, produce enzimas proteolíticas. tales como TvCP30 (Mendoza-López y cols., 2000), TvCP39 (Hernández y cols., 2004) y TvCP65 (Álvarez-Sánchez y cols., 2000), las cuales se encuentran reguladas por diversos factores del microambiente celular, entre ellos variaciones en el pH, la presencia de inhibidores, cationes como el hierro (Figueroa-Angulo y cols., 2012), el zinc (Vázquez-Carrillo y cols. 2011) y poliaminas. TvCP30 es una proteína inmunogénica presente en secreciones vaginales de pacientes con tricomonosis que es activa al pH y temperatura hallados en la vagina durante la infección; ésta proteína degrada colágeno IV, fibronectina, hemoglobina y laminina. TvCP39 es una proteína capaz de unirse a células DU 145 y VECs y degradar colágeno I, III, IV, hemoglobina e inmunoglobulinas humanas A y G; mientras que TvCP65 afecta al colágeno IV y fibronectina. También se ha identificado el papel de cinco proteínas con actividad de mucinasa que permiten al parásito atravesar la barrera mucosa y tienen actividad proteolítica (Lehker y Sweeney, 1999). Otros factores importantes en la citotoxicidad de

T. vaginalis son CDF- factor de desprendimiento celular (Garber y Favel, 1990), porinas (Fiori y cols. 1999) y la fosfolipasa A2 (Lubick y Burguess, 2004).

Evasión de la respuesta inmune

T. vaginalis activa la vía alterna del complemento, sin embargo, este parásito coloniza un nicho donde este mecanismo es poco activo (Gillin y Sher, 1981). En secreciones vaginales de pacientes infectadas se han detectado altos niveles de interleucina 8 (IL-8) y leucotrienos B4 (LTB4) (Shaio y cols. , 1994; 1995; Shaio y Lin, 1995), así como la producción de IL-8 en cultivos del parásito estimulados con neutrófilos humanos (Ryu y cols., 2004) y monocitos (Shaio y cols., 1995). Al igual que otros organismos, *T. vaginalis* utiliza variación fenotípica como mecanismo de evasión del sistema inmune, expresando alternadamente dos clases de marcadores en la superficie: glicoproteínas altamente inmunogénicas (P270 y P230) y las adhesinas AP65, AP51, AP33 y AP23 (Alderete y cols., 1992).

El papel de las cisteína proteinasas también se ha estudiado en los procesos de evasión de la respuesta inmune del hospedero, siendo éstas capaces de degradar las inmunoglobulinas humanas IgA, IgG e IgM, haciendo que el organismo afectado sea vulnerable a contraer otras infecciones de transmisión sexual (Provenzano y Alderete, 1995). El parásito también es capaz de secretar grandes cantidades de antígenos solubles altamente inmunogénicos, lo que podría neutralizar anticuerpos y linfocitos T citotóxicos (Alderete y Garza, 1984), y recubrirse con proteínas plasmáticas del hospedero (Peterson y Alderete, 1982) o utilizar mimetismo molecular, ya que varias adhesinas del parásito son homólogas a enzimas metabólicas del organismo infectado (Alderete y cols., 2001).

Fagocitosis y apoptosis

Varios estudios han demostrado que *T. vaginalis* tiene la capacidad de degradar y fagocitar una gran variedad de células humanas, incluyendo eritrocitos, leucocitos, células epiteliales vaginales, y microorganismos tales como bacterias, levaduras y

algunas partículas virales (Pereira-Neves y Benchimol, 2007; Rendón-Maldonado y cols., 1998). Otro proceso caracterizado durante la infección por *T. vaginalis* es la inducción de apoptosis (Kang y cols., 2006) mediante las cisteína proteinasas CP2,CP3,CP4 y CPT (Kummery cols., 2008) por su capacidad de unirse a los neutrófilos humanos y modular la actividad de Mcl-1 y caspasa-3, moléculas de control en la muerte celular programada, además de inducir la expresión de IL-8 y citocinas con propiedades quimiotácticas que inducen la inflamación en el tejido vaginal (Ryu y cols., 2004).

Papel regulador del Zn^{2+} en los mecanismos de virulencia

Cationes como el hierro y el zinc juegan un papel fundamental en la regulación de los factores de virulencia del parásito, como se ha demostrado en numerosos trabajos. El hierro es un catión presente en el tracto genital femenino; se ha estudiado su papel como mediador de la resistencia a lisis por complemento (Alderete y cols.,1995), regula positivamente la síntesis de la adhesina AP23 (Lehker y cols.,1991, Alderete y cols., 1995 y Moreno-Brito y cols., 2005) y negativamente la CP30 (Mendoza-López y cols., 2000), modulando así la citoadherencia del parásito. Además, se ha comprobado que el hierro regula negativamente la actividad de CP65 y CP39 (Álvarez-Sánchez y cols., 2007 y Hernández-Gutiérrez y cols., 2003), modulando la citotoxicidad del parásito. Además, se sabe que tiene un papel crucial como regulador de la expresión génica y metabolismo afectando las proteínas del hidrogenosoma (Beltrán y cols. 2013)

El zinc es uno de los elementos más importantes en el cuerpo humano; es componente estructural de numerosas proteínas, hormonas, neuropéptidos, receptores hormonales y componente catalítico de más de 200 enzimas (Fabris y Mocchegiani, 1995). La tricomonosis normalmente es designada como una enfermedad relacionada al género que afecta principalmente a mujeres, debido a que en el hombre la infección es autolimitante. El zinc funciona como agente tricomonocida en el microambiente prostático, donde se detectan concentraciones elevadas de este catión (4.5 a 7 mM), no obstante en concentraciones menores a 1.6 mM permiten el establecimiento del

parásito (Krieger y cols., 1982). En concentraciones ≥ 1.6 mM disminuye la adhesión y citotoxicidad del *T. vaginalis* sobre monocapas de células DU 145, ya que el parásito es capaz de inducir la degradación de monocapas de células prostáticas DU 145 de una forma contacto dependiente. La citotoxicidad del parásito hacia las células HeLa no es afectada por la presencia de zinc, sin embargo, sí muestra un efecto negativo en la citotoxicidad hacia las células prostáticas DU 145 (Vázquez-Carrillo y cols., 2011). El mecanismo de regulación por zinc en el parásito aún se desconoce.

Proteínas de secreción en el estudio de patógenos

Las vesículas extracelulares secretadas tienen la capacidad de modular distintos componentes involucrados en la patogénesis, formando parte de las estrategias biológicas que los parásitos poseen para lograr establecerse en su hospedero, evadir la respuesta inmune del mismo y mediar la comunicación intracelular (Yáñez-Mó y cols., 2015). El interés por analizar los productos de secreción se ha extendido en el estudio de diversos patógenos microbianos, entre ellos *Helicobacter pylori* (Bumann y cols., 2002), *Aspergillus flavus* (Medina y cols., 2005) y *Listeria spp.* (Trost y cols., 2005), en los cuales se ha reconocido la importancia que tienen las proteínas del secretoma en la regulación de la interacción con el hospedero y como mediadores en los mecanismos de patogenicidad. Por otra parte se han realizado estudios al respecto en protozoarios como *Trypanosoma cruzi* (Bayer-Santos y cols., 2013), *Leishmania spp.* (Silverman y cols., 2010), *Toxoplasma gondii* (Pope y cols., 2013) y *Giardia lamblia* (Wampfler y cols., 2014). En patógenos de transmisión sexual, se han reportado estudios sobre las proteínas de secreción de *Candida albicans* (Gil-Bona y cols., 2014), tratándose de proteínas citoplasmáticas con una posible relación aún no descrita, y en *Neisseria gonorrhoeae* (Nudel y cols., 2015). En éste último caso, se comprobó la inducción del inhibidor de la apoptosis-2 (clAP2) en células del epitelio cervical después de su estimulación con el parásito, proponiéndose que el efecto puede ser mediado por exosomas.

Proteínas de secreción en *Trichomonas vaginalis*

T. vaginalis utiliza múltiples estrategias para poder establecerse y llevar a cabo la infección, entre ellas la secreción de proteínas solubles al medio (Alderete y Garza, 1984). El primer efecto de *T. vaginalis* en cultivo celular se analizó poniendo en contacto tricomonas vivas con células embrionarias de humano y de aves domésticas, observándose su "retracción", fenómeno que también se encontró cuando las células se pusieron en contacto con sobrenadantes filtrados del cultivo del protozoario. Estos resultados iniciales sugirieron que *T. vaginalis* puede causar daño a las células de su hospedero a través de toxinas secretadas (Houge, 1943) y diversos trabajos posteriores han mostrado que algunas cisteína proteinasas se secretan al medio, (Alderete y cols., 1991), encontrándose en las secreciones de pacientes con tricomonosis activa.

Actualmente se ha comprobado que las proteínas secretadas por *T. vaginalis* inducen la expresión de IL-8, ciclo-oxygenasa-2 (COX-2) y fibronectina-1(FN-1) al contacto con células del epitelio vaginal (VECs) (Kucknoor y cols., 2005). La identificación mediante espectometría de masas de los sobrenadantes filtrados permitió conocer que entre las proteínas involucradas se encuentran cisteína proteinasas, la adhesina AP65, proteínas de choque térmico (HSPs), enzimas del metabolismo de carbohidratos, tioredoxin reductasa y coroninas; estas proteínas permiten el establecimiento del parásito, la adopción de una forma ameboide durante la adhesión y están involucradas en los procesos de citotoxicidad (Kucknoor y cols., 2007).

En *T. vaginalis* se ha reportado la producción y secreción de microvesículas con propiedades físicas y bioquímicas similares a las de los exosomas de mamíferos. Éstas partículas de entre 50 y 100 nm de diámetro poseen un contenido diverso que incluye proteínas exosomales, proteínas específicas del patógeno y RNA, y están involucradas en los procesos de citoadherencia, comunicación entre parásitos, colonización del tejido y modulación de la respuesta inmune del hospedero (Twu y cols., 2013).

ANTECEDENTES DIRECTOS

Diferentes estudios morfológicos, ensayos de citotoxicidad y análisis proteómicos se han desarrollado a partir de cultivos de *T. vaginalis* crecidos en presencia y ausencia de Zn^{2+} . Los resultados del comparativo de geles 2DE muestran la expresión diferencial de 27 proteínas, entre las que se incluyen fimbrinas, adenosilhomocisteinasa, asparraginil endopeptidasa-like cisteín-peptidasa y aminopeptidasa p-like metaloproteinasa (Vázquez-Carrillo, y cols., 2011). Hasta el momento se han caracterizado los procesos de citoadherencia y citotoxicidad del parásito durante su interacción con células DU 145 en presencia y ausencia de Zn^{2+} , revelando un efecto negativo del catión en ambas propiedades. Los análisis de expresión génica de *T. vaginalis* en las mismas condiciones mostraron que la presencia del catión altera de forma variable la morfología del parásito, así como su actividad citotóxica y de adhesión a través de un efecto negativo en la expresión de los genes *ap65*, *ap33*, *enolasa*, *tvcp39*, *mp50* y *tvfim1* y un efecto positivo en *gapdh*, confirmando que las múltiples propiedades de virulencia del parásito durante su interacción con células prostáticas son afectadas por la presencia del Zn^{2+} (Villegas-Vázquez, 2015). Sin embargo, hasta el momento se carece de estudios proteómicos detallados sobre las proteínas de secreción en interacción con células masculinas y en presencia de factores moduladores como el Zn^{2+} .

JUSTIFICACIÓN

Las proteínas secretadas por distintos patógenos son importantes mediadores de los eventos que ocurren durante la interacción con su hospedero. *T. vaginalis* secreta proteínas al medio y a su vez los mecanismos de patogenicidad del parásito durante la infección del tracto urogenital masculino pueden estar regulados por componentes del microambiente prostático, como son las células prostáticas y factores como el Zn^{2+} .

