

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE
INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

**“La Triosafosfato isomerasa de *Trichomonas vaginalis*
(TvTIM) se localiza en diferentes vesículas de secreción
inducidas por glucosa e interaccionan con la célula
hospedera”**

TESIS

Que presenta

QFB. SARAHÍ RODRÍGUEZ CRUZ

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN

INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

Directora de la Tesis

DRA. ROSSANA ARROYO VERÁSTEGUI

Ciudad de México

Agosto, 2018

Asesoras de tesis:

Dra. Bibiana Chávez Munguía

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, CINVESTAV-
IPN

Dra. Patricia Talamás Rohana

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, CINVESTAV-
IPN

Este trabajo de investigación se realizó en el laboratorio No. 11 del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) bajo la dirección de la Dra. Rossana Arroyo Verástegui. El trabajo fue posible gracias al apoyo financiero parcial del donativo 237937 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (a R.A.V.) y por la beca No. 610119 (a S.R.C.). También por el financiamiento parcial del Premio Guinea-Ecuatorial 2012 (a R.A.V.)

“When somebody tells me I can’t do something that’s when I do it!”

Gertrude Eder

A Julia, Sara y Ramona, por su amor y confianza incondicional, ustedes siempre supieron que lo lograría a pesar de todo; hasta donde estén mi infinito amor.

A mi familia, por enseñarme que con esfuerzo y dedicación puedo lograr lo que me proponga.

Al M.C. Daniel Barojas Rendón, por creer en mi e impulsarme a llegar cada vez más lejos y siempre estar ahí para mi.

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por permitirme llegar a este punto, por enseñarme que todo tiene su tiempo, su lugar, y un motivo para ocurrir.

A la **Dra. Rossana Arroyo Verástegui** por contestar mi correo hace tres años y recibirme en su laboratorio; gracias por el apoyo, la guía y paciencia durante el desarrollo de este proyecto.

A la **Dra. Bibiana Chávez Munguía** por su apoyo para las microscopías electrónicas y consejos para la realización de este trabajo; a la **Dra. Patricia Talamás Rohana** por sus observaciones y consejos para mejorar el proyecto.

Al **Q.B.P. Carlos Vásquez Calzada** por su ayuda con la microscopía confocal y a la **Biol. Lizbeth Salazar Villatoro** por su apoyo con las microscopías electrónicas.

Gracias a todo el equipo que conformamos el laboratorio 11, muy especialmente a la **QFB. Leticia Ávila González** por su ayuda y asesoramiento en el trabajo, al señor **Víctor Pinales** por su apoyo técnico; al **Dr. Jesús FT Miranda Ozuna** por sus enseñanzas y consejos para continuar con el trabajo y por su apoyo a las ideas que dieron pie a lograr la conformación de este proyecto. A **Mar e Ino** por su amistad, compañerismo y hacer más ameno el trabajo y el día a día.

Gracias a mis padres, **Salvador y Sarahí**, por todo su amor, apoyo y soportarme durante este tiempo. A mi hermano, **Chava**, por tu paciencia, ánimo y sentido del humor, por calmarme y cuidarme.

A las increíbles personas que no esperé conocer pero que afortunadamente la vida puso en mi camino: **David, Eve y Dino**, gracias por todo, los buenos y malos momentos, las interminables risas y comidas que hemos compartido, por convertirse en mi nueva familia y acompañarnos en esta travesía, no lo hubiera logrado sin ustedes.

A **Claudia** por las tardes de pláticas y café, a **Eugenia Leticia** por los ánimos y su buena vibra para que salieran los experimentos y distraerme cuando era necesario. A mis compañeros de generación, por su ayuda, soporte y todos los momentos que compartimos y afrontamos juntos.

A mis amigos: **Andrea, Gaby, Ángela, Valeria y Simbron** que desde Orizaba me brindan su afecto y palabras de ánimo; a **Montserrat**, gracias a ti por tus ánimos, regaños y por mostrarme que tenía las aptitudes para llegar a este punto; a **Niño** por compartir conmigo aún a la distancia las vivencias y sinsabores de la ciencia.

A los **Rodríguez Colorado** y sus derivados, por su apoyo, ánimo y palabras de aliento, además de alegrar mis días.

Índice

ABSTRACT.....	1
RESUMEN.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 Tricomoniasis.....	5
1.2 Epidemiología de la tricomonosis.....	5
1.3 Sintomatología de la tricomoniasis.....	6
1.4 Diagnóstico.....	6
1.5 Tratamiento.....	7
1.6 <i>Trichomonas vaginalis</i>	7
1.7 Ciclo biológico de <i>T. vaginalis</i>	8
1.8 Factores ambientales y <i>T. vaginalis</i>	9
1.9 Proteínas “moonlighting”.....	10
1.10 Triosafosfato isomerasa.....	11
1.11 Vesículas extracelulares (VEs).....	12
2. ANTECEDENTES DIRECTOS.....	14
3. JUSTIFICACIÓN.....	17
4. HIPÓTESIS.....	17
5. OBJETIVOS.....	18
General.....	18
Específicos.....	18
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	19

6.1 Objetivo 1. Identificar a TvTIM en secreciones del parásito cultivado en distintas condiciones ambientales (glucosa y hierro).	20
6.2 Objetivo 2. Identificar los tipos de secreción vesicular presentes en el parásito.	20
6.3 Objetivo 3. Analizar la interacción de TvTIM con las células huésped y su localización dentro de éstas.	21
6.4 Objetivo 4. Obtener vesículas extracelulares de <i>T. vaginalis</i> , localizar a TvTIM e interaccionarlas con células hospederas.....	21
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
7.1 Cultivo de parásitos.....	22
7.2 Cultivo de células HeLa.....	22
7.3 Extracción de proteínas totales	22
7.4 Ensayos de secreción	23
7.5 Electrotransferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa.....	23
7.6 Western Blot.....	23
7.7 Microscopía electrónica de barrido.....	24
7.8 Inmunofluorescencia indirecta (IFI) de parásitos.....	24
7.9 Ensayos de interacción célula HeLa-parásitos.....	25
7.10 IFI de las interacciones de células HeLa-parásitos	25
7.11 Obtención de vesículas extracelulares.....	26
7.12 Detección de la TvTIM en vesículas extracelulares de <i>T. vaginalis</i> ..	26
7.13 IFI de las vesículas extracelulares de <i>T. vaginalis</i>	27
7.14 Microscopía electrónica de transmisión de vesículas extracelulares	27
7.15 Inmunomarcaje con oro coloidal.....	28

7.16 Interacción de células HeLa-Vesículas extracelulares de <i>T. vaginalis</i>	29
7.17 Ensayo de viabilidad de células HeLa	29
7.18 Análisis estadístico	30
8. RESULTADOS.....	31
8.1 Detección de la proteína TvTIM en secreciones de parásitos cultivados en distintas condiciones ambientales	31
8.2 Identificación de los tipos de secreción vesicular para la TvTIM en <i>T. vaginalis</i>	37
8.3 Interacción de <i>T. vaginalis</i> con células HeLa en RG y AG.	47
8.4 Obtención de vesículas secretadas por <i>T. vaginalis</i>	58
8.5 Detección de TvTIM en las vesículas secretadas por <i>T. vaginalis</i> en RG y AG.	65
8.6 Interacción de las vesículas con células HeLa	70
8.7 Efecto de las vesículas al interaccionar las células HeLa	74
9. DISCUSIÓN	78
10. CONCLUSIONES	85
11. PERSPECTIVAS	86
12. REFERENCIAS	87

Índice de figuras

Fig. 1	Morfología de <i>T. vaginalis</i>	8
Fig. 2	Ciclo biológico de <i>T. vaginalis</i>	9
Fig. 3	Estructura cristalográfica de las TvTIMs	12
Fig. 4	La glucosa promueve la localización de la TvTIM a la superficie de <i>T. vaginalis</i>	14
Fig. 5	Presencia de la TvTIM en secreciones vaginales de pacientes con tricomonosis	15
Fig. 6	Presencia de la TvTIM en células epiteliales vaginales de pacientes con tricomonosis	16
Fig. 7	Efecto de la glucosa en la secreción <i>in vitro</i> de las proteínas TvTIM de <i>T. vaginalis</i>	33
Fig. 8	Efecto del hierro en la secreción <i>in vitro</i> de TvTIM de <i>T. vaginalis</i>	35
Fig. 9	Microscopía electrónica de barrido (MEB) de <i>T. vaginalis</i> cultivada en RG y AG	40
Fig. 10	Localización de la proteína TvTIM en <i>T. vaginalis</i>	43
Fig. 11	Presencia de la TvTIM en la superficie y en vesículas de parásitos cultivados en AG	45
Fig. 12	Micrografías de MEB de las interacciones de <i>T. vaginalis</i> con células HeLa en diferentes concentraciones de glucosa (RG y AG)	50
Fig. 13	Efecto de la glucosa en la localización de TvTIM durante la interacción de parásitos con células HeLa	53
Fig. 14	Tipos de vesículas secretadas por <i>T. vaginalis</i> en RG y AG	60
Fig. 15	Localización de la TvTIM en distintos tipos de vesículas en AG	67
Fig. 16	Detección de TvTIM después de la interacción entre vesículas extracelulares de parásitos cultivados en AG y monocapas de células HeLa	71
Fig. 17	Efecto de la interacción entre vesículas y células HeLa	75

Índice de tablas

	Página
Tabla 1 Localización de la proteína TvTIM en células HeLa después de la interacción con parásitos en RG o AG	57
Tabla 2 Tipos de vesículas secretadas por <i>T. vaginalis</i> cultivado en AG y RG	63

Glosario de abreviaturas

Afe	Alto hierro
AG	Alta glucosa
ATP	Adenosín trifosfato
Bfe	Bajo hierro
CBB	Azul Brillante de Coomasie
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DIL	Colorante catiónico-lipofílico absorbente
DMEM	Medio de cultivo "Eagle" modificado por Dulbecco
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
IFI	Microscopía de inmunofluorescencia indirecta
ITS	Infección de Transmisión sexual
kDa	Kilodaltones
MEB	Microscopía electrónica de barrido
MET	Microscopía electrónica de transmisión
mM	Milimolar
nm	Nanometro
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Amortiguador de fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PS	Proteínas de secreción
PT	Proteínas totales
RG	Restricción de Glucosa
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Ensayo de retrotranscripción y PCR
SBA	Suero bovino adulto
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
SNR	Suero preinmune
TA	Temperatura ambiente
TCA	Ácido tricloroacético

TvCP4	Cisteína proteasa tipo4 de <i>T. vaginalis</i>
TvTIM	Triosafofato isomerasa de <i>T. vaginalis</i>
<i>tvtim</i>	Gen que codifica para la proteína TvTIM
TY	Triptona-Extracto de levadura
TYM	Triptona-Extracto de levadura-Maltosa
VEC	Células epiteliales vaginales
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
VEs	Vesículas extracelulares
WB	Western Blot
α-EhHK	Anticuerpo contra la hexoquinasa de <i>Entamoeba histolytica</i>
α-TvCP4	Anticuerpo contra la proteína recombinante TvCP4
α-TvTIM	Anticuerpo contra la proteína recombinante TvTIM2
μM	Micromolar
μm	Micrómetro

ABSTRACT

The triosephosphate isomerase (TvTIM) is one of the glycolytic enzymes of *T. vaginalis* that under standard *in vitro* culture (25 mM glucose and 20 μ M iron) is located in the *Trichomonas vaginalis* cytoplasm. However, under high glucose (50 mM) condition TvTIM is relocated to the plasmatic membrane of *T. vaginalis* where it acquires a new function as a binding protein to laminin and fibronectin. Also, on vaginal epithelial cells of trichomoniasis patients the parasite TvTIM was found on the cellular membrane, and in its cytoplasm and nucleus. Therefore, the objective of this work was to determine whether the protein is secreted in extracellular vesicles (EV) induced by different environmental conditions, and to identify the *in vitro* conditions that may help to reproduce the *in vivo* localization of TvTIM using HeLa cells and trichomonads grown under different culture conditions. Our results show by Western blot assays the presence of TvTIM in *in vitro* secretion products only under high glucose (HG) conditions. Extracellular vesicles (EV) with sizes between 100 nm to 5 μ m, were observed by scanning electron microscopy (SEM) on the surface of parasites grown under AG and glucose restriction (GR) conditions. Atypically, EVs were localized on flagella, axostile, and undulating membrane. Indirect immunofluorescence assays (IFA) showed that some of the EVs carried the TvTIM as a cargo. The interaction of trichomonads grown under HG and GR conditions with HeLa cells for 45 min, EV formation was detected by SEM, while by IFA the presence of TvTIM inside HeLa cells was also observed. Thus, we found the appropriated conditions to reproduce the *in vivo* observations. The secreted EVs from parasites grown under HG and GR conditions purified and analyzed by IFA, showed the presence of TvTIM within some of these EVs and was confirmed by immuno-gold labeling and transmission electron microscopy (TEM). IFA of the EVs from HG parasites interacting with HeLa cells showed the presence of TvTIM in the cytoplasm of HeLa cells. During the EVs interaction, a possible cytotoxic effect was detected in the host cells by the Annexin V fluorescent increased signal. In conclusion, it was proved that TvTIM is secreted under HG conditions inside EVs that can

be delivered it into the host cell by direct contact with live parasites or through secreted EVs, reproducing the effect observed in vaginal epithelial cells from trichomoniasis patients. Therefore, with this *in vitro* model, it will be possible to study different molecules that trichomonas secrete and internalize in the host cell, which possibly have a role during the pathogenesis.

RESUMEN

La Triosafosfato isomerasa (TvTIM) es una de las enzimas glicolíticas de *T. vaginalis* que en cultivo *in vitro* estándar (glucosa 25 mM y hierro 20 μ M) se localiza en el citoplasma. Sin embargo, en alta glucosa (50 mM) TvTIM se relocaliza a la membrana plasmática del parásito donde adquiere una nueva función como proteína de unión a laminina y fibronectina. De igual manera, en células vaginales de pacientes con tricomoniasis se localizó a TvTIM de *Trichomonas vaginalis* en membrana, citoplasma y núcleo de las células vaginales. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar si la proteína TvTIM se secreta en vesículas extracelulares inducidas por distintas condiciones ambientales (hierro y glucosa), e identificar las condiciones en las cuales la TvTIM se internaliza en células HeLa utilizadas como modelo en el laboratorio. Por ensayos de Western blot se detectó a la proteína TvTIM en productos de secreción *in vitro* únicamente en condiciones de alta glucosa (AG). Por microscopía electrónica de barrido (MEB) se observaron vesículas extracelulares (VEs) presentes en la membrana plasmática del parásito, además las vesículas presentaron una localización atípica en flagelos, membrana ondulante y axostilo, tanto en condiciones de AG como en restricción de glucosa (RG), las cuales tenían un tamaño de entre 100 nm hasta los 5 μ m. Por ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFI) se comprobó que algunas de estas vesículas llevan como carga a la TvTIM. Posteriormente al interaccionar parásitos vivos en condiciones de AG y RG con células HeLa por 45 min se detectó por MEB la formación de VEs, mientras que por IFI se observó la presencia de la TvTIM en el interior de las células HeLa, reproduciendo así lo observado *in vivo*. Además, se purificaron las vesículas secretadas por el parásito en condiciones de AG y RG, las cuales se analizaron por ensayos de IFI, confirmando la presencia de la TvTIM dentro de algunas de éstas por inmunomarcaje con oro coloidal así como los distintos tipos de vesículas secretadas en ambas condiciones por microscopía electrónica de transmisión (MET). También, por ensayos de IFI se observó que

al interaccionar las vesículas provenientes de parásitos en AG con las células HeLa se detectó a la TvTIM en el interior de las células HeLa, similar a lo observado en las células vaginales provenientes de pacientes con tricomoniasis. Además, las VEs de *T. vaginalis* parecen producir un efecto citotóxico detectado por el incremento en la señal de Annexina V en las células HeLa, posiblemente generado por las vesículas. En conclusión, se comprobó que la TvTIM se secreta por los parásitos crecidos en AG dentro de vesículas extracelulares, las cuales permiten la internalización de la TvTIM de tricomonas en células huésped directamente al contacto con parásitos vivos o con las VEs purificadas, como ocurre durante la infección. Por lo que con este modelo *in vitro* se podrá hacer el seguimiento de distintas moléculas que tricomonas secrete y se internalicen en la célula huésped, las cuales posiblemente tengan una función durante la patogenia.

1. INTRODUCCIÓN

Trichomonas vaginalis es el protozoo responsable de la tricomoniasis, la principal infección de transmisión sexual no viral en el mundo. Se estima que hay ~276 millones de infectados anualmente (OMS, 2011). Sin embargo, se debe tener en consideración que el número real de infectados es mayor debido a que no es una infección de detección obligatoria en las revisiones médicas periódicas.

1.1 *Tricomoniasis*

La tricomoniasis es una infección no mortal que tiene como hospedero natural al humano, infecta el epitelio escamoso del tracto urogenital de hombres y mujeres. Es una infección crónica y puede durar desde meses hasta años. En la mayoría de los casos puede ser asintomática, cerca del 85%, pero puede llegar a presentar síntomas (Miller *et al.*, 2015). La infección por *T. vaginalis* es más prevalente que las causadas por *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y sífilis combinadas. La prevalencia global de *T. vaginalis* ha sido estimada en 8.1% en mujeres y 1% en hombres (Kissinger, 2015a).

1.2 *Epidemiología de la tricomonosis*

La tricomonosis no es considerada una infección de vigilancia epidemiológica a nivel mundial, lo que hace que los datos reportados a nivel nacional e internacional estén subestimados. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) se estima que anualmente se infectan ~276 millones de personas infectadas anualmente, considerando al hombre como el portador de la enfermedad (Poole & McClelland, 2013). La prevalencia e incidencia de la infección es mayor en regiones africanas y de América que en otras partes del mundo (Bouchemal, Bories, & Loiseau, 2017).

En México, de acuerdo al boletín epidemiológico del Sistema nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) durante el 2017 se detectaron un total de 47004 nuevos casos, 2245 detectados en hombres y 44759 en mujeres,

Veracruz es el estado con mayor número de casos detectados (7240), siendo la tricomonosis superada únicamente por la candidiasis.

1.3 Sintomatología de la tricomoniasis

La mayoría de los hombres y mujeres con tricomoniasis son asintomáticos (85%); sin embargo, entre la población que presentan síntomas se incluyen la descarga uretral y disuria. En la mujer, el parásito se encuentra en la parte baja del tracto urogenital, principalmente en vagina, uretra y endocérvix. En los hombres se encuentra en la uretra y próstata (Hirt & Sherrard 2015). La infección es crónica y puede durar de meses a años. Los síntomas que los pacientes pueden presentar incluyen dolor en el bajo vientre, vaginitis, cervicitis y uretritis con secreciones abundantes, espumosas de color verde amarillento y con mal olor. Muy pocas pacientes presentan el cérvix de fresa (2%). En los hombres puede causar epididimitis, prostatitis y disminución en la motilidad del espermatozoides (Hirt *et al.*, 2011; Kissinger, 2015b; Poole & McClelland, 2013).

A la fecha, se ha reportado una asociación entre *T. vaginalis* y vaginitis, uretritis y vaginosis bacteriana, candidiasis, herpes tipo 1 y 2, clamidia, gonorrea y sífilis. Además, *T. vaginalis* se ha asociado con bebés de bajo peso al nacer, nacimientos prematuros, ruptura prematura de las membranas amnióticas y enfermedad pélvica inflamatoria. Además, la infección se puede transmitir perinatalmente, causando infecciones respiratorias y vaginales en neonatos (Kissinger, 2015b; Kissinger & Adamski, 2013) .

1.4 Diagnóstico

En revisiones médicas periódicas no es obligatorio hacer un examen para la detección de *T. vaginalis*, por lo que es considerada como una ITS “descuidada”; en Estados Unidos el Centro de control de enfermedades (CDC por sus siglas en inglés) recomienda el estudio para la detección de tricomonosis sólo en mujeres infectadas con VIH (Muzny, 2018).

Recientemente, el diagnóstico se ha vuelto más preciso, permitiendo un tratamiento adecuado y el control de la infección, siendo el método tradicional de diagnóstico la microscopía en fresco para observar la motilidad del parásito a partir de muestras obtenidas de secreciones vaginales o cervicales en el caso de la mujer o descarga uretral en los hombres. El “estándar de oro” para el diagnóstico de la tricomoniasis era el método de cultivo en caldo (InPouch Tv), pues es fácil de interpretar. Ahora existen otros métodos que se basan en la detección de marcadores antigénicos de *T. vaginalis*, así como ensayos moleculares de PCR y RT-PCR (Bouchemal *et al.*, 2017; Edwards, Burke, Smalley, & Hobbs, 2016) e hibridación que se han convertido en los nuevos estándares de oro para identificar esta infección (Edwards *et al.*, 2016).

1.5 Tratamiento

Para la tricomoniasis el tratamiento habitual es el de metronidazol en dosis oral única de 2 g, de este tratamiento se conocen índices de curación de hasta 90% en parejas sexuales tratadas simultáneamente. A los pacientes que no responden satisfactoriamente a este tratamiento se les puede aplicar un tratamiento con otros derivados 5-nitroimidazoles en particular el tinidazol, el nimorazol y el ornidazol (Hirt & Sherrard, 2015; Kissinger, 2015a).