Por lo tanto, identificar las proteínas secretadas por *Trichomonas vaginalis* durante su interacción con células prostáticas, en presencia y ausencia de Zn^{2+} , contribuirá a entender las bases moleculares de la patogénesis de la tricomonosis masculina durante la interacción hospedero-patógeno.

HIPÓTESIS

Existe una expresión diferencial de proteínas de secreción de *T. vaginalis* durante su interacción con células prostáticas que a su vez es alterada por la presencia de Zn^{2+} .

OBJETIVOS

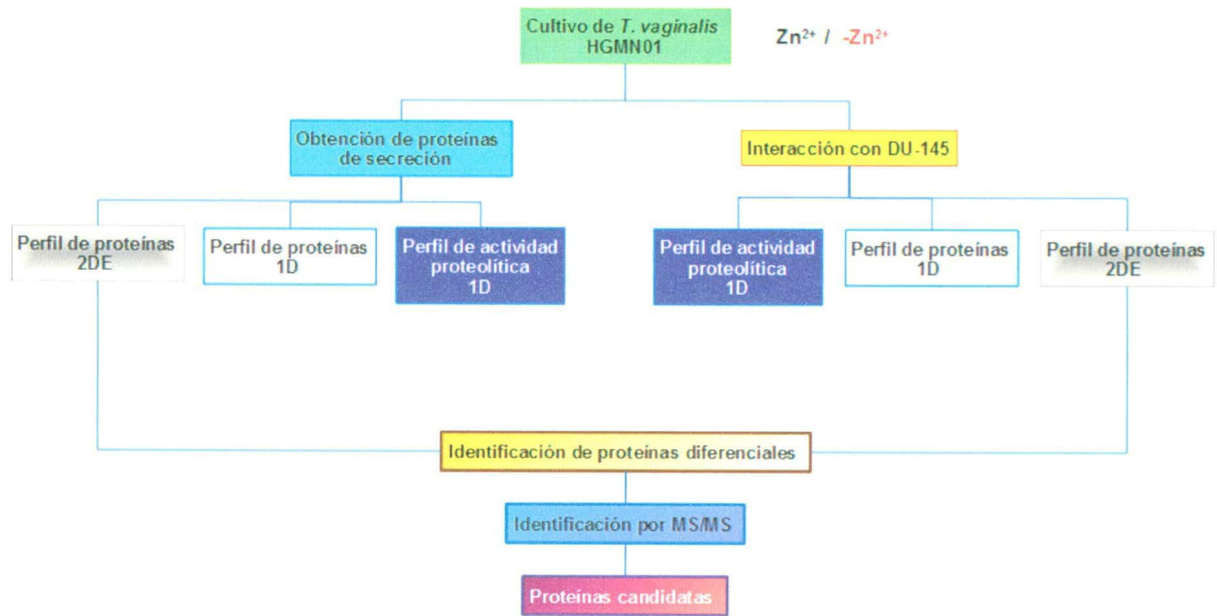
Objetivo General

Analizar las proteínas secretadas de *T. vaginalis* durante su interacción con células prostáticas DU 145 en presencia y ausencia de Zn^{2+} .

Objetivos Particulares

1. Obtener el perfil de proteínas secretadas de *T. vaginalis* crecidas en presencia y ausencia de Zn^{2+} .
2. Obtener el perfil de las proteínas secretadas durante la interacción de *T. vaginalis* con células prostáticas en presencia y ausencia de Zn^{2+} .
3. Identificar alguna proteína secretada diferencialmente durante la interacción de *T. vaginalis* con células prostáticas DU 145 en presencia y/o ausencia de Zn^{2+} .

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



METODOLOGÍA

Cultivos

Cultivo de Trichomonas vaginalis

El aislado HGMN01 de *Trichomonas vaginalis* se cultivó en medio TYM (tripticaseína y extracto de levadura con maltosa) adicionado con 10% de suero de caballo inactivado por calor, durante 24 h a 37° para obtener parásitos en fase logarítmica de crecimiento. Para la condición con zinc el medio se complementó con 1.6 mM de cloruro de zinc (ZnCl_2), el cual fue agregado al medio 24 h antes de su utilización para acondicionarlo.

Cultivo de células DU 145

Las células DU 145 se cultivaron en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) adicionado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor y 10 µg de penicilina y estreptomicina en incubación a 37° con 5% de CO_2 . Para los ensayos de interacción sólo se utilizaron aquellos cultivos en los que se formó una monocapa con confluencia mínima del 95%.

Obtención de proteínas de secreción de *T. vaginalis*

Se preparó PBS-Maltosa 15 mM y medio de interacción DMEM-TYM (2:1, libre de suero para que las proteínas presentes en éste no interfirieran en la detección de las proteínas de secreción). A los medios para la condición con zinc se les adicionó 1.6 mM de ZnCl_2 , 24 h antes de su utilización para acondicionarlos.

La viabilidad de los parásitos de cada condición se determinó por azul de tripano, trabajando con aquellos que tuvieran al menos un 95% de viabilidad. Los parásitos se centrifugaron a 1800 rpm, 5 minutos a 4°C y la pastilla se lavó con 5 ml de medio de interacción DMEM:TYM 2:1 sin suero o con PBS-Maltosa 15 mM, según el caso. Se colocaron 10.5×10^6 parásitos en 6 ml de PBS-Maltosa o medio DMEM:TYM en tubos Falcon, dejándolos en incubación a 37°C. Tras una y tres horas de incubación los tubos se centrifugaron a 900 g, por 5 minutos a 4°C, el sobrenadante se recuperó y se filtró por una membrana de 0.22 µm, colectándolo en un tubo Eppendorf. Las pastillas de

parásitos se almacenaron para obtener extractos totales, incluidos como control.

Las proteínas de secreción y extractos totales se precipitaron añadiendo ácido tricloroacético (TCA) en una concentración final del 10%, dejando actuar a 4°C durante una hora para posteriormente centrifugar a 12,000 g, 5 minutos a 4°C y se dieron tres lavados a la pastilla con acetona fría. Se agregaron 30 µl de buffer de carga a las muestras de secreción y 100 µl a los extractos totales.

Una vez estandarizadas las condiciones de obtención de la muestra, en adelante las proteínas de secreción se obtuvieron utilizando medio de interacción DMEM:TYM 2:1 y el extracto se concentró con un centrífugo Amicon 3NMWL, centrifugando a 5,000 g por 10 minutos para obtener un volumen final de 250 µl de muestra. Este volumen se dividió en dos partes iguales, una se destinó a precipitar las proteínas utilizando TCA y la otra para los ensayos de actividad proteolítica.

Electroforesis en gel en una dimensión

Las proteínas de secreción obtenidas del medio de interacción y controles se resuspendieron en 100 µl amortiguador de Laemmli, se hirvieron durante 5 minutos y se centrifugaron a 12,000 g por 5 minutos a 4°C y de esto se cargaron 10 µl en geles de poliacrilamida al 10%. Para la electroforesis se aplicaron 100V por 1h 30 min y las proteínas fueron visualizadas por tinción con nitrato de plata (para condiciones iniciales de proteínas no concentradas y ensayos con PBS-Maltosa) o Azul de Coomassie R-250.

Obtención de perfiles de actividad proteolítica

Para detectar la actividad de proteinasas en las proteínas filtradas de cultivo se prepararon geles de poliacrilamida al 10% copolimerizados con gelatina al 9%. La porción de la muestra destinada al análisis se resuspendió en 125 µl de buffer de carga, centrifugando a 12,000 g por 5 minutos a 4°C y de esto se cargaron 15 µl en el gel copolimerizado. Los geles se corrieron a 100V por aproximadamente 1 h 30 min. Transcurrido ese tiempo se trasladaron a un recipiente con 20 ml de Tritón x100 al

2.5%, dejando actuar en agitación por 30 minutos. Se decantó el Tritón y se añadieron 25 ml de amortiguador de acetato de sodio pH 4.5 con 25 μ l de β -mercaptoetanol, dejándolos en incubación a 4°C y 37°C, durante 1, 1.5, 3, 5 horas y toda la noche (Tabla 2) El amortiguador de acetatos se retiró y los geles se tiñieron con Azul de Coomassie R-250.

Para el análisis en doble dimensión se utilizaron tiras IPG de 7 cm con un rango de pH 3-10. Las tiras se rehidrataron mediante hidratación activa por 12 h con 150 μ g de la muestra y una mezcla de amortiguador de hidratación (CHAPS 4%, Urea 7M, DTT-70mM y azul de bromofenol al 1%) y anfolinas del pH correspondiente. El isoelectroenfoque se realizó en tres pasos (1:250V-00:40, 2: 4000V-03:00 y 3: Hasta alcanzar 10,000V) y a su término se equilibraron con dos amortiguadores, uno con DTT y otro con iodoacetamida (IAA) por 15 minutos cada uno.

La segunda dimensión se corrió en un gel de acrilamida al 10% a 110V por 1 h. Las proteínas se visualizaron por tinción con Azul de Coomassie G-250 y las imágenes de los geles fueron analizadas mediante la plataforma PDQuest para localizar las proteínas expresadas diferencialmente.

Ensayo de Interacción

Para los ensayos de interacción se utilizaron 4×10^7 parásitos crecidos en ausencia y/o presencia de Zn^{2+} . Para los ensayos se utilizaron cajas de cultivo de 75 cm^2 8×10^6 células prostáticas DU 145 que fueron incubadas con parásitos, en una relación 1:5, durante 3 h a 37 ° con 40 ml en medio de interacción DMEM-TYM 2:1 sin suero. Transcurrido ese tiempo se recuperó el sobrenadante, mismo que se concentró con un centrífugo Amicon 3NMWL, centrifugando a 5,000 g por 10 minutos para obtener un volumen final de 250 μ l de muestra. Este volumen se dividió en dos partes iguales, una se destinó a precipitar las proteínas utilizando TCA y la otra para los ensayos de actividad proteolítica, con el mismo protocolo descrito anteriormente para la secreción del cultivo sólo con parásitos.

Identificación de proteínas por espectrometría de masas

Después del análisis, aquellos *spots* que se visualizaron diferencialmente en los geles de 2DE fueron cortados del gel para su análisis por espectrometría de masas.

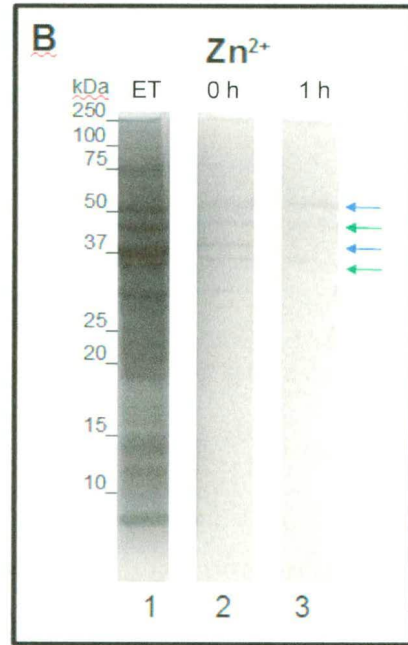
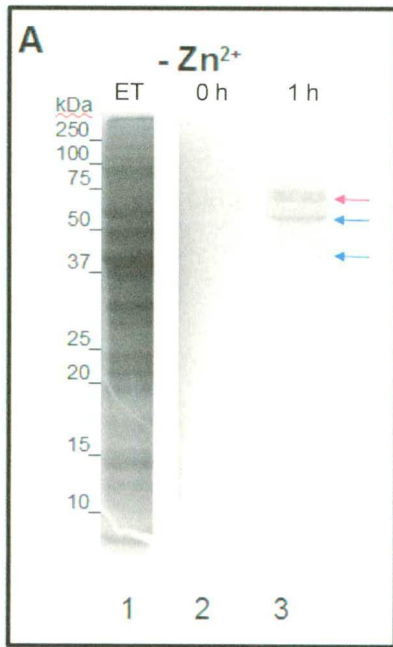
Los spots fueron cortados manualmente, desteñidos con ACN:NH₄HCO₃ 50mM (50:50 v/v). La digestión proteica se llevó a cabo durante 18 horas a 37°C con tripsina grado masas (Promega V528A). Se extrajeron los péptidos obtenidos de la digestión (ACN:H₂O:ácido fórmico 50:45:5 v/v), se disminuyó el volumen de la muestra en un concentrador (Eppendorf 5301) y se desaló la muestra utilizando columna C18 (ZipTipC18). La muestra se colocó por sextuplicado en la placa utilizando como matriz α -ciano, y se analizaron en un MALDI TOF/TOF 4800. Con los espectros MS/MS obtenidos se realizó una búsqueda Con el algoritmo de búsqueda Paragon del software ProteinPilot, con un porcentaje de confianza del 66%..