1.6 *Trichomonas vaginalis*

Trichomonas vaginalis es un parásito protozoo flagelado, generalmente piriforme, pero puede adoptar la forma ameboide al adherirse a la células (Fig. 1); mide entre 10 a 20 μm de largo y entre 4 a 14 μm de diámetro. Cuenta con cuatro flagelos que salen de su parte anterior y un quinto flagelo que forma una membrana ondulante que sale de la parte media del organismo y tiene un axostilo en la parte posterior (Lehker & Alderete, 2000).

T. vaginalis tiene un genoma de ~160 Mbp, organizado en seis cromosomas, siendo al menos el 65% de dicho genoma repetitivo (Carlton *et al.*, 2007). Para obtener la energía necesaria el parásito lleva a cabo un metabolismo de carbohidratos, el cual comienza en el citoplasma a través de la vía clásica

Embden-Meyerhoff-Parnas con la obtención de ATP en el hidrogenosoma, generando como productos: acetato, lactato, malato, glicerol, CO₂ e H₂ (Ibáñez-Escribano & Gómez-Barrio, 2017; Petrin, Delgaty, Bhatt, & Garber, 1998).

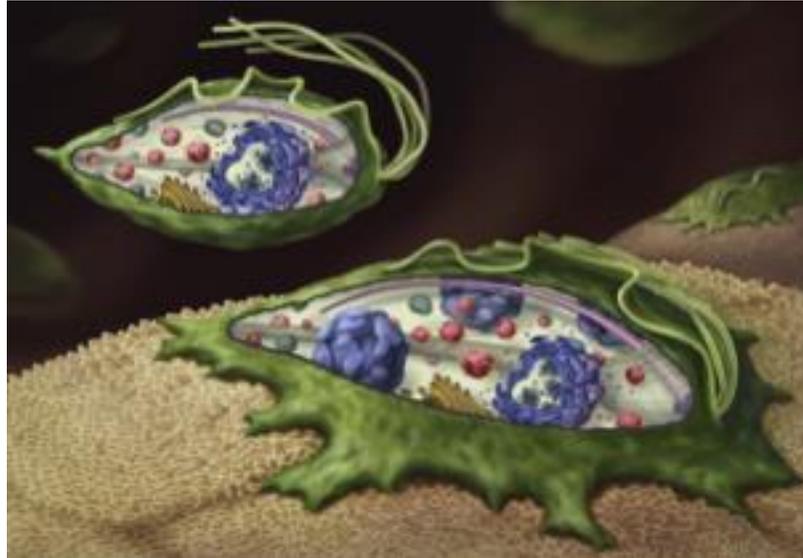


Fig. 1. Morfología de *T. vaginalis*. Se muestra la forma piriforme (parásito libre) y ameboide (adherido a la célula) del parásito (Gould *et al.*, 2013).

1.7 Ciclo biológico de *T. vaginalis*

Como ya se mencionó, *T. vaginalis* infecta el tracto urogenital del humano., Su ciclo de vida es sencillo comparado al de otros protozoarios patógenos, ya que solo presenta la forma de trofozoito y no necesita de hospederos intermediarios ni de vectores. Los parásitos se establecen en la mucosa vaginal, uretral y prostática, donde de manera asexual se reproduce por fisión binaria. La transmisión de *T. vaginalis* ocurre de persona a persona a través del contacto sexual (Fig. 2) (Petrin *et al.*, 1998; Poole & McClelland, 2013).

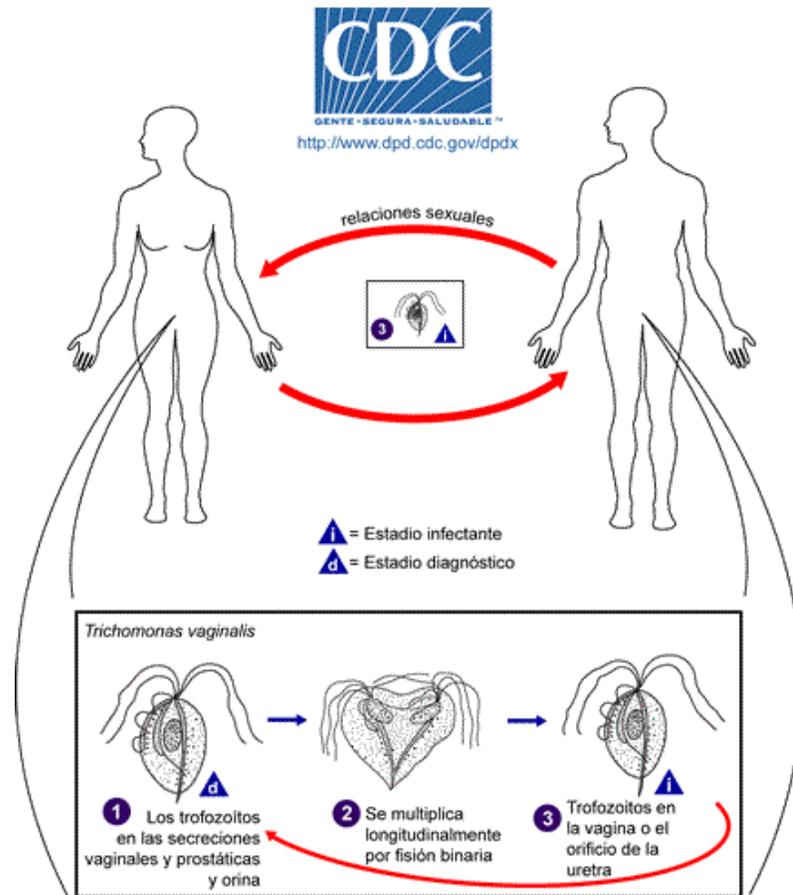


Fig. 2. Ciclo biológico de *T. vaginalis* (<https://www.cdc.gov/dpdx>).

1.8 Factores ambientales y *T. vaginalis*.

En el tracto urogenital tanto del hombre como de la mujer, el parásito está expuesto a diversas condiciones poco favorables como el pH ácido, la temperatura, presencia de lactobacilos, de zinc, cambios en las concentraciones hormonales durante el ciclo menstrual, descamación del epitelio, cambios en la concentración de hierro y glucosa, flujo menstrual, entre otros. Por lo que se ha comprobado que *T. vaginalis* es capaz de modular la respuesta de acuerdo a las condiciones que tenga presente en el microambiente durante la infección. *Trichomonas* responde mediante la expresión diferencial de distintos factores involucrados en propiedades de virulencia como citoadherencia, citotoxicidad, fagocitosis, etc. que le permiten subsistir a pesar del ambiente hostil (Figuroa-Angulo, Rendón-Gandarilla, et

al., 2012). El hierro puede regular positiva o negativamente la expresión de distintas proteínas como la TvCP4, AP65, AP33, etc., que participan en distintas propiedades de virulencia. Sin embargo, recientemente se ha reportado que las concentraciones de glucosa pueden regular la expresión y función de proteínas como la TvCatD, la cual degrada hemoglobina. Además, se ha determinado que las concentraciones de glucosa regulan la expresión y localización de la Triosafosfato Isomerasa de *T. vaginalis* (TvTIM), proteína que realiza funciones “moonlighting” (Figueroa-Angulo, Rendón-Gandarilla, *et al.*, 2012; Mancilla-Olea *et al.*, 2018; Miranda-Ozuna *et al.*, 2016).

1.9 Proteínas “moonlighting”

Las proteínas “moonlighting” comprenden a una clase de proteínas multifuncionales en la cual una proteína realiza múltiples funciones bioquímicas o biofísicas, fisiológicamente relevantes que no se deben a fusiones de genes, variantes múltiples de empalme de RNA o efectos pleiotrópicos. Basado en esta definición existen cerca de 300 proteínas que son consideradas como “moonlighting”(Jeffery, 2016). Ejemplos típicos son enzimas citosólicas o chaperonas, las cuales aparte de su función canónica actúan como receptores en la superficie celular, o enzimas citosólicas que actúan también como factores de transcripción en el núcleo o que son secretadas para funcionar como moléculas de señalización (Amblee & Jeffery, 2015; Jeffery, 2015).

Un ejemplo de una enzima glicolítica “moonlighting” es la enolasa, la cual usualmente se encuentra en la superficie de bacterias comensales o patógenas donde interactúa con la matriz extracelular del hospedero sirve como receptor de plasminógeno (Henderson, Fares, & Martin, 2016; Jeffery, 2009). La función de las proteínas “moonlighting” varía en consecuencia a cambios en la localización celular, el tipo de células, el estado oligomérico o la concentración celular de un ligando, sustrato, cofactor o producto. Estos diferentes mecanismos no son mutuamente excluyentes y, en muchos casos, una proteína puede utilizar una combinación de métodos para cambiar entre funciones (Jeffery, 1999).

1.10 Triosafosfato isomerasa

La triosafosfato isomerasa (TIM) es una enzima del metabolismo de carbohidratos que se encarga de catalizar la isomerización entre el gliceraldehído 3-fosfato y la dihidroxiacetona fosfato. Es una enzima que actúa como homodímero principalmente, donde cada una de las subunidades que conforman el dímero tienen un sitio activo independiente, pero la reacción no es simultánea en ambas subunidades (Saab-Rincón, Juárez, Osuna, Sánchez, & Soberón, 2001). Además de la función ya descrita, la TIM se comporta como una proteína “moonlighting” cuando se localiza en la superficie de microorganismos, como en el caso de *Paracoccidioides brasiliensis* y *Staphylococcus aureus* (Furuya & Ikeda, 2011; Pereira *et al.*, 2007). En parásitos como *Giardia duodenalis* y *Plasmodium falciparum*, se ha caracterizado a esta proteína al ser considerada como un blanco terapéutico potencial, mientras que en helmintos como *Brugia malayi*, se ha detectado en sus productos de secreción funcionando como blanco para anticuerpos (Hewitson *et al.*, 2014; Sulaiman *et al.*, 2003; Velanker *et al.*, 1997).

En *Trichomonas vaginalis* se ha descrito que posee dos genes totalmente funcionales para la triosafosfato isomerasa, *tvtim1* y *tvtim2*, estos genes se encuentran en distintos contigs, teniendo diferentes promotores de regulación, codificando para dos proteínas TvTIM-1 y TvTIM-2, ambas de 254 aminoácidos con un peso molecular de 27 kDa, variando solamente por cuatro aminoácidos: E/Q 18, I/V 24, I/V 45 y P/A 239 localizados en las α -hélices 1, 2 y 8. Mediante ensayos de RT-PCR el transcrito para el gen de la triosafosfato isomerasa del tipo 2, *tvtim-2*, es 3 veces más abundante que el tipo uno, *tvtim-1* (Figuroa-Angulo, Estrella-Hernández, *et al.*, 2012).