RESULTADOS

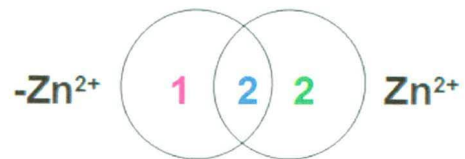
Obtención de proteínas de secreción de *T. vaginalis*

La primera parte del trabajo incluyó el desarrollo de un protocolo para la obtención de las proteínas secretadas por el parásito, el cual se estandarizó para posteriormente realizar el análisis proteómico. El perfil en 1DE de las proteínas secretadas por *T. vaginalis* se obtuvo utilizando dos medios distintos para comprobar el rendimiento y eficacia de los mismos. El primero de ellos, PBS-Maltosa 15 mM, en condiciones normales nos permitió observar la presencia de 3 bandas a 1h de cultivo (Figura 1, panel A, carril 3), mientras que en la condición con Zn^{2+} es posible distinguir 4 en el mismo tiempo de incubación (Fig. 1, panel B, carril 3). La Fig. 1 muestra los perfiles de proteínas secretadas a las 0h (Figura 1, panel A y B, carril 2) y extractos totales de parásitos (Figura 1, panel A y B, carril 1) usados como controles.

Figura 1. Perfil total de proteínas de secreción de *T. vaginalis* aislado HGMN01 en ausencia ($-\text{Zn}^{2+}$, panel A) y presencia de zinc (Zn^{2+} , panel B) en PBS-Maltosa 15mM. Los carriles enumerados corresponden a Extractos totales (1), perfil de proteínas de secreción a las 0 h (2) y perfiles de proteínas de secreción a 1 h (3). Se observa la presencia de 3 bandas (flechas azules y rosa) a 1h de secreción en condiciones normales y 4 bandas (flechas azules y verdes) en presencia del catión. Geles SDS-PAGE 10 % teñidos con plata mostrando los productos de secreción concentrados y precipitados con TCA 10%. Las flechas representan las proteínas secretadas como se indica en resultados y se incluye Diagrama de Venn (C) para distinguir las bandas comunes y diferenciales en cada condición. kDa. Marcador de peso molecular de amplio rango en kilodaltones.



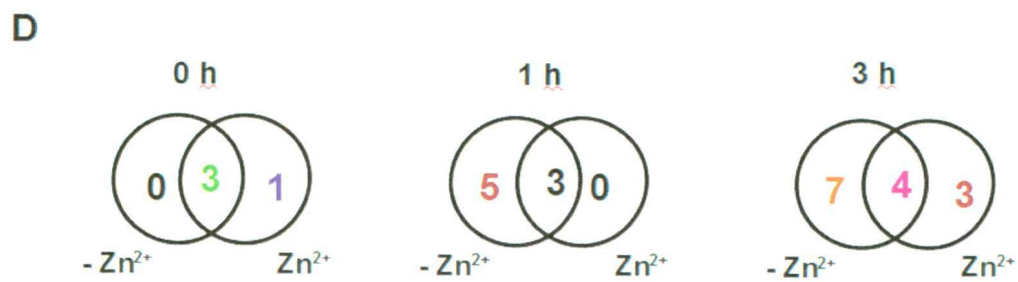
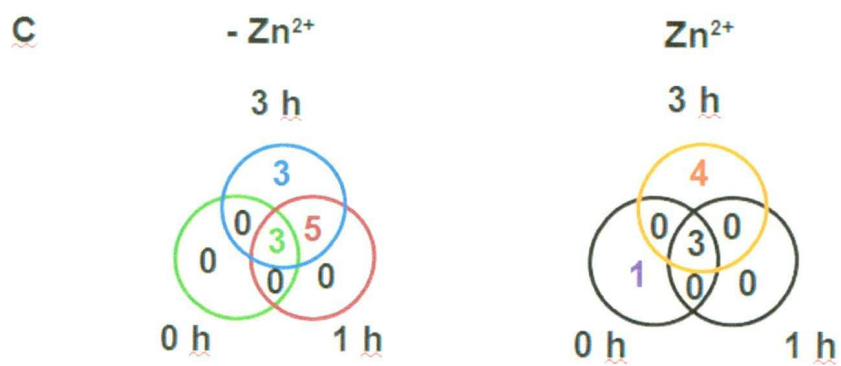
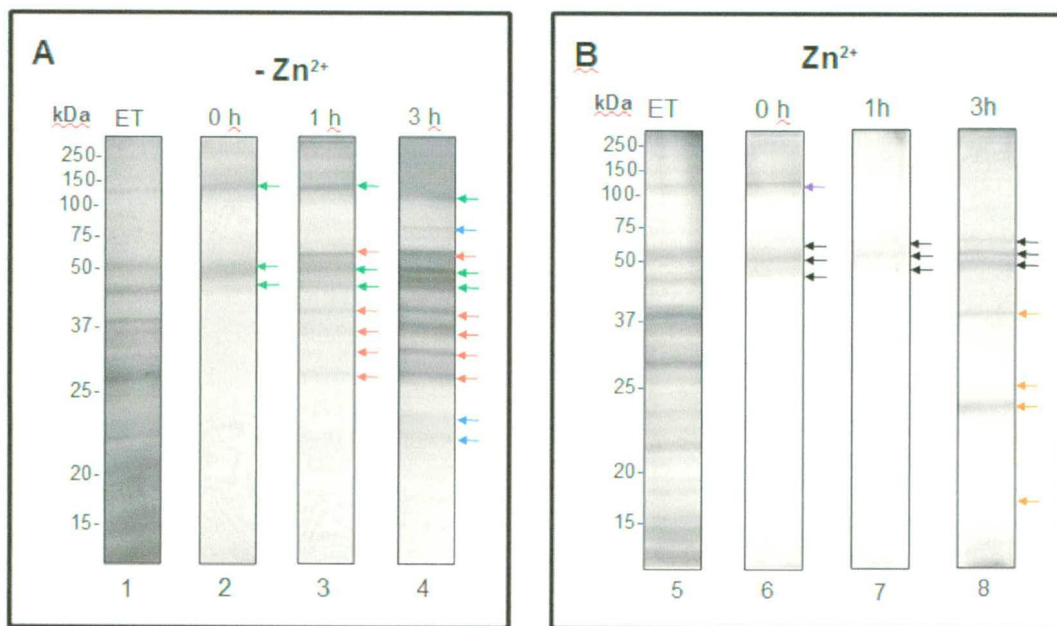
C



Se observó que un medio de secreción mínimo, compuesto por PBS-Maltosa, no favorecía la secreción de productos del parásito, posiblemente debido a la falta de nutrientes. Adicional a esto, se tomó en cuenta que para realizar los ensayos de interacción era necesario cultivar a los parásitos y a las células DU 145 en un medio óptimo para su supervivencia, por lo que se utilizó el medio DMEM:TYM 2:1, previamente reportado en el trabajo (Tesis, Villegas-Vázquez, 2015). Para tener un perfil completo de proteínas se utilizó para recuperar el medio un centrífugo con punto de corte bajo (3 kDa).

Los siguientes ensayos se realizaron con medio de interacción DMEM:TYM y se obtuvieron también los perfiles de secreción a las 3 horas de incubación, permitiendo la detección de un mayor número de bandas (Fig. 2A, carril 4). Las proteínas secretadas en ausencia de zinc y presencia del mismo se compararon, las flechas verdes indican 5 bandas de proteínas presentes en ausencia del catión a las 0, 1 y 3 h de incubación a 37 °C, se observan además 5 bandas (Fig. 2A, flechas rojas carriles 3 y 4). A las 3 h de incubación se observaron 3 bandas de proteínas secretadas solo a este tiempo (Fig. 2A, flechas azules, carril 4). Después del tiempo total de incubación se encuentran 11 bandas en secreciones de *T. vaginalis* de los 20 a 150 kDa. La figura muestra los perfiles de proteínas de extractos totales (ET) (carril 1). Las flechas negras indican proteínas presentes en Zn^{2+} a las 0, 1 y 3 h de incubación. A 0 h se encontró 1 banda diferencial de ~100 kDa (Fig. 2B, flecha morada carril 6), y a las 3 h se observaron 4 bandas de proteínas secretadas diferencialmente (Fig. 2B, flechas naranjas carril 8) de los 30 a 75 kDa. El extracto total (ET) muestra el perfil de proteínas del parásito (carril 5). Los resultados de ambas condiciones mostraron que se secretan menos proteínas en presencia de Zn^{2+} (7 bandas) mientras que en ausencia de Zn^{2+} se sugiere que existe una mayor cantidad de proteínas secretadas (11 bandas) (Diagrama C). Los datos anteriores muestran que el Zn^{2+} regula negativamente la secreción de proteínas de *T. vaginalis* y que la secreción de proteínas es dependiente del tiempo (Diagrama D).

Figura 2. Perfil total de proteínas de secreción de *T. vaginalis* HGMN01 en ausencia ($-\text{Zn}^{2+}$, panel A) y presencia de zinc (Zn^{2+} , B) en medio DMEM:TYM 2:1. SDS-PAGE 10 % teñidos con plata. Los carriles enumerados corresponden a Extractos totales (1 y 5), perfil de proteínas de secreción a las 0 h (2 y 6), perfiles de proteínas de secreción a 1 h (3 y 7) y perfiles de proteínas de secreción a 3 h (4 y 8). Las flechas representan las proteínas secretadas como se indica en resultados. Diagramas de Venn para distinguir el número de bandas comunes y diferenciales en cada condición (C) y de acuerdo al tiempo (D). kDa Marcador de peso molecular de amplio rango en kilodaltones.

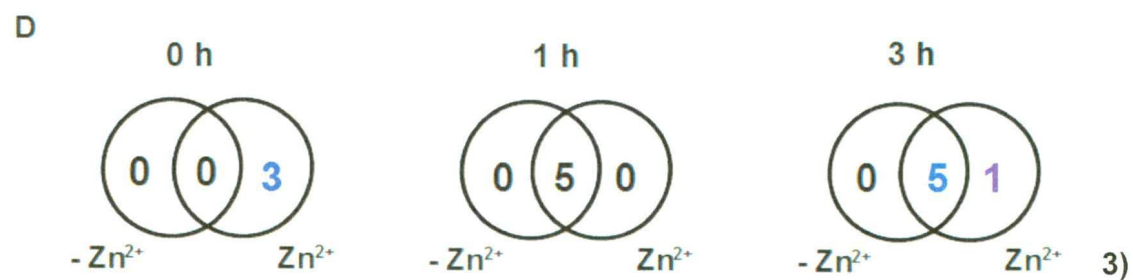
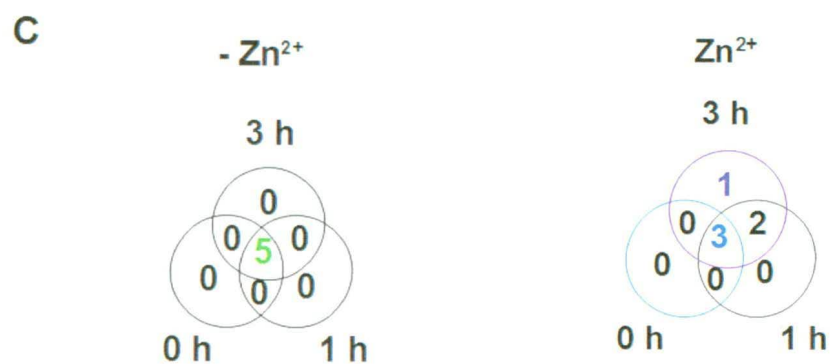
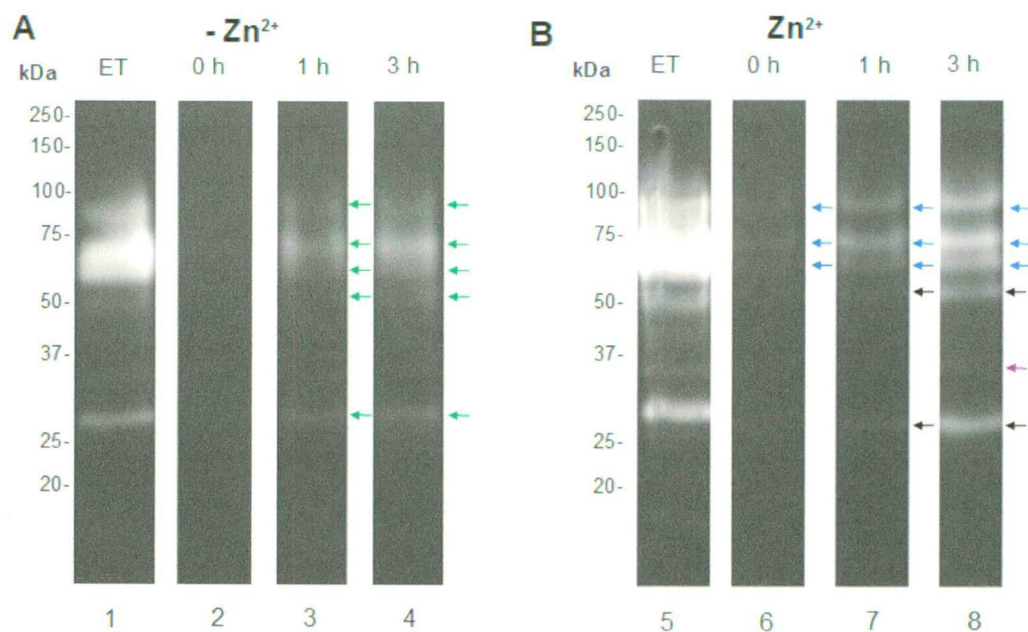


Perfil de actividad proteolítica de las proteínas de secreción de *T. vaginalis*

Para determinar el tiempo y temperatura de activación de las proteinasas se realizaron pruebas a 1h, 1.5 h, 3h, 5h y 16h en incubación con amortiguador de acetatos a 4°C y 37°C. En los geles incubados a 4°C la actividad se perdió a partir de las 5h, mientras que en los que fueron incubados a 37°C se detectó actividad proteolítica en todos los tiempos de incubación, con un óptimo de actividad después de una hora de incubación en amortiguador de acetatos pH 4.5, por lo tanto, en lo subsecuente los geles de proteinasas se activaron a 37 °C durante una hora.

No se observó actividad proteolítica en secreciones de 0 h en ausencia de zinc (Fig. 3A carril 2). Las flechas verdes indican actividad proteolítica a 1 y 3 h de incubación a 37 °C donde se encontraron 5 bandas de actividad proteolítica en el rango de 30 a 100 kDa (Fig. 3B, carriles 3 y 4). Las flechas azules, negras y morada indican bandas de actividad proteolítica en zinc presentes a las 0, 1 y 3 h de incubación a 37°C (Fig. 3B, carriles 6, 7 y 8). Se observó la presencia de 3 bandas de actividad proteolítica de 30 a 65 kDa a las, 0, 1 y 3 h de incubación (Fig. 3B, flechas azules, carriles 7 y 8). En negro se señala la actividad tanto en 1 h y 3h, mientras que en el carril 8 se señala la presencia de una banda de alrededor de 37 kDa exclusiva de la condición con zinc a las tres horas de cultivo. Los resultados de ambas condiciones mostraron que la actividad proteolítica es favorecida en presencia del catión, sin embargo existe una menor secreción de proteínas totales en presencia de Zn^{2+} , con respecto a la condición control, lo que sugiere que otro tipo de proteínas son secretadas al medio. Nuestros resultados muestran que las proteinasas son ahora moduladas positivamente por Zn^{2+} y esta actividad incrementa respecto al tiempo de cultivo de los parásitos. Por lo anterior, se sugiere que el Zn^{2+} regula positivamente la actividad proteolítica de algunas proteinasas presentes en las secreciones de *T. vaginalis*.

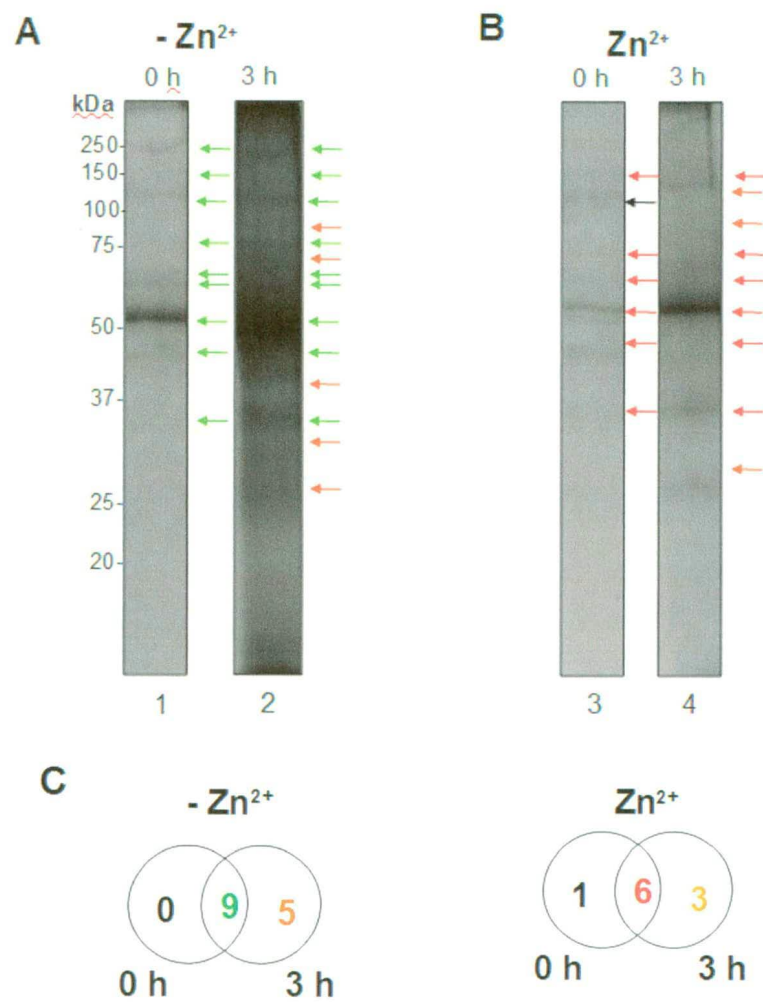
Figura 3. Perfil de actividad proteolítica de proteínas de secreción de *T. vaginalis* aislado HGMN01 en ausencia ($-\text{Zn}^{2+}$, panel A) y presencia de zinc (Zn^{2+} , B) en medio DMEM:TYM 2:1. Zimograma SDS-PAGE 10 % copolimerizado con gelatina 9%, teñidos con azul de Coomassie. Las flechas representan las proteínas secretadas como se indica en resultados. Diagramas de Venn (C) para distinguir el número de bandas comunes y diferenciales en cada condición de acuerdo al tiempo (D). Marcador de peso molecular de amplio rango en kilodaltones (kDa).



Obtención de proteínas de secreción de *T. vaginalis* en interacción con células DU 145 en presencia y ausencia de Zn^{2+}

Las proteínas de secreción concentradas y precipitadas con TCA se visualizaron con mayor intensidad en la condición con zinc, tanto para aquellas secretadas únicamente por los parásitos como para aquellas secretadas en la interacción con células prostáticas.

Figura 4. Perfil total de proteínas de secreción de *T. vaginalis* aislado HGMN01 en interacción con células DU 145 en ausencia (-Zn²⁺, panel A) y presencia de zinc (Zn²⁺, B) en medio DMEM:TYM 2:1. SDS-PAGE 10 % teñidos con CBB mostrando los productos de secreción concentrados y precipitados con TCA 10%. Las flechas representan las proteínas secretadas como se indica en resultados. Diagramas de Venn (C) para distinguir el número de bandas comunes y diferenciales en cada condición y de acuerdo al tiempo (D). Marcador de peso molecular de amplio rango en kilodaltones (kDa).

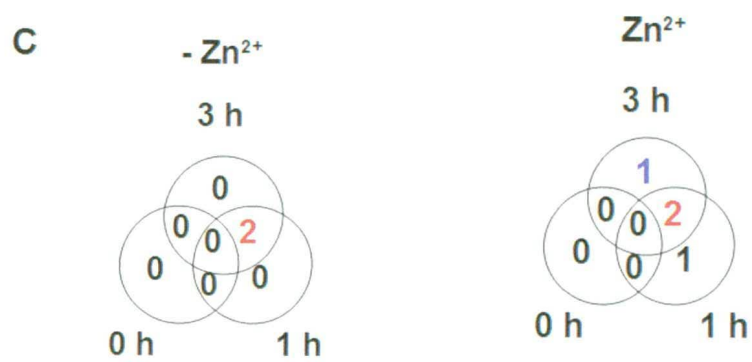
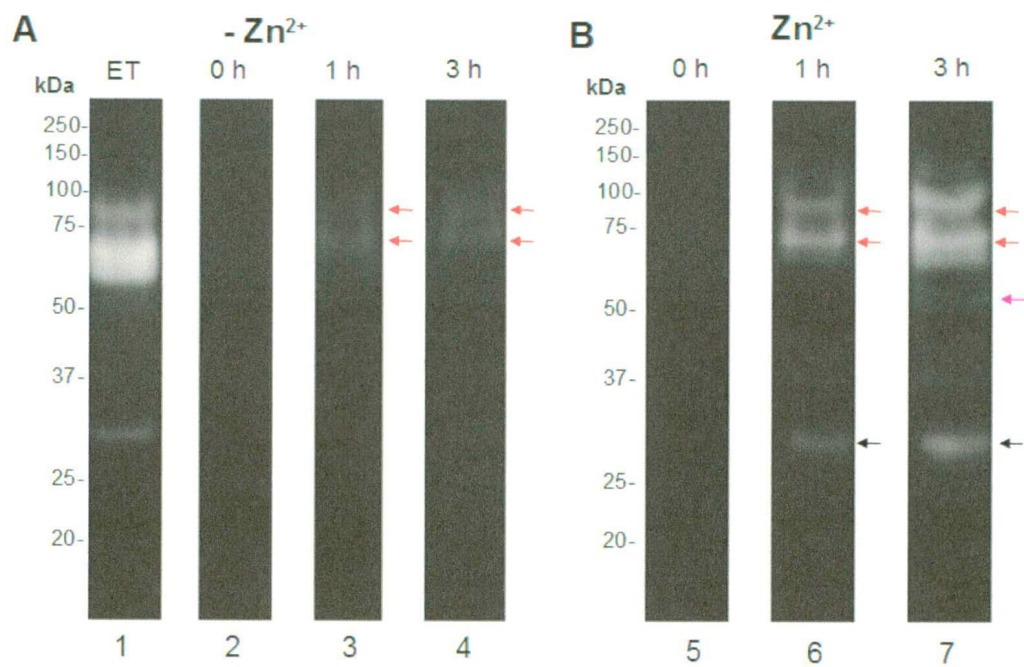