Mediante análisis cristalográfico se obtuvieron las estructuras de la TvTIM1 y la TvTIM2 (Fig. 3), donde se observa que hay una alta identidad en su secuencia y estructura, estructuralmente sólo difieren en un grupo metilo; sin embargo, en su estabilidad son diferentes al ser la TvTIM1 más estable y menos disociable que la TvTIM2. Las dos proteínas presentan el mismo sitio

activo: Lys 11, His 94 and Glu 166 (Lara-González et al., 2014). Aunque su localización normalmente es en el citoplasma del parásito, en condiciones de AG (50 mM) cambia su ubicación, relocalizándose a la superficie del parásito y actuando como receptor de fibronectina y laminina (Miranda-Ozuna *et al.*, 2016).

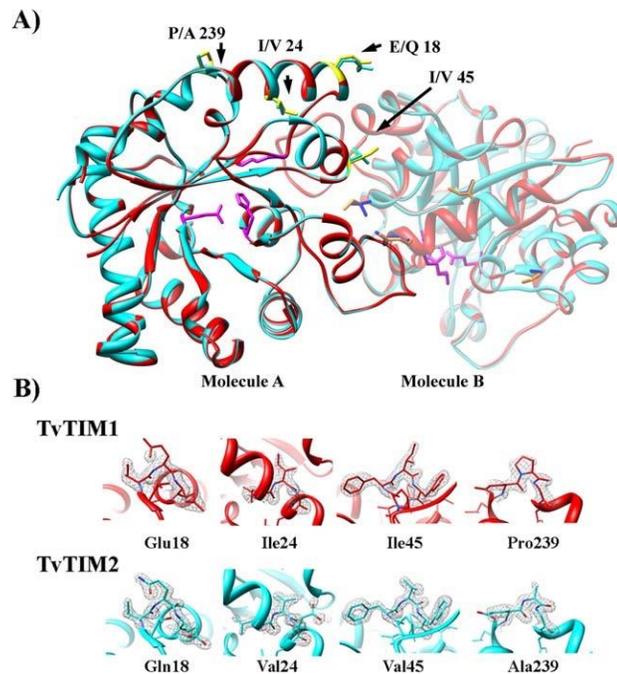


Fig. 3.- Estructura cristalográfica de las TvTIMs. (A) Superposición de los cristales de la TvTIM1 (en rojo) y la TvTIM2 (azul). El sitio activo de los monómeros se representa en magenta. **(B)** Aminoácidos en que difieren las dos estructuras (Lara-González *et al.*, 2014).

1.11 Vesículas extracelulares (VEs)

Las células liberan en el medio extracelular diferentes tipos de vesículas, las cuales se denominan exosomas y microvesículas, representando así una importante vía de comunicación intercelular, al permitir la transferencia de proteínas citosólicas, lípidos y RNA entre células (Raposo & Stoorvogel, 2013). Para definir el tipo de vesícula extracelular se debe tener en cuenta el origen de estas vesículas y su tamaño. Por ejemplo, los exosomas son vesículas de entre 30 y 100 nm, mientras que los ectosomas son de entre 150 nm hasta 1

μm. Las vesículas extracelulares además de sus funciones fisiológicas normales también pueden llegar a transportar moléculas de los patógenos a las células huésped, propagando así antígenos y agentes patógenos, por lo que es necesario estudiarlas, no sólo para la vigilancia inmunológica, sino también para entender la comunicación entre parásitos y parásito-hospedero (Coakley, Maizels, & Buck, 2015; Lo Cicero, Stahl, & Raposo, 2015).

Leishmania spp forma vesículas extracelulares para evadir la respuesta inmune de las células huésped, logrando una invasión y resistencia mayor, mientras que *Plasmodium falciparum* transfiere parte de su material y se disemina gracias a la formación de vesículas extracelulares (Coakley *et al.*, 2015; Mantel & Marti, 2014). En *T. vaginalis* la formación de vesículas extracelulares limita la migración de neutrófilos al sitio de infección (Nievas *et al.*, 2018; Olmos-Ortiz *et al.*, 2017; Twu *et al.*, 2013).

2. ANTECEDENTES DIRECTOS

La proteína triosafosfato isomerasa de *T. vaginalis* (TvTIM) participa en la glucólisis del parásito, por lo que es considerada un blanco terapéutico por su importancia para la obtención de energía.

Miranda-Ozuna *et al.* en el 2016 demuestra que la TvTIM es una proteína con función “moonlighting” al responder de forma positiva a la glucosa, pues en condiciones de alta glucosa (50 mM) el gen *tvim2* se sobre-expresa, mientras que la proteína cambia de localización dentro de la célula pasando del citoplasma a la membrana plasmática y adquiere una nueva función (Fig. 4). La proteína TvTIM se observa tanto en el citoplasma como en la superficie del parásito colocalizando con el marcador de membrana (DIL, en rojo), mientras que en restricción de glucosa (≤ 1 mM) no se observa la localización y expresión de la TvTIM. En la membrana la TvTIM funciona como proteína de unión a laminina y fibronectina.

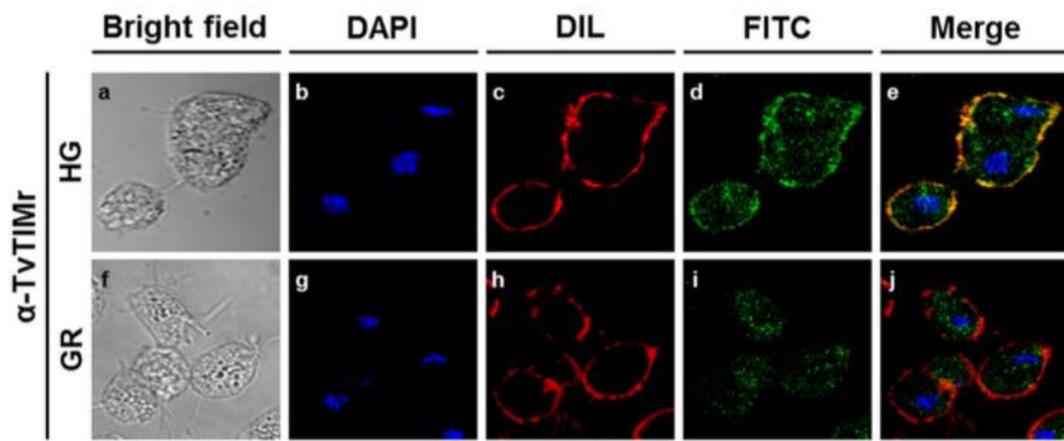


Fig. 4. La glucosa promueve la localización de la TvTIM a la superficie de *T. vaginalis*. Inmunofluorescencia indirecta muestra la localización en citoplasma y membrana y expresión de la TvTIM en parásitos crecidos en condiciones de AG (paneles a-e) y RG (paneles f-j) (Modificado de Miranda-Ozuna *et al.* 2016).

La presencia de la TvTIM se detectó en secreciones vaginales de pacientes con tricomoniasis (Fig. 5) por ensayos de Western blot como una banda en la región de 27 kDa que corresponde a la TvTIM en 9 carriles (Fig. 5, carriles 1, 2, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 16) de las 16 muestras analizadas. Además, el análisis por espectrometría de masas se detectó como proteína mayoritaria a la TvTIM2.

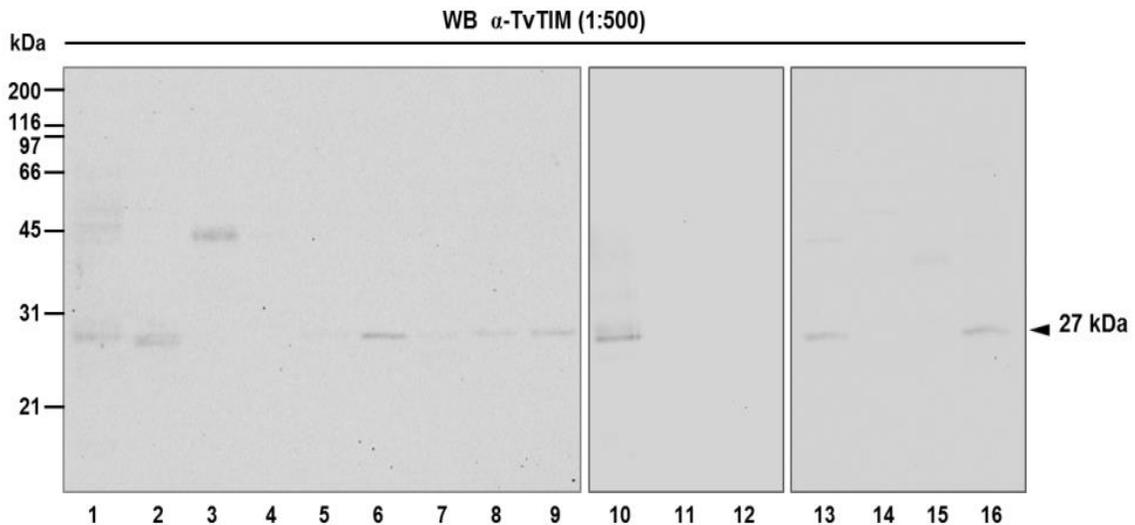


Fig. 5. Presencia de la TvTIM en secreciones vaginales de pacientes con tricomonosis. Ensayo de WB con perfil proteico de secreciones vaginales de pacientes con tricomonosis con el anticuerpo anti-TvTIMr que reconoce una banda de 27 kDa de las proteínas TvTIM de *T. vaginalis* (Miranda-Ozuna, 2016).

De igual forma se detectó por microscopía la presencia de TvTIM en la membrana, citoplasma y núcleo de células epiteliales vaginales de pacientes con tricomoniasis (Fig. 6) (Miranda-Ozuna, 2016).

La adherencia de *T. vaginalis* a VECs y el contacto con las proteínas secretadas por el parásito en contacto con VECs regula la expresión de ciertos genes que podrían estar ligados a la patogenia (Kucknoor, Mundodi, & Alderete, 2007). *T. vaginalis* produce y secreta microvesículas con propiedades físicas y bioquímicas similares a exosomas y ectosomas de mamíferos. Dichas vesículas modulan la respuesta inmune de las células

huésped. Además, mediante espectrometría de masas se ha determinado el contenido de estas vesículas provenientes de parásitos en condiciones normales o con estímulo de CaCl_2 , donde se encuentra a la TvTIM2 (Nievas *et al.*, 2018; Olmos-Ortiz *et al.*, 2017; Twu *et al.*, 2013).

En base a esta información surgió el interés de investigar el mecanismo de entrada de la TvTIM en las células huésped y la respuesta que desencadene en la célula hospedera.