Obtención del perfil proteolítico de secreción de *T. vaginalis* en interacción con células DU 145 en presencia y ausencia de Zn^{2+}

La actividad proteolítica entre las condiciones en ausencia (Fig. 5A) y presencia (Fig. 5B) de zinc se analizó comparativamente, mostrando que la presencia del catión en medio de cultivo y el contacto con células DU 145 permite modular selectivamente la actividad proteolítica de proteinasas en secreciones en *T. vaginalis* HGMN01. Las flechas rojas señalan 2 bandas de actividad proteolítica en el rango de los 75 a 100 kDa en ausencia del catión a 1 h y a 3 h (Fig. 5A carriles 3 y 4). En presencia del Zn^{2+} se observan las mismas dos bandas de actividad (75-100 kDa) además de otra banda de 30 kDa (Fig. 5B, flechas negras, carriles 6 y 7) y otra banda de 50 kDa (Fig. 5B, flecha morada, línea 7). La interacción entre *T. vaginalis* y células DU 145 mostró un perfil de actividad proteolítica diferente al ilustrado en el análisis de actividad proteolítica del parásito, con mayor actividad en las regiones de 65, 37 y 30 kDa (Fig. 5B carril 7), además se observa la aparición de una banda de actividad proteolítica en la región de 50 kDa (flecha morada), que sugiere la activación de la TvMP50, otra proteínas de tipo metalo, identificada en *T. vaginalis*.

Las proteínas secretadas en las dos condiciones aumentan con respecto al tiempo, lo cual es similar a lo observado en las proteinasas secretadas en presencia de Zn^{2+} y durante la interacción con células prostáticas DU 145. Por lo anterior, podemos sugerir que la presencia de este catión modula positivamente la citotoxicidad a células del huésped mediada por proteinasas.

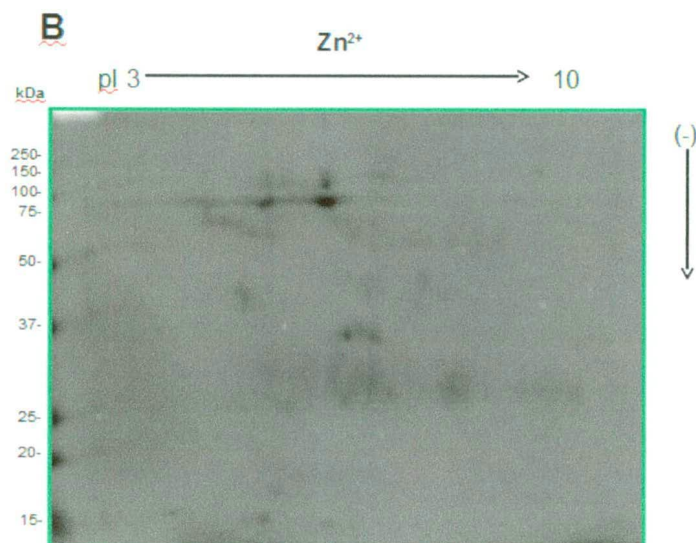
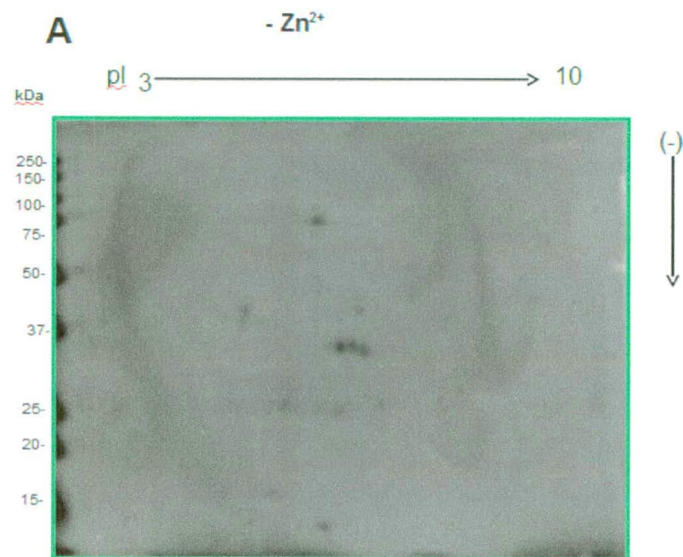
Figura 5. Perfil de actividad proteolítica de proteínas de secreción de *T. vaginalis* aislado HGMN01 en interacción con células DU 145 en ausencia (-Zn²⁺, panel A) y presencia de zinc (Zn²⁺, B) en medio DMEM:TYM 2:1. Zimograma SDS-PAGE 10 % copolimerizado con gelatina 9%, teñidos con CBB mostrando los productos de secreción concentrados. Las flechas representan las proteínas secretadas como se indica en resultados. Diagramas de Venn (C) para distinguir el número de bandas comunes y diferenciales en cada condición y de acuerdo al tiempo (D). kDa. Marcador de peso molecular de amplio rango en kilodaltones (kDa).



Obtención del perfil en 2DE de la secreción de *T. vaginalis* en presencia y ausencia de Zn^{2+}

En los perfiles de 2DE en condiciones normales (Figura 4, panel A) se resolvieron un total de 23 spots, mientras que en presencia del catión (Figura 4, panel B) se distinguen un total de 11 spots, ubicados principalmente en la región entre 100 y 20 kDa. Al hacer el análisis se identificaron 14 spots diferenciales en la condición normal y 2 spots diferenciales en la condición con zinc, refiriéndonos a presencia/ ausencia de los mismos. Esta disminución general en la cantidad de spots definidos apoya la sugerencia de que el zinc modula negativamente la secreción de proteínas de *T. vaginalis* en 3 h de cultivo en presencia del catión.

Figura 6. Perfil de proteínas secretadas de *T. vaginalis* aislado HGMN01 en ausencia (-Zn²⁺, panel A) y presencia de zinc (Zn²⁺ panel B). Electroforesis en dos dimensiones SDS-PAGE 10 % de productos de secreción concentrados y precipitados con TCA. Geles teñidos con azul de Coomassie. Marcador de amplio rango en kilodaltones (kDa).



	Total Spots	Diferenciales
$- \text{Zn}^{2+}$	23	14
Zn^{2+}	11	2

Obtención del perfil en 2DE de la secreción de *T. vaginalis* en interacción con células DU 145 en presencia y ausencia de Zn^{2+}

En los perfiles de 2DE en condiciones normales (Figura 4, panel A) se resolvieron un total de 94 spots, mientras que en presencia del catión (Figura 4, panel B) se distinguen un total de 85 spots, ubicados principalmente en la región entre 100 y 20 kDa. Al hacer el análisis se identificaron 12 spots diferenciales en la condición normal y 4 spots diferenciales en la condición con zinc, refiriéndonos a presencia/ausencia de los mismos. Esta disminución general en la cantidad de spots definidos apoya la sugerencia de que el zinc modula negativamente la secreción de proteínas de *T. vaginalis* en 3 h de cultivo en presencia del catión y en interacción con las células DU 145.

Después de obtener los pesos moleculares y puntos isoeléctricos de las proteínas diferenciales, se eligió como candidato para su identificación por MS un spot con un peso aproximado de 37.1 kDa y un punto isoeléctrico aproximado de 5.2.

La identificación por espectrometría de masas mostró un péptido con la secuencia KILIDEEEEK. El resultado fue analizado con Protein Pilot, utilizando la base de datos de la página UniProt (<http://www.uniprot.org>) con un porcentaje de confianza del 66%. El análisis sugiere relación con una proteína no caracterizada de *T. vaginalis* (2.0%) Refseq provisional XP_001303127.1, con identificador en TrichDB TVAG_312850, cuyos dominios muestran numerosas hélices superenrolladas y homología con proteínas de tipo tricohialinas, responsables por la aglomeración de filamentos en el tejido tegumentario de mamíferos.

Figura 7. Perfil de proteínas secretadas de *T. vaginalis* aislado HGMN01 en ausencia ($-Zn^{2+}$ panel A) y presencia de zinc (Zn^{2+} panel B) incubadas con células prostáticas DU 145. En el recuadro se señala la región de interés, conteniendo la proteína candidata para MS. Electroforesis en dos dimensiones SDS-PAGE 10 % con gelatina a de productos de secreción concentrados precipitados con TCA. Geles teñidos con azul de Coomassie. Marcador de amplio rango en kilodaltones (kDa).

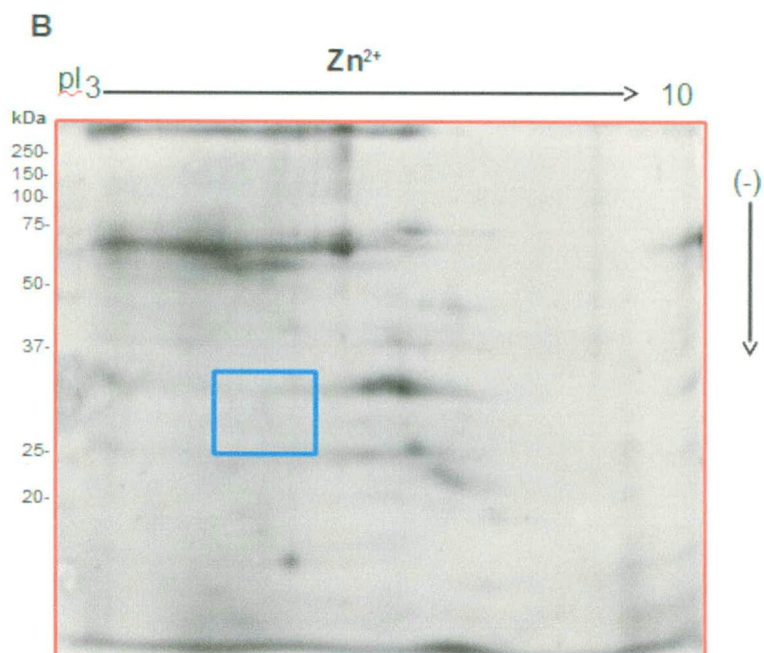
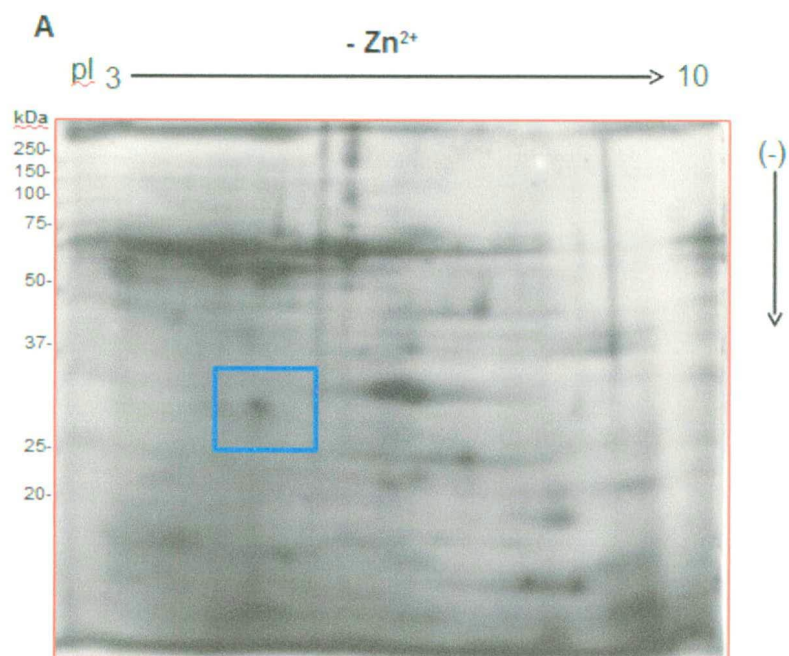
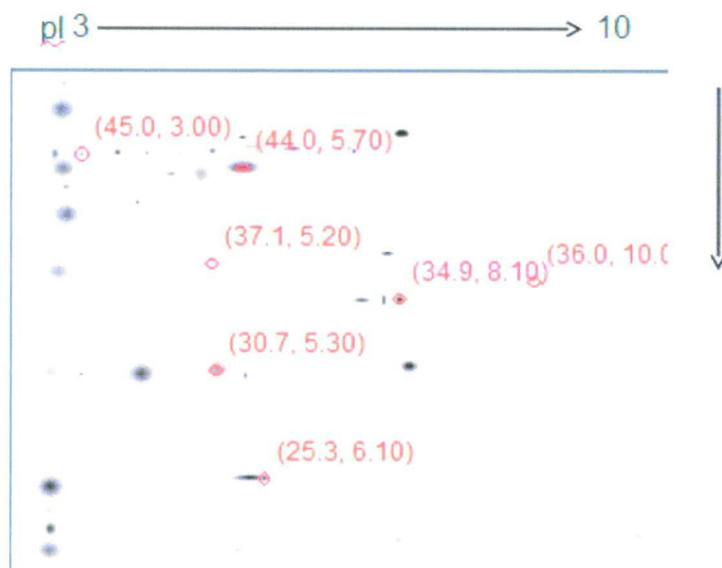