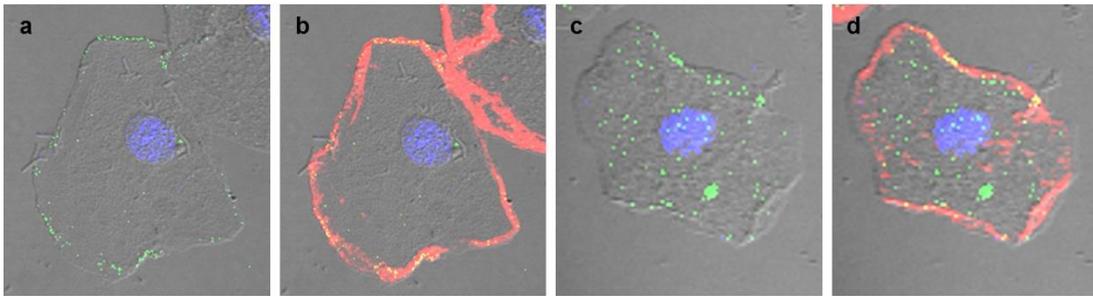


Fig. 6. Presencia de la TvTIM en células epiteliales vaginales de pacientes con tricomonosis. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta muestran a la proteína TvTIM marcada con FITC (en verde) en el citoplasma y de forma puntual en estructuras parecidas a vesículas, las cuales colocalizan con proteínas de membrana (en amarillo) (Modificado de Miranda-Ozuna, 2016).

3. JUSTIFICACIÓN

La patogenicidad de *T. vaginalis* es mediada por la adhesión en interacción con las células huésped. En distintas condiciones de cultivo, se ha observado que proteínas metabólicas del parásito se vuelven multifuncionales (“moonlighting”). Un claro ejemplo de esto es la proteína TvTIM, la cual en condiciones ambientales normales se encuentra en el citoplasma participando en la glucólisis; sin embargo, a altas concentraciones de glucosa se relocaliza a la superficie del parásito y funciona como receptor de laminina y fibronectina. En altas concentraciones de glucosa, la proteína TvTIM se secreta *in vitro* y también, se le encuentra en secreciones vaginales y en el interior de células epiteliales vaginales de pacientes infectadas con tricomonas (Tv (+)). Además, recientemente la TvTIM se localizó en la superficie, en el citoplasma y en el núcleo de las células vaginales de pacientes Tv (+) (Miranda-Ozuna, tesis de doctorado, 2016). Por lo que es de interés conocer las condiciones que permiten su secreción y la forma en que esta proteína llega a la célula hospedera para así entender mejor la patogenia del parásito.

4. HIPÓTESIS

T. vaginalis secreta a TvTIM en vesículas extracelulares al ser cultivada en distintas condiciones ambientales de glucosa y hierro; dichas vesículas interaccionan con las células huésped, se fusionan y liberan su contenido al interior de la célula.

5. OBJETIVOS

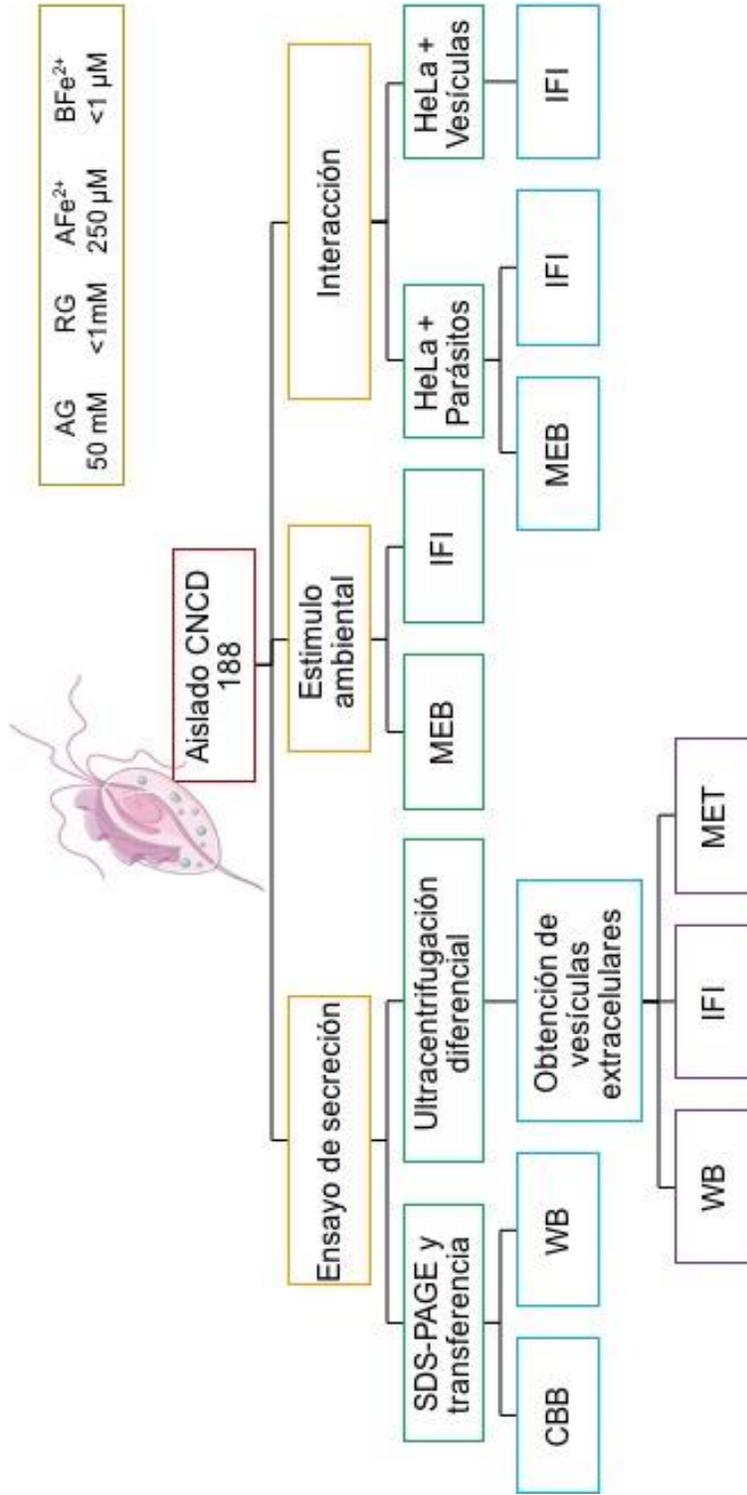
General

Identificar a la TvTIM en vesículas extracelulares de secreción de *T. vaginalis* inducida por distintas condiciones ambientales, los tipos de formación de vesículas extracelulares de secreción y la interacción con células huésped.

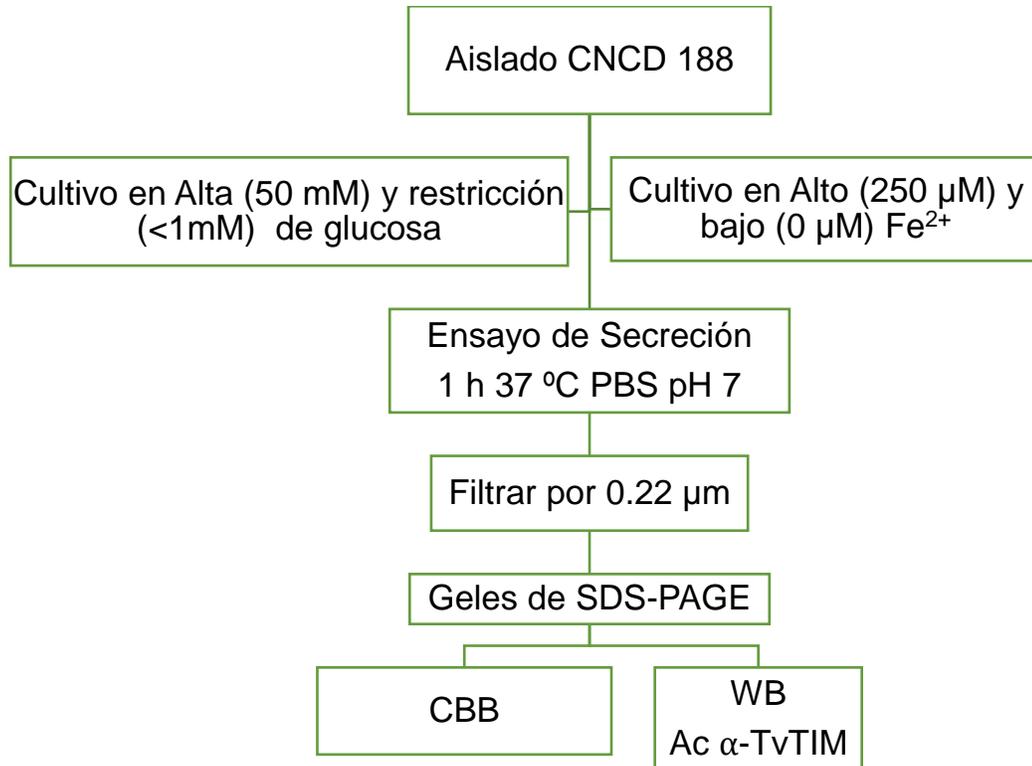
Específicos

- Identificar a TvTIM en secreciones del parásito cultivado en distintas condiciones ambientales (glucosa y hierro).
- Identificar los tipos de secreción vesicular presentes en el parásito.
- Determinar si la interacción de *T. vaginalis* con las células huésped permite seguir la movilización e internalización de la TvTIM del parásito a la célula hospedera.
- Obtener vesículas extracelulares de *T. vaginalis*, localizar a TvTIM e interaccionarlas con células hospederas y determinar si se internaliza.

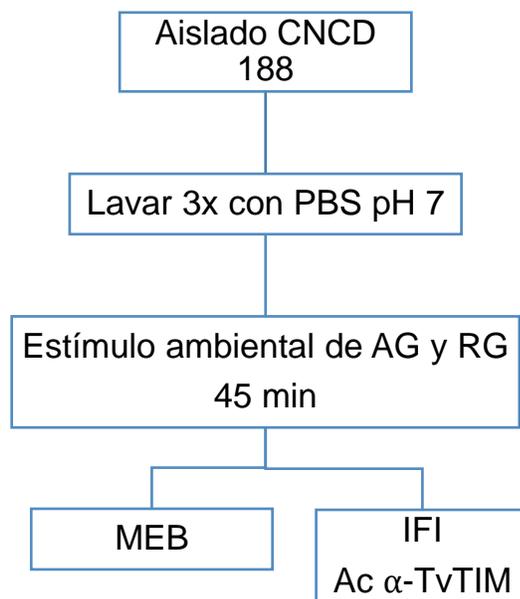
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



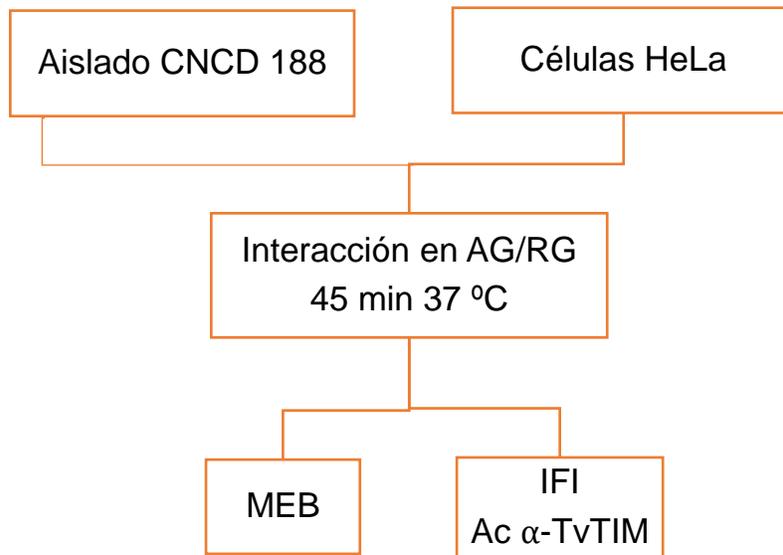
6.1 Objetivo 1. Identificar a TvTIM en secreciones del parásito cultivado en distintas condiciones ambientales (glucosa y hierro).



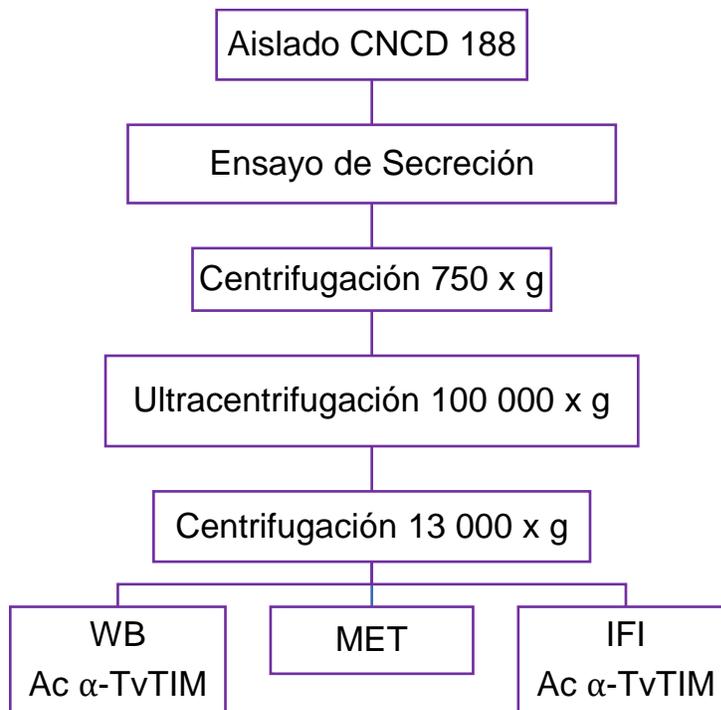
6.2 Objetivo 2. Identificar las tipos de secreción vesicular presentes en el parásito.



6.3 Objetivo 3. Analizar la interacción de TvTIM con las células huésped y su localización dentro de éstas.



6.4 Objetivo 4. Obtener vesículas extracelulares de *T. vaginalis*, localizar a TvTIM e interaccionarlas con células hospederas.



7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Cultivo de parásitos

En este trabajo se utilizó el aislado CNCD 188 de *T. vaginalis* de una semana de cultivo, para los experimentos de glucosa se cultivaron por dos días en medio TY (Tryptona-Extracto de levadura) suplementado al 10% con suero de bovino adulto (SBA) para restricción de glucosa (RG) o suplementado con 50 mM de glucosa para Alta glucosa (AG). Para los ensayos de hierro los parásitos se cultivaron en medio TYM (Tryptona-Extracto de levadura-Maltosa), suplementado al 10% con SBA y adicionado con 150 μ M de 2-2'-dipiridilo para la condición de bajo hierro (BFe) o 250 μ M de sulfato ferroso amoniacal para alto hierro (AFe).

7.2 Cultivo de células HeLa

Las células HeLa se cultivaron sobre laminillas en medio DMEM-SBA al 10% con penicilina/estreptomina al 1%, se incubaron a 37 °C con CO₂ al 5% por 20 h.

7.3 Extracción de proteínas totales

Para la extracción de proteínas totales se utilizaron 2×10^7 parásitos del aislado CNCD 188, lavados 3x con PBS pH 7 frío; la pastilla de parásitos se resuspendió en 900 μ l de PBS y 100 μ l de ácido tricloroacético (TCA) al 100% y se incubó a 4 °C toda la noche. Para obtener las proteínas precipitadas, se centrifugó a 13 000 rpm por 5 min a 4 °C; la pastilla se lavó 3x con acetona fría, se secó, se resuspendió en amortiguador de muestra 1x y se hirvió 3 min. Los extractos proteicos se analizaron por electroforesis (SDS-PAGE) en geles de poliacrilamida al 12%. Duplicados de los geles se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa (NC) DE 0.22 μ M (Bio-Rad) para ensayos de Western blot (WB).

7.4 Ensayos de secreción

Para detectar la presencia de TvTIM en las secreciones de tricomonas cultivadas en AG, RG, AFe o BFe, se realizaron ensayos de secreción *in vitro* a una densidad de 1×10^6 parásitos/ml previamente lavados 3x con PBS pH 7 en un volumen final de 5 ml de PBS pH 7 en las condiciones descritas y se incubaron por 1 h a 37 °C. Para obtener los productos de secreción, los parásitos se removieron por centrifugación 2x a 1800 rpm por 5 min a 4 °C, para eliminar los parásitos y restos celulares. El sobrenadante se filtró por membranas de 0.22 μm y las proteínas presentes en el sobrenadante se precipitaron con TCA al 10%.

7.5 Electrotransferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa

Los geles de poliacrilamida al 12% después de la electroforesis (SDS-PAGE) se electrotransfirieron a membranas de NC de 0.22 μm (Bio-Rad). El sándwich para la transferencia llevó el siguiente orden: parte oscura de la unidad de transferencia, esponja, papel filtro, el gel a transferir, membrana de NC de 0.22 μm (Bio-Rad), papel filtro Whatman No. 3, esponja y lado transparente de la unidad. Este sándwich se colocó en la cámara húmeda en amortiguador de transferencia en frío con agitación y se transfirió a 100 V por 1 h. La transferencia se comprobó por tinción de la membrana de NC con Rojo de Ponceau, se capturó y se destiñó con PBS pH 7. Las membranas con las proteínas transferidas se bloquearon toda la noche con leche descremada al 10% en PBS-Tween 20 al 0.1% (PBS-T), en agitación suave a 4 °C, se lavaron 5x con PBS-T y se usaron para los ensayos de WB.

7.6 Western Blot

Las membranas de NC ya bloqueadas se incubaron con los anticuerpos primarios en dilución 1:1000 en leche al 5% en PBS-Tween 20 por 18 h a 4 °C en agitación suave. Las membranas de NC se lavaron 5x con PBS-T y se incubaron con un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo acoplado a peroxidasa (Bio-Rad) en dilución 1:3000 en leche al 2.5% en PBS-T por 1 h a

37 °C, se lavaron 5x con PBS-T, se revelaron por quimioluminiscencia con el kit “SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate” (Thermo Scientific-Pierce) y las imágenes se capturaron con un fotodocumentador (ChemiDoc XRS, Bio-Rad) mediante el software “Quantity One” (Bio-Rad).

7.7 Microscopía electrónica de barrido

Los parásitos cultivados en AG y RG se lavaron 3x con PBS pH 7 y se colocaron en laminillas de vidrio por 45 min con PBS pH 7 a temperatura ambiente (TA) suplementado con glucosa 50 mM para la condición de AG o solo PBS para RG y se incubaron a 37 °C, se les retiró el PBS y se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilato por 1 h a TA y se lavaron 3x con PBS y agua bidestilada, se procedió a la deshidratación con concentraciones crecientes de etanol: 50, 70 y 90% por 10 min y al final 3 cambios de etanol al 100%. Las muestras se secaron a punto crítico empleando CO₂ a 100 psi a 31 °C en un secador Sandri-780 (Tousimis), se cubrieron con oro empleando un ionizador JFC-1100 (Jeol) durante 5 min y las muestras se analizaron en un microscopio electrónico de barrido JEOL-JSM 7100 F (JEOL Ltd., Tokyo, Japan).

7.8 Inmunofluorescencia indirecta (IFI) de parásitos

Para la inmunofluorescencia indirecta de tricomonas, se utilizaron parásitos cultivados en AG o RG, se lavaron 3x con PBS pH 7 y se colocaron sobre las laminillas por 45 min con PBS pH 7 suplementado con Glucosa 50 mM para AG o solo PBS para RG y se incubaron a 37 °C, se les retiró el PBS y se fijaron con formaldehído al 4% en PBS por 15 min a TA, se lavaron 2x con NH₄Cl 20 mM en PBS, 2x con BSA al 0.2% en PBS y 2x con PBS. Los parásitos fijados y bloqueados se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.07% en PBS durante 10 min a TA, se lavaron 3x con PBS y 2x con BSA al 0.2% en PBS (PBS-BSA), se incubaron con el anticuerpo primario anti-TvTIMr (dilución 1:100) en PBS-BSA por 1 h a temperatura ambiente en agitación, después se lavaron 5x con PBS-BSA y se incubaron por 1 h con el anticuerpo secundario de cabra anti-

conejo acoplado a FITC (Thermo Fisher) en dilución 1:100 en PBS-BSA a TA y con agitación. Después, las laminillas se lavaron 3x con PBS-BSA y 2x con PBS, se incubaron con DIL (DIL-CM-38; Molecular Probes-Invitrogen) en dilución 1:1000 en agua miliQ filtrada por 30 min a TA para teñir membranas, se lavaron 5x con PBS y se montaron con 4 μ l de solución “Vectashield” con DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) para teñir los núcleos. Los parásitos se observaron por microscopía confocal en un microscopio Zeiss y se analizaron las imágenes con el software ZEN 2010 (Carl Zeiss, Germany).

7.9 Ensayos de interacción célula HeLa-parásitos

Las células HeLa se crecieron sobre laminillas de vidrio en placas de 24 pozos hasta llegar a confluencia, se lavaron 3x con PBS a TA y se interaccionaron con parásitos en AG y RG, lavados previamente 3x con PBS, en una relación 1:5 células: parásitos, por 45 min a 37 °C en CO₂ al 5% en medio de interacción DMEM: TY en relación 2:1 sin suero para RG o adicionado con glucosa 50 mM para AG. Posteriormente, se les retiró el medio de interacción y se fijaron para IFI y MEB (sin lavar para observar todo lo que se secretó durante la interacción).