Figura 8. Gel maestro con pesos moleculares aproximados y punto isoelectrico de los principales spots diferenciales del perfil de proteínas secretadas de *T. vaginalis* HGMN01 incubadas con células prostáticas DU 145 en ausencia del catión. Pesos en kilodaltones (kDa)



DISCUSIÓN

La infección por *T. vaginalis* en pacientes masculinos se caracteriza por ser predominantemente asintomática, esto asociado a la presencia de altas concentraciones (>1.6 mM) de Zn^{2+} . En este estudio se observó que la secreción de proteínas del parásito se ve afectada negativamente en presencia del catión, ya sea en cultivo solo o en cocultivo con células prostáticas. Se sabe que algunos mecanismos proinflamatorios promovidos por *T. vaginalis* son contacto dependientes (Kucknoor y cols., 2007), permitiendo sugerir que en condiciones adversas, como la presencia del Zn^{2+} en el medio de cultivo, al parásito le afecta su capacidad para entrar en contacto con las células en interacción y promover la secreción de sus factores de virulencia.

Por otra parte, se observó actividad proteolítica en presencia de Zn^{2+} en las regiones de 30, 39 y 50 kDa que podrían corresponder a las cisteína proteinasas TvCP39, TvCP65 previamente reportadas y a la metaloproteínasa TvMP50 (Quintas-Granados y cols., 2013), las cuales participan en la citotoxicidad del parásito hacia las células huésped (Kusdian y Gould, 2014) como factores de virulencia. Esto correlaciona también con los datos obtenidos previamente (Villegas-Vázquez, 2015), donde el análisis de expresión de transcritos del aislado HGMN01 mostró una regulación positiva en *mp50* y *tvcp39* en presencia del catión en donde se detecta una mayor actividad proteolítica de las proteínas de secreción en presencia de Zn^{2+} , pero éstas no incrementan el efecto citotóxico sobre las células, en concordancia con reportes previos donde se sugiere que el catión afecta negativamente la citotoxicidad del parásito hacia las células prostáticas. Estudios recientes han demostrado que en células HeLa las moléculas de Zn^{2+} citoplasmático libre son reguladas por una red de transportadores y proteínas quelantes, destacando el papel de los lisosomas. Éstos organelos absorben el Zn^{2+} del citoplasma, promoviendo un efecto citoprotector a la exposición extracelular del catión mediante la acidificación y exocitosis lisosómica (Kukic y cols., 2014), por lo cual es posible sugerir que la presencia de una mayor actividad proteolítica en la secreción del parásito es efecto colateral de la salida de lisosomas como respuesta a la presencia de altas concentraciones del catión en el medio, razón por la cual la presencia del catión

no afecta directamente la viabilidad de *T. vaginalis*, como se había reportado previamente (Vázquez-Carrillo y cols., 2010).

Los análisis en doble dimensión permitieron establecer al menos una proteína candidata proveniente de la secreción recuperada de la interacción del parásito con las células prostáticas, cuya identificación por espectrometría de masas indica su probable intervención en el remodelamiento del citoesqueleto del parásito en condiciones óptimas para la invasión de la monocapa celular, es decir, en ausencia de zinc. A pesar de que en células DU 145 y células HeLa no se observa una transformación morfológica completa durante la interacción con el parásito, como ocurre con las células VECs, los reportes indican que a partir de los 90 minutos de contacto con células DU 145 en ausencia del catión es posible distinguir la formación de pseudópodos en el parásito, mientras que en presencia del catión éste adopta una forma redondeada o de “pseudoquiste”, cambios en los que podrían estar involucradas numerosas proteínas estructurales. Proteínas como la α -tubulina y la α -actinina son constitutivas del parásito y están involucradas en el rearreglo del citoesqueleto, asociadas a una redistribución de la α -actinina, normalmente distribuida en el citosol, a una relocalización en la periferia (Fiori y cols., 1999).

En conjunto, nuestros datos proponen que el mecanismo de secreción de moléculas involucradas en la citotoxicidad es afectado tanto por la presencia del zinc como por el contacto con las células prostáticas.

CONCLUSIONES

- La presencia del Zn^{2+} en el medio de cultivo de *T. vaginalis* HGMN01 afecta negativamente la secreción de proteínas, tanto en interacción del parásito con las células prostáticas como en cultivo.
- La presencia de Zn^{2+} en medio de cultivo y el contacto con células DU 145 modula selectivamente la actividad proteolítica de proteinasas en secreciones en *T. vaginalis* HGMN01.
- El contacto de *T. vaginalis* HGMN01 con células DU 145 promueve la secreción de una proteína hipotética en el parásito, Tv_312850, con posible función durante el remodelamiento del citoesqueleto durante la interacción con células prostáticas.

PERSPECTIVAS

- Caracterizar el perfil de las proteinasas de secreción utilizando inhibidores específicos y/o refinar su análisis mediante 2DE.
- Caracterizar la interacción de *T. vaginalis* con un cultivo primario de células epiteliales masculinas y/o prostáticas en presencia y ausencia de Zn^{2+} .
- Determinar los cambios a nivel génico y proteómico que se dan ante la variación de un medio con Zn^{2+} a uno sin el catión y viceversa.
- Determinar los cambios a nivel génico y proteómico que se dan ante la variación de un medio con Fe^{2+} a uno con Zn^{2+} y viceversa.

BIBLIOGRAFÍA

- Alderete J.F., K.W. Millsap, M.W. Lehker y M. Benchimol. (2001). Enzymes on microbial pathogens and *Trichomonas vaginalis*: molecular mimicry and functional diversity, *Cell. Microbiol.* 3:359-370.
- Alderete, J. F. y G. E. Garza. (1984). Soluble *Trichomonas vaginalis* antigens in cell-free culture supernatants. *Mol. Biochem. Parasitol.* 13:147–158.
- Alderete, J. F., D. Provenzano, y M. W. Lehker. (1995). Iron mediates *Trichomonas vaginalis* resistance to complement lysis. *Microbial pathogenesis*, 19(2), 93-103.
- Alderete, J. F., R. Arroyo, D. C. Dailey, J. Engbring, M. A. Khoshnan, y M. W. Lehker. (1992). Molecular analysis of *Trichomonas vaginalis* surface protein repertoires. *Mol. Cell Biol. Hum. Dis. Ser.* 1:173–202.
- Alderete, J.F. y E. Pearlman. (1984) Pathogenic *Trichomonas vaginalis* cytotoxicity to cell culture monolayers. *Br J Vener Dis.* 60(2): p. 99-105.
- Alderete, J.F. y G.E. Garza.(1985). Specific nature of *Trichomonas vaginalis* parasitism of host cell surfaces. *Infect Immun.* 50(3): p. 701-8.
- Alderete, J.F., et al., (1995). Cloning and molecular characterization of two genes encoding adhesion proteins involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Mol Microbiol.* 17(1): p. 69-83.
- Álvarez-Sánchez, M. E., L. Avila-González, C. Becerril-García, L.V. Fattel-Facenda, J. Ortega-López y R. Arroyo. (2000). A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity. *Microbial pathogenesis*, 28(4), 193-202.
- Arroyo, R., A. Gonzalez-Robles, A. Martinez-Palomo y J. F. Alderete. (1993). Signalling of *Trichomonas vaginalis* for amoeboid transformation and adhesion synthesis follows cytoadherence. *Mol. Microbiol.* 7:299–309.
- Arroyo,R., J. Engbring y J.F. Alderete.(1992). Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*, *Mol. Microbiol.* 6: 853-862.
- Bakare, R.A., Ashiru, J.O., Adeyemi-Doro, F.A., Ekweozor, C.C., Oni, A.A., Okesola, A.O. y Adebayo, J.A. (1999). Non-gonococcal urethritis (NGU) due to *Trichomonas vaginalis* in Ibadan. *West Afr J Med* 18: 64–68.

- Bastida-Corcuera F.D., C.Y. Okumura, A. Colocoussi y P.J. Johnson. (2005). *Trichomonas vaginalis* lipophosphoglycan mutants have reduced adherence and cytotoxicity to human ectocervical cells, *Eukaryot. Cell.* 4 1951-1958.
- Bayer-Santos E., Aguilar-Bonavides C., Rodrigues S.P. et al. (2013). Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* secretome: characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins. *J Proteome Res.* 12:883-897.
- Beltran N.C., Horvathova L., Jedelsky P.L., et al. (2013). Iron-induced changes in the proteome of *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes. *PLoS One* ;8:e65148–1.
- Benchimol, M. y W. de Souza.(1995).Carbohydrate involvement in the association of a prokaryotic cell with *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *Parasitol Res.* 81(6): p. 459-64.
- Bennett, J.R., Barnes, W.G. y Coffman, S. (1989). The emergency department diagnosis of *Trichomonas vaginalis*. *Ann Emerg Med* 18: 564–566.
- Brotman R.M., Bradford L.L., Conrad M., et al. (2012).Association between *Trichomonas vaginalis* and vaginal bacterial community composition among reproductive-age women. *Sex Transm Dis* ;39:807–12.
- Bumann D., Aksu S., Wendland M., Janek K., Zimny-Arndt U., Sabarth N. et al. (2002). Proteome analysis of secreted proteins of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* 70:3396–3403.
- Cárdenas-Guerra, R. E., R. Arroyo, I. R. de Andrade, M. Benchimol y J. Ortega-López. (2013). The iron-induced cysteine proteinase TvCP4 plays a key role in *Trichomonas vaginalis* haemolysis. *Microbes and Infection*, 15(13), 958-968.
- Carlton, J. M., R. P. Hirt, Silva, J. C., Delcher, A. L., Schatz, M., Zhao, Q., Wortman et al. (2007) Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science* 315, 207–212.
- Cherpes TL, Wiesenfeld HC, Melan MA, Kant JA, Cosentino LA, et al. (2006) The associations between pelvic inflammatory disease, *Trichomonas vaginalis* infection, and positive herpes simplex virus type 2 serology. *Sex Transm Dis* 33:747–752.
- Choromanski L., B.D.A., Nordin J.H., Pan A.A., and Honigberg B.M. , Further studies on the surface saccharides in *Trichomonas vaginalis* strains by fluorescein-conjugated lectins. *Z. Parasitenkd*, 1985. 71: p. 443-458.