7.10 IFI de las interacciones de células HeLa-parásitos

A monocapas de células HeLa interaccionadas con parásitos en AG y RG por 45 min a 37 °C sobre laminillas como se describió previamente, se les retiró el medio de interacción y sin lavar se fijaron con formaldehído al 4% por 15 min a TA, se lavaron 2x con NH₄Cl 20 mM en PBS, 2x con PBS-BSA y 2x con PBS, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.07% en PBS durante 10 min a TA, se lavaron 3x con PBS y 2x con PBS-BSA, se incubaron con el anticuerpo primario anti-TvTIMr (dilución 1:100 en PBS-BSA) por 1 h TA en agitación, se lavaron 5x con PBS-BSA y se incubaron por 1 h con el anticuerpo secundario de cabra anti-conejo acoplado a FITC (Thermo Fisher) en dilución 1:100 en PBS-BSA a TA y con agitación. Las laminillas se lavaron 3x con PBS-BSA y 2x con PBS, se montaron con 4 μ l de solución “Vectashield” con DAPI (Vector

Laboratories, Burlingame, CA, USA) para teñir los núcleos. Las muestras se observaron por microscopía confocal en un microscopio Zeiss y se analizaron las imágenes con el software ZEN 2010 (Carl Zeiss, Germany).

7.11 Obtención de vesículas extracelulares

Para la obtención de vesículas extracelulares de *T. vaginalis* se partió del método estándar para la obtención de vesículas reportado por Raposo y col. 2011 utilizando parásitos en fase logarítmica a una densidad de 2×10^6 parásitos/ml en 30 ml de PBS pH 7 en RG (≤ 1 mM) y AG (50 mM) por 1 h a 37 °C. El producto de secreción se centrifugó 2x a 800 x g por 10 min a 4 °C para retirar parásitos y restos celulares. El sobrenadante se ultracentrifugó a 100 000 x g por 75 min a 4 °C, se desechó el sobrenadante y las pastillas obtenidas se juntaron por centrifugación a 13 000 x g durante 15 min a 4 °C. Las pastillas de vesículas se utilizaron para microscopía electrónica de transmisión, inmunofluorescencia indirecta, ensayos de WB o para interacción con células HeLa.

7.12 Detección de la TvTIM en vesículas extracelulares de *T. vaginalis*

Para detectar a la proteína TvTIM en las vesículas extracelulares de secreción, se realizó la extracción de proteínas totales de las VEs con TCA al 10%. La pastilla de VEs se resuspendió en 450 μ l de PBS y se le agregó 50 μ l de TCA al 100% y se dejó precipitando toda la noche a 4 °C. La pastilla de proteínas se obtuvo por centrifugación a 13 000 x g por 5 min a 4 °C, se lavó 3x con acetona fría y se resuspendió en 30 μ l de BM 1x, se hirvió 5 min y se analizó por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12% y las proteínas se transfirieron a membrana de NC (0.22 μ m, Bio-Rad) para su análisis por WB con el anticuerpo primario anti-TvTIMr (dilución 1:1000) y con el anticuerpo secundario de cabra anti-conejo acoplado a peroxidasa (dilución 1:3000). Las bandas reactivas se detectaron por quimioluminiscencia, las imágenes se

capturaron con un fotodocumentador (ChemiDoc XRS, Bio-Rad) y se analizaron con el software “Quantity One” (Bio-Rad).

7.13 IFI de las vesículas extracelulares de *T. vaginalis*

La pastilla de VEs se fijó en 400 μ l de formaldehído al 4% sobre cubreobjetos tratados con poli-L-lisina (SIGMA) por 20 min a TA, se lavaron 1x con NH_4Cl 20 mM en PBS, 1x con PBS-BSA y 1x con PBS, se incubaron con el anticuerpo primario anti-TvTIMr (dilución 1:100) en PBS-BSA por 1 h a TA en agitación, se lavaron 3x con PBS-BSA y se incubaron por 1 h con el anticuerpo secundario de cabra anti-conejo acoplado a FITC (Thermo Fisher; dilución 1:100) en PBS-BSA a temperatura ambiente y con agitación. Las laminillas se lavaron 2x con PBS, se incubaron con DIL (Molecular Probes-Invitrogen; dilución 1:1000) en agua miliQ filtrada por 20 min a TA, se lavaron 3x con PBS. Las laminillas se montaron en 7 μ l de solución “Vectashield”. Las VEs se observaron por microscopía confocal (Zeiss) y se analizaron las imágenes con el software ZEN 2010.

7.14 Microscopía electrónica de transmisión de vesículas extracelulares

Las pastillas de VEs del aislado CNCD 188 cultivado en condiciones de AG y RG se fijaron con glutaraldehído al 2.5% con CaCl_2 5 mM en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M por 1 h a temperatura ambiente. Las pastillas se lavaron 3x con amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M y se post-fijaron con tetróxido de Osmio al 1% por 1 h a TA y se lavaron con el amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M. La deshidratación de la pastilla se realizó con diferentes grados de etanol: 50, 70, 90 y 100% y óxido de propileno. Una vez en óxido de propileno la pastilla se desprendió del tubo Eppendorf y se transfirió a la resina de preinclusión, la cual se preparó mezclando óxido de propileno y resina Polybed en relación 1:1. La muestra se dejó en la resina de preinclusión toda la noche a TA, se hicieron cambios de resina pura; se

transfirieron a moldes de silicón y la polimerización se llevó a cabo en una estufa a 56 °C toda la noche.

Los cortes semifinos de 40-60 nm de grosor se colocaron en rejillas de cobre, se contrastaron con acetato de uranilo al 5% y plomo Reynold's. Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de transmisión marca JEOL modelo JEM1011 (Jeol LTD., Tokyo, Japan).

7.15 Inmunomarcaje con oro coloidal

La pastilla de vesículas se fijó con paraformaldehído al 4%-glutaraldehído al 0.5% en PBS toda la noche a 4 °C y se procesó sin resuspenderse, se lavó 3x con PBS y la deshidratación se realizó con diferentes grados de etanol: 25, 50, 70, 90 y 100% por 15 min. La preinclusión de la pastilla se realizó mezclando etanol al 100% y resina LR-white en relación 2:1 por 1 h, luego en una relación 1:1 por 2 h y finalmente en relación 2:1 toda la noche a TA. La pastilla se desprendió del fondo del tubo Eppendorff con ayuda de una aguja y se realizaron 5 cambios de resina pura. Después, la pastilla se transfirió a cápsulas de gelatina y se dejó polimerizar en una cámara de luz UV durante 3 días a 4 °C. Los cortes finos de 40-60 nm de grosor, se colocaron en rejillas de níquel, se bloquearon con suero fetal bovino al 10% en PBS por 1 h, se incubaron con el anticuerpo primario (α -TvTIMr o α -TvCP4r, dilución 1:15) en cámara húmeda y se incubaron a 4 °C toda la noche. Las rejillas se lavaron 5x con PBS para quitar el exceso de anticuerpo, se incubaron 1 h a TA con el anticuerpo secundario α -conejo acoplado a partículas de oro de 20 nm (Ted Pella Redding, CA USA) diluido 1:50 en suero fetal bovino al 5%; las rejillas se lavaron con PBS y agua bidestilada filtrada. Los cortes se contrastaron con acetato de uranilo al 5% y plomo Reynold's y se observaron en el microscopio electrónico de transmisión marca JEOL modelo JEM1011.

7.16 Interacción de células HeLa-Vesículas extracelulares de *T. vaginalis*

Para los ensayos de IFI, antes de la interacción las vesículas se tiñeron con DIL 1:1000 por 30 min a temperatura ambiente en oscuridad, se lavaron 3x con PBS, se resuspendieron en 200 μ l de medio de interacción DMEM-AG sin suero ni antibiótico y se adicionaron a monocapas confluentes de células HeLa crecidas sobre laminillas, las cuales se lavaron previamente 3x con PBS pH 7 tibio. La interacción células HeLa-vesículas de Tv se incubó por 45 min a 37 °C en incubadora de CO₂ al 5%, se les retiró el medio y se fijaron con formaldehído al 4% por 10 min a TA. Las laminillas se lavaron 2x con NH₄Cl 20 mM en PBS, 2x con PBS-BSA y 2x con PBS. Las muestras se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.07% en PBS por 10 min a TA, se lavaron 3x con PBS y 2x con PBS-BSA, se incubaron con el anticuerpo primario anti-TvTIMr (dilución 1:100) en PBS-BSA por 1 h a TA en agitación, se lavaron 5x con PBS-BSA y se incubaron por 1 h con el anticuerpo secundario de cabra anti-conejo acoplado a FITC (Thermo Fisher; dilución 1:100) en PBS-BSA a TA y con agitación, se lavaron 3x con PBS-BSA y 2x con PBS. Las laminillas se montaron en 4 μ l de solución "Vectashield" con DAPI. Las muestras se observaron por microscopía confocal (Zeiss) y las imágenes se analizaron con el software ZEN 2010.

7.17 Ensayo de viabilidad de células HeLa

Para medir la viabilidad de las células HeLa posterior al contacto con vesículas extracelulares de Tv se utilizó el kit "Annexin V-FITC Fluorescence Microscopy Kit" (BD Pharmigen). La monocapa confluyente de células HeLa crecida sobre laminilla se incubó con las vesículas de Tv en medio DMEM-AG sin suero por 45 min a 37 °C en la incubadora de CO₂ al 5%, se les retiró el medio y se lavaron 2x con PBS y 1x con el amortiguador de unión a Annexin V 1x. Las células se tiñeron con Annexin V-FITC 1:10 en el amortiguador de unión 1x por 15 min a TA, se lavaron 1x con el amortiguador de unión 1x y se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS por 15 min a TA. La laminilla se montó en

4 μ l de Vectashield con DAPI y se observó por microscopía confocal. Como controles se utilizaron células HeLa sin interaccionar con vesículas y vesículas solas tratadas de la misma manera.

7.18 Análisis estadístico

Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron por análisis de varianza (ANOVA), utilizando el software GraphPad Prism 6.0.

8. RESULTADOS

8.1 Detección de la proteína TvTIM en secreciones de parásitos cultivados en distintas condiciones ambientales

Como parte de los antecedentes de este trabajo se detectó a la proteína TvTIM de *T. vaginalis* en las secreciones de algunas pacientes con tricomonosis (Miranda-Ozuna, 2016). Además, se mostró que TvTIM sigue vías de secreción no convencionales al relocalizarse a la membrana plasmática del parásito en condiciones de AG. Por lo que surgió la duda de si TvTIM se libera al medio solo bajo ciertas condiciones ambientales. Por lo que en este trabajo se realizaron ensayos de secreción *in vitro* de parásitos viables en condiciones de AG y RG, así como en condiciones de AFe y BFe. La figura 7A muestra el perfil de proteínas totales (PT) de los parásitos cultivados en RG (carril 1) y en AG (carril 2) utilizados como controles positivos. El perfil de las proteínas de secreción (PS) en RG (carril 3) y en AG (carril 4). Al comparar los perfiles de proteínas en las distintas condiciones ambientales, se observaron proteínas en la región de 27 kDa que podrían corresponder a TvTIM. Para evaluar la presencia de dicha proteína se realizaron ensayos de WB, de geles duplicados (A) transferidos a membranas de NC e incubadas con el anticuerpo anti-TvTIMr. La figura 7B muestra los resultados de un ensayo representativo del reconocimiento del anticuerpo anti-TvTIMr de una banda de 27 kDa en las PS en condiciones de AG (carril 16), mientras que en condiciones de RG el anticuerpo anti-TvTIMr no detectó a la proteína (carril 15). Aunque si se detectó la presencia de TvTIM en las PT de las dos condiciones (RG carril 13 y AG carril 14) como se esperaba. Como control de proteínas citoplásmicas, se utilizó un anticuerpo anti-EhHKr que reconoce una banda de 40 kDa de la hexoquinasa de *T. vaginalis* solo en las PT ya que funciona como control negativo de secreción (carriles 9-12). Como control positivo de secreción se usó el anticuerpo anti-TvCP4r que reconoce una banda de 24 kDa de la proteasa TvCP4 madura (carriles 5-8) y como control negativo se usó el suero pre inmune (carriles 1-4).

En la figura 8 se muestra el resultado del efecto del hierro en la secreción de la TvTIM. La figura 8A muestra los perfiles de PT en condiciones de BFe (carril 1) y AFe (carril 2) así como las PS de ambas condiciones (BFe, línea 3 y AFe línea 4), donde también se observó una región de 27 kDa que podría corresponder a las proteínas TvTIM. En la Figura 8B se muestra la detección por WB de la proteína TvTIM, aunque TvTIM se detecta en las PT de las dos condiciones (BFe, carril 13 y AFe, carril 14), no se detecta en las PS de dichas condiciones (BFe, carril 15 y AFe, carril 16). Los mismos controles positivos y negativos del panel A muestran que la proteína TvCP4 sólo se detecta en AFe tanto en PT (carril 10) como en PS (carril 12) y no se observa en BFe (PT, carril 9; PS, carril 10). Estos resultados muestran que la cantidad de esta proteína se regula positivamente hierro. En cambio, la proteína hexoquinasa no se detectó en las secreciones (BFe carril 7 y AFe carril 8), ni en las PT en BFe (carril 5), probablemente porque la cantidad de proteína cargada no fue suficiente, ya que en las PT de AFe si se detectó la banda correspondiente (carril 6). Como control negativo de igual forma se utilizó el suero pre inmune (PI) (carriles 1-4) y no se observó reactividad como se esperaba. Estos ensayos se realizaron por duplicado y los resultados sugieren que la secreción de la proteína TvTIM se regula positivamente por glucosa. Sin embargo, no se puede descartar que la proteína no esté presente en la fracción insoluble de la secreción.

Figura 7. Efecto de la glucosa en la secreción *in vitro* de las proteínas TvTIM de *T. vaginalis*. (A) Perfil de proteínas totales (PT, carriles 1 y 2) y de proteínas de secreción (PS, carriles 3 y 4) de parásitos cultivados en RG (≤ 1 mM) y AG (50 mM) analizados por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12% y teñido con azul brillante de Coomassie (CBB). (B) Ensayos de WB con geles duplicados de (A) transferidos a membranas de NC e incubados con suero PI como control negativo, o con diferentes anticuerpos: anti-EhHKr, que reconoce una banda de 40 kDa correspondiente a la hexoquinasa de tricomonas (TvHK) utilizado como control negativo de secreción; anti-TvCP4r que reconoce una banda de 24 kDa de la proteasa TvCP4 utilizado como control positivo de secreción; anti-TvTIMr que reconoce un banda de 27 kDa de las proteínas TvTIM de *T. vaginalis*. Los productos de secreción se obtuvieron después de 1 h de incubación a 37°C de los parásitos en RG o AG. Todos los anticuerpos se utilizaron en una dilución 1:1000. Los ensayos se realizaron por duplicado de manera independiente y las imágenes se analizaron con el software “Quantity One” (Bio-Rad).

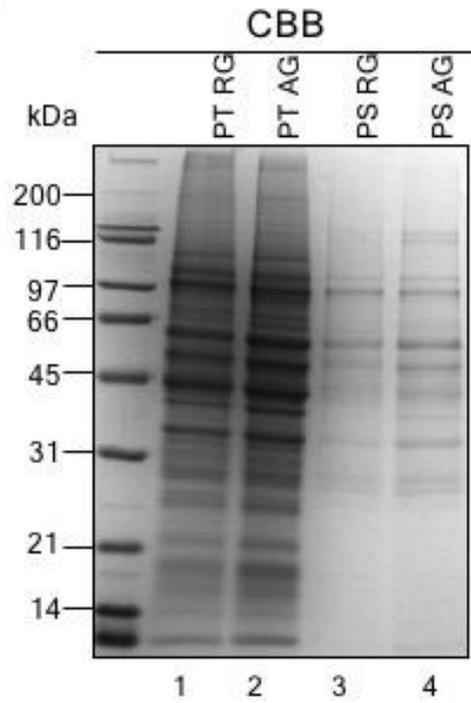
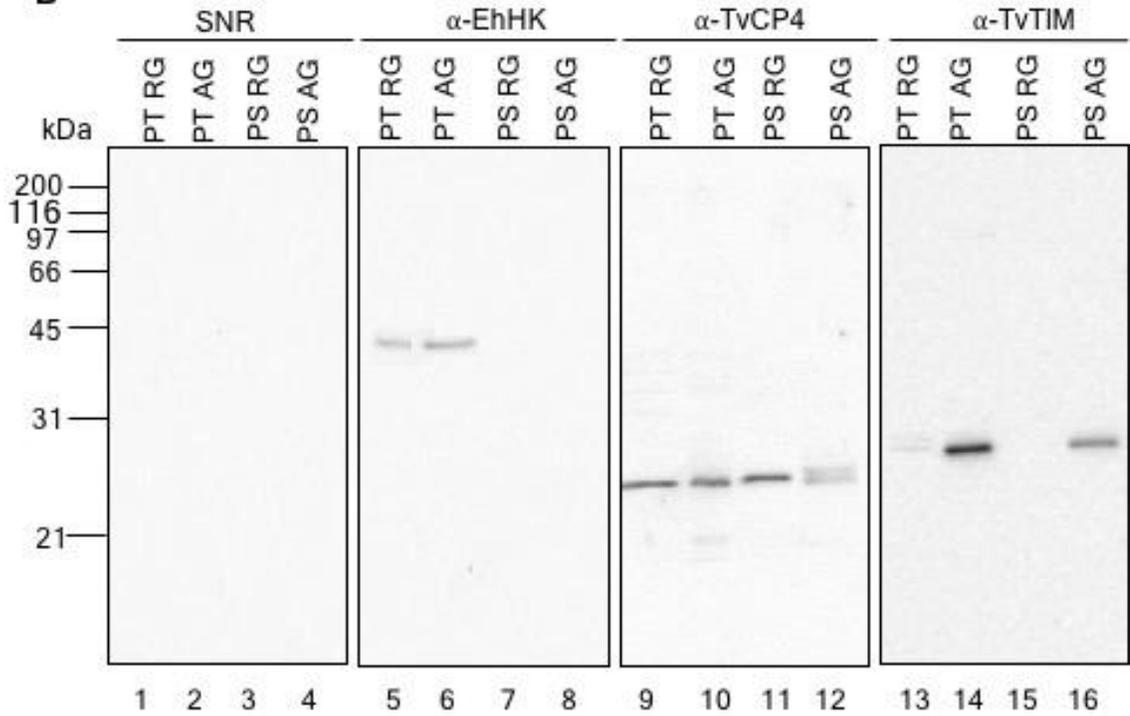
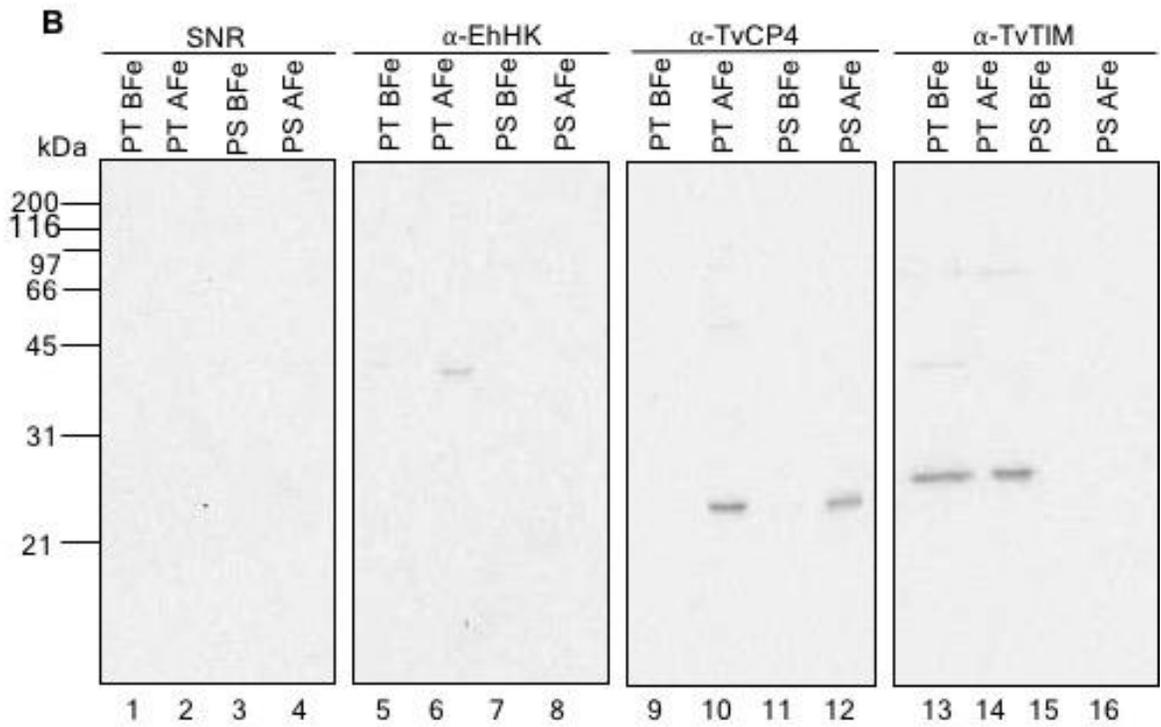