- Conrad M., Z. Zubacova, L. A. Dunn et al., "Microsatellite polymorphism in the sexually transmitted human pathogen *Trichomonas vaginalis* indicates a genetically diverse parasite," *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 175, no. 1, pp. 30–38, 2011.
- Conrad MD, Gorman AW, Schillinger JA, et al. Extensive genetic diversity, unique population structure and evidence of genetic exchange in the sexually transmitted parasite *Trichomonas vaginalis*. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6:e1573–1.
- Cotch MF, Pastorek JG, 2nd, Nugent RP, Hillier SL, Gibbs RS, et al. (1997) *Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery. The Vaginal Infections and Prematurity Study Group. *Sex Transm Dis* 24:353–360.
- Coutts, W.E., E. Silva-Inzunza, and B. Tallman, Genitourinary complications of non-gonococcal urethritis and trichomoniasis in males. *Urol Int*, 1959. 9: p. 189-208.
- de Carli G.A., B.P., Rott M., da Silva A., and Wendorff A. , Hemolytic activity of various strains and clones of *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas suis*. *Rev. Latinoam. Microbiol.*, 1994. 36: p. 207-211.
- De Jesus, J. B., P. Cuervo, M. Junqueira, C. Britto, F. Costa e Silva-Filho, M. J. Soares et al.(2007). A further proteomic study on the effect of iron in the human pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Proteomics*, 7(12), 1961-1972.
- Dias Filho B.P., A.A.F., de Souza W., Esteves M.J., and Angluster J. , Cell surface saccharide differences in drug-susceptible and drug-resistant strains of *Trichomonas vaginalis*. *Microbios*, 1992. 71: p. 55-64.
- Donnè, A., Animacules observés dans le matières purulente set le produit des sécrétions des organes genitaux de l'homme et de la femme. . *Sci Paris*, 1836. 3: p. 385-386.
- El-Shazly, A. M., El-Naggar, H. M., Soliman, M., El-Negeri, M., El-Nemr, H. E., Handousa, A. E., & Morsy, T. A. (2001). A study on Trichomoniasis vaginalis and female infertility. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 31(2), 545-553.
- Fabris, N. y E. Mocchegiani. (1995). Zinc, human diseases and aging. *Aging Clinical and Experimental Research*, 7(2), 77-93.
- Figueroa-Angulo, E. E., F. J. Rendón-Gandarilla, J. Puente-Rivera, J. S. Calla-Choque, R.E. Cárdenas-Guerra et al.(2012). The effects of environmental factors on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. *Microbes and infection*, 14(15), 1411-1427.

- Fiori P.L., P. Rappelli y M.F. Addis. (1999). The flagellated parasite *Trichomonas vaginalis*: new insights into cytopathogenicity mechanisms, *Microbe. Infect.* 1: 149-156.
- Fiori, P.L., P. Rappelli, and M.F. Addis, The flagellated parasite *Trichomonas vaginalis*: new insights into cytopathogenicity mechanisms. *Microbes Infect*, 1999. 1(2): p. 149-56.
- Garber G.E. y L.T. Lemchuk-Favel. (1990). Association of production of cell-detaching factor with the clinical presentation of *Trichomonas vaginalis*, *J. Clin. Microbiol.* 28:2415-2417.
- Garcia-Silva M.R., R.F. Cura das Neves, F. Cabrera-Cabrera, J. Sanguinetti, L.C. Medeiros, C. Robello et al. Extracellular vesicles shed by *Trypanosoma cruzi* are linked to small RNA pathways, life cycle regulation, and susceptibility to infection of mammalian cells. *Parasitol Res.* 2014; 113:285-304.
- Gatski M, Martin DH, Clark RA, et al. Co-occurrence of *Trichomonas vaginalis* and bacterial vaginosis among HIV-positive women. *Sex Transm Dis.* 2010; 38:163–6. [PubMed: 20842073]
- Gil-Bona, A., A. Llama-Palacios, C.M. Parra, F. Vivanco, C. Nombela, L. Monteoliva et al. (2014). Proteomics unravels extracellular vesicles as carriers of classical cytoplasmic proteins in *Candida albicans*. *Journal of proteome research*, 14(1), 142-153.
- Gillin, F. D. y A. Sher. (1981). Activation of the alternative complement pathway by *Trichomonas vaginalis*. *Infect. Immun.* 34:268–273.
- Gould SB, Woehle C, Kusdian G, et al. Deep sequencing of *Trichomonas vaginalis* during the early infection of vaginal epithelial cells and amoeboid transition. *Int J Parasitol* 2013;43:707–19.
- Gould SB, Woehle C, Kusdian G, et al. Deep sequencing of *Trichomonas vaginalis* during the early infection of vaginal epithelial cells and amoeboid transition. *Int J Parasitol* 2013;43:707–19.[15]
- Gram, I., M. Macaluso, J. Churchill, y H. Stalsberg .(1992). *Trichomonas vaginalis* (TV) and human papillomavirus (HPV) infection and the incidence of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) grade III. *Cancer Causes Control* 3:231–236.
- Grodstein, F., M. B. Goldman y D. W. Cramer. (1993). Relation of tubal infertility to a history of sexually transmitted diseases. *Am. J. Epidemiol.* 137:577–584.

- Heath, J.P., Behaviour and pathogenicity of *Trichomonas vaginalis* in epithelial cells. Br. J. Vener. Dis., 1981. 57: p. 106-117.
- Heine, P., y J. A. McGregor. (1993). *Trichomonas vaginalis*: a reemerging pathogen. Clin. Obstet. Gynecol. 36:137–144.
- Hernández-Gutiérrez, R., L. Ávila-González, J. Ortega-López, F. Cruz-Talonia, G. Gómez-Gutiérrez y R. Arroyo. (2004). *Trichomonas vaginalis*: characterization of a 39-kDa cysteine proteinase found in patient vaginal secretions. Experimental parasitology, 107(3), 125-135.
- Hernández-Romano, P., HERNÁNDEZ, R., ARROYO, R., ALDERETE, J.F. y LÓPEZ-VILLASEÑOR, I. (2010) 'Identification and characterization of a surface-associated, subtilisin-like serine protease in *Trichomonas vaginalis*', Parasitology, 137(11), pp. 1621–1635.
- Honigberg B.M., B.G., *Trichomonads parasitic in humans. Structure.* Ed Springer-verlag, 1990: p. 5-35.
- Honigberg B.M., K.V.M., Structure of *Trichomonas vaginalis* Donné. J.Parasitol., 1964. 50: p. 345-364.
- Horváthová L, Šafariková L, Basler M, et al. Transcriptomic identification of iron-regulated and iron-independent gene copies within the heavily duplicated *Trichomonas vaginalis* genome. Genome Biol Evol 2012;4:1017–29.
- Houge, The effect of *Trichomonas vaginalis* on tissue-culture cells. Am. J. Hyg. 37: p. 142-152 1943
- Huang KY, Chen YY, Fang YK, et al. Adaptive responses to glucose restriction enhance cell survival, antioxidant capability, and autophagy of the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. Biochim Biophys Acta 2014;1840:53–64.
- Huang KY, Huang PJ, Ku FM, et al. Comparative transcriptomic and proteomic analyses of *Trichomonas vaginalis* following adherence to fibronectin. Infect Immun 2012;80: 3900–11.
- Huang, K. Y., K.Y. Chien, Y.C. Lin, W.M. Hsu, I.K Fong, P.J. Huang et al. (2009). A proteome reference map of *Trichomonas vaginalis*. Parasitology research, 104(4), 927-933.
- J.F. Alderete, E. Newton, C. Dennis, K.A. Neale. Genitourin Med. 67: 331–334

- J.G. Rendon-Maldonado, M. Espinosa-Cantellano, A. Gonzalez-Robles, A. Martinez-Palomo, *Trichomonas vaginalis*: in vitro phagocytosis of lactobacilli, vaginal epithelial cells, leukocytes, and erythrocytes, *Exp. Parasitol.* 89 (1998) 241e250.
- Kang, J. H., H.O. Song, J. S. Ryu, M.H. Shin, J.M. Kim, Y.S. Cho et al. (2006). *Trichomonas vaginalis* promotes apoptosis of human neutrophils by activating caspase-3 and reducing Mcl-1 expression. *Parasite immunology*, 28(9), 439-446.
- Krieger, J.N. y M.F. Rein .(1982). Zinc sensitivity of *Trichomonas vaginalis*: in vitro studies and clinical implications, *J. Infect. Dis.* 146 341-345.
- Krieger, J.N., et al., Prokaryotic DNA sequences in patients with chronic idiopathic prostatitis. *J Clin Microbiol*, 1996. 34(12): p. 3120-8.
- Krieger, J.N., Trichomoniasis in men: old issues and new data. *Sex Transm Dis*, 1995. 22(2): p. 83-96.
- Kucknoor, A. S., V. Mundodi, y J. F. Alderete. (2007). The proteins secreted by *Trichomonas vaginalis* and vaginal epithelial cell response to secreted and episomally expressed AP65. *Cellular microbiology*, 9(11), 2586-2597.
- Kummer, S., G.R. Hayes, R.O. Gilbert, D.H. Beach, J.J. Lucas y B.N. Singh. (2008). Induction of human host cell apoptosis by *Trichomonas vaginalis* cysteine proteases is modulated by parasite exposure to iron, *Microb. Pathog.* 44: 197-203.
- Kusdian G and Gould SB (2014) The biology of *Trichomonas vaginalis* in the light of urogenital tract infection. *Mol Biochem Parasitol* 198: 92–99
- Laga, M., A. Manoka, M. Kivuvu, B. Malele, M. Tuliza, N. Nzila, J. B. Goeman, F. V. Batter, M. Alary, et al. (1993). Non-ulcerative sexually transmitted diseases as risk factors for HIV-1 transmission in women: results from a cohort study. *AIDS* 7:95–102.
- Lama A., A. Kucknoor, V. Mundodi y J.F. Alderete. (2009). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a surface-associated, fibronectin-binding protein of *Trichomonas vaginalis*. *Infect. Immun.* 77:2703-2711.
- Lehker, M. W. y D. Sweeney. (1999). Trichomonad invasion of the mucous layer requires adhesins, mucinases, and motility. *Sexually transmitted infections*, 75(4), 231-238.
- Lehker, M. W., R. Arroyo y J. F. Alderete. (1991). The regulation by iron of the synthesis of adhesins and cytoadherence levels in the protozoan *Trichomonas*

vaginalis. The Journal of Experimental Medicine, 174(2) 311-318.

- Lehker, M.W. y J.F. Alderete. (2000). Biology of trichomonosis. Curr. Opin. Infect. Dis. 13: 37-45.
- Lindmark D.G., E.B.L., Halberg L.A., and Dinbergs I.D., Carbohydrate, energy and hydrogenosomal metabolism of *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. J. Protozool, 1989. 36: p. 214-216.
- Lubick y D.E. Burgess. (2004). Purification and analysis of a phospholipase A2-like lytic factor of *Trichomonas vaginalis*, Infect. Immun. 72:1284-1290.
- M. Benchimol, I. de Andrade Rosa, R. da Silva Fontes, A.J. Burla Dias, *Trichomonas* adhere and phagocytose sperm cells: adhesion seems to be a prominent stage during interaction, Parasitol. Res. 102 (2008) 597e604.
- M.W. Lehker, J.F. Alderete, Biology of trichomonosis, Curr. Opin. Infect. Dis. 13 (2000) 37e45.
- Martinez-Garcia, F., et al., Protozoan infections in the male genital tract. J Urol, 1996. 156(2 Pt 1): p. 340-9.
- Mavedzenge SN, Pol BV, Cheng H, et al. Epidemiological synergy of *Trichomonas vaginalis* and HIV in Zimbabwean and South African women. Sex Transm Dis. 2010; 37:460–6. [PubMed:
- McClelland, R.S., et al., Infection with *Trichomonas vaginalis* increases the risk of HIV-1 acquisition. J Infect Dis, 2007. 195(5): p. 698-702.
- Medina M.L., P.A. Haynes, L. Breci y W.A. Francisco. (2005). Analysis of secreted proteins from *Aspergillus flavus*. Proteomics 5:3153–3161.
- Mendoza-López, M. R., C. Becerril-Garcia, L. V. Fattel-Facenda, L. Avila-Gonzalez, M.E. Ruíz-Tachiquín, J. Ortega-Lopez y R. Arroyo. (2000). CP30, a Cysteine Proteinase Involved in *Trichomonas vaginalis* Cytoadherence. Infection and Immunity, 68(9), 4907-4912.
- Minkoff, H., A. N. Grunebaum, R. H. Schwarz, J. Feldman, M. C. Cummings, W. L. Clark, G. Pringle y W. M. McCormack (1984) Risk factors for prematurity and premature rupture of membranes: a prospective study of the vaginal flora in pregnancy. Am. J. Obstet. Gynecol. 150:965–972.
- Moreno-Brito, V., C. Yanez-Gomez, P. Meza-Cervantez, L. Ávila-Gonzalez, M.A. Rodriguez, J. Ortega-López, A. Gonzalez-Robles, R. Arroyo (2005) A

Trichomonas vaginalis 120 kDa protein with identity to hydrogenosome pyruvate:ferredoxin oxidoreductase is a surface adhesin induced by iron, *Cell. Microbiol.* 7:245-258.

- Morrison, H. G., McArthur, A. G., Gillin, F. D., Aley, S. B., Adam, R. D., Olsen, G. J. & Davids, B. J. (2007). Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science*, 317(5846), 1921-1926.
- Muller, M., The hydrogenosome. *J Gen Microbiol*, 1993. 139(12): p. 2879-89.
- Mundodi V., A.S. Kucknoor y J.F. Alderete. (2008). Immunogenic and plasminogen-binding surface-associated alpha-enolase of *Trichomonas vaginalis*, *Infect. Immun.* 76:523-531.
- Neale, K.A., and Alderete, J.F., 1990, Analysis of the proteinases of representative *Trichomonas vaginalis* isolates, *Infect. Immun.* 58:157-162
- Okumura, C.Y., L.G. Baum, and P.J. Johnson, Galectin-1 on cervical epithelial cells is a receptor for the sexually transmitted human parasite *Trichomonas vaginalis*. *Cell Microbiol*, 2008. 10(10): p. 2078-90.
- Paget TA, Lloyd D. *Trichomonas vaginalis* requires traces of oxygen and high concentrations of carbon dioxide for optimal growth. *Mol Biochem Parasitol* 1990;41:65–72.
- Pereira-Neves, A. and M. Benchimol, Phagocytosis by *Trichomonas vaginalis*: new insights. *Biol Cell*, 2007. 99(2): p. 87-101.
- Peterson, K. M. y J. F. Alderete. (1982). Host plasma proteins on the surface of pathogenic *Trichomonas vaginalis*. *Infect. Immun.* 37:755–762.
- Petrin, D., K. Delgaty, R. Bhatt, y G. Garber. (1998). Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clin. Microbiol.* 11:2, 300–317.
- Pope, S.M. y C. Laßser (2013). *Toxoplasma gondii* infection of fibroblasts causes the production of exosome-like vesicles containing a unique array of mRNA and miRNA transcripts compared to serum starvation. *J Extracell Vesicles.* 2:22484.
- Provenzano, D. y J. F. Alderete. (1995). Analysis of human immunoglobulin-degrading cysteine proteinases of *Trichomonas vaginalis*. *Infection and immunity*, 63(9), 3388-3395.
- Quintas –Granados L.I. Villalpando, J.I, Vazquez Carrillo L.I ., Arroyo,R ., Mendoza-Hernandez, G, y Alvarez-Sanchez (2013) TvMP50 is an immunogenic

metalloproteinase during male trichomoniasis. *Molecular y Cellular Proteomics*, 12(7), 1953-1964.

- Quintas-Granados LI, Villalpando JL, Vázquez-Carrillo LI, Arroyo R, Mendoza-Hernández G, Álvarez-Sánchez ME. TvMP50 is an Immunogenic Metalloproteinase during Male Trichomoniasis. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*. 2013;12(7):1953-1964. doi:10.1074/mcp.M112.022012.
- Rendón-Maldonado, J. G., Espinosa-Cantellano, M., González-Robles, A., & Martínez-Palomo, A. (1998). *Trichomonas vaginalis*: In Vitro Phagocytosis of Lactobacilli, Vaginal Epithelial Cells, Leukocytes, and Erythrocytes. *Experimental parasitology*, 89(2), 241-250.
- Ryu, J. S., J.H. Kang, S.Y. Jung, M.H. Shin, J. M. Kim, H. Park y D. Y. Min. (2004). Production of interleukin-8 by human neutrophils stimulated with *Trichomonas vaginalis*. *Infection and immunity*, 72(3), 1326-1332.
- Schwebke, J. y D. Burgess. (2004). Trichomoniasis. *Clin. Microbiol.* 794-803.
- Shaio M.F. y P.R. Lin. (1995). Leucotriene B4 levels in the vaginal discharges from cases of trichomoniasis. *Ann Trop Med Parasitol* 1995; 89:85–88.
- Shaio M.F., P.R. Lin, J.Y. Liu y K.D. Tang. (1994). Monocyte-derived interleukin-8 involved in the recruitment of neutrophils induced by *Trichomonas vaginalis* infection. *J Infect Dis*, 170:1638–1640.
- Shaio M.F., P.R. Lin, J.Y. Liu y K.D. Yang. (1995). Generation of interleukin-8 from human monocytes in response to *Trichomonas vaginalis* stimulation. *Infect Immun*; 63:3864–3870.
- Silverman J. M., J. Clos, C.C de'Oliveira, O. Shirvani , Y. Fang, C. Wang et al. (2010). An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages. *J Cell Sci.* 123:842-52.
- Singh, B.N., Lipophosphoglycan-like glycoconjugate of *Trichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol*, 1993. 57(2): p. 281-94.
- Stark JR, Judson G, Alderete JF, Mundodi V, Kucknoor AS, et al. (2009) Prospective study of *Trichomonas vaginalis* infection and prostate cancer incidence and mortality: Physicians' Health Study. *J Natl Cancer Inst* 101:1406–1411.
- Sutcliffe, S., E. Giovannucci, J. F. Alderete , T. H. Chang, C. A. Gaydos, J. M. Zenilman, A.M. De Marzo y E. A. Platz . (2006). Plasma antibodies against *Trichomonas vaginalis* and subsequent risk of prostate cancer. *Cancer*

Epidemiology Biomarkers & Prevention, 15(5), 939-945.

- Trost M., D. Wehmhoner, U. Karst, G. Dieterich, J. Wehland y L. Jansch.(2005). Comparative proteome analysis of secretory proteins from pathogenic and nonpathogenic *Listeria* species. *Proteomics* 5:1544–1557.
- Tuttle J. P., T. W. Holbrook y F. C. Derrick. (1977). Interference of human spermatozoal motility by *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Urology* 118(6) 1024-1025.
- Twu, O., N. de Miguel, G. Lustig, G. C.Stevens, A.A. Vashisht, , J. A. Wohlschlegel y P. J. Johnson. (2013). *Trichomonas vaginalis* exosomes deliver cargo to host cells and mediate host: parasite interactions. *PLoS Pathog*, 9(7), e1003482.
- V. Midlej, M. Benchimol, *Trichomonas vaginalis* kills and eats evidence for phagocytic activity as a cytopathic effect, *Parasitology* 137 (2010) 65e76
- Van Der Pol, B., et al., Prevalence, incidence, natural history, and response to treatment of *Trichomonas vaginalis* infection among adolescent women. *J Infect Dis*, 2005. 192(12): p. 2039-44.
- Vazquez-Carrillo, L.I., L.I. Quintas-Granados, R. Arroyo, G. Mendoza Hernández, A. González-Robles, B.I. Carvajal-Gamez y M.E. Alvarez-Sánchez. (2011). The effect of Zn²⁺ on prostatic cell cytotoxicity caused by *Trichomonas vaginalis*, *JIOMICs* 1:198-210.
- Vazquez-Carrillo, L.I., L.I. Quintas-Granados, R. Arroyo, G. Mendoza Hernández, A. González-Robles, B.I. Carvajal-Gamez y M.E. Alvarez-Sánchez. (2011). The effect of Zn²⁺ on prostatic cell cytotoxicity caused by *Trichomonas vaginalis*, *JIOMICs* 1:198-210.
- Wampfler P.B., V. Tosevski, P. Nanni, C. Spycher y A.B. Hehl. (2014). Proteomics of secretory and endocytic organelles in *Giardia lamblia*. *PLoS One*. 9:e94089.
- Warton, A. y B. M. Honigberg. (1980). Lectin analysis of surface saccharides in two *Trichomonas vaginalis* strains differing in pathogenicity. *J. Protozool.* 27:410–419.
- Wei-Chen Lin & Kuo-Yang Huang & Shih-Chieh Chen & Ting-Yun Huang & Shu-Jen Chen & Po-Jung Huang & Petrus Tang. Malate dehydrogenase is negatively regulated by miR-1 in *Trichomonas vaginalis*. *Parasitol Res* (2009) 105:1683–1689

- Weston, T.E. and C.S. Nicol, Natural History of Trichomonal Infection in Males. Br J Vener Dis, 1963. 39: p. 251-7.
- Wisdom, A. R. y E. M. C. Dunlop. (1965). Trichomoniasis: study of the disease and its treatment in women and men. Br. J. Vener. Dis. 41:90–96.
- Woehle C, Kusdian G, Radine C, Graur D, Landan G, Gould SB. The parasite *Trichomonas vaginalis* expresses thousands of pseudogenes and long non-codingRNAs independently from functional neighbouring genes. BMC Genomics2014;15:906.
- Wolner-Hanssen P, Krieger JN, Stevens CE, Kiviat NB, Koutsky L. 1989. Clinical manifestations of vaginal trichomoniasis. JAMA 261: 571–576.
- World Health Organization, 2012
- Yáñez-Mó, M., P. R. M. Siljander, Z. Andreu, A.B. Zavec, F.E. Borràs, E. I. Buzas et al. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. Journal of extracellular vesicles, 4.

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 31 de enero del 2017, en la Ciudad de México para optar al Grado de Maestra en Ciencias Genómicas, a la Biól. Mara Jaqueline Ramos Millán

Dra. María Elizbeth Álvarez Sánchez

Dr. Mauricio Castañón Arreola

Dra. Minerva Camacho Nuez

M. en C. Miguel Ángel del Moral Stevenel



Maria Magdalena Aguilar Rosas

**República de Cuba 99 Desp. 28 segundo piso
Centro Histórico México, D.F.**

Celular. 55 2567-7192
magdav08@gmail.com



**Magdav
Impresos**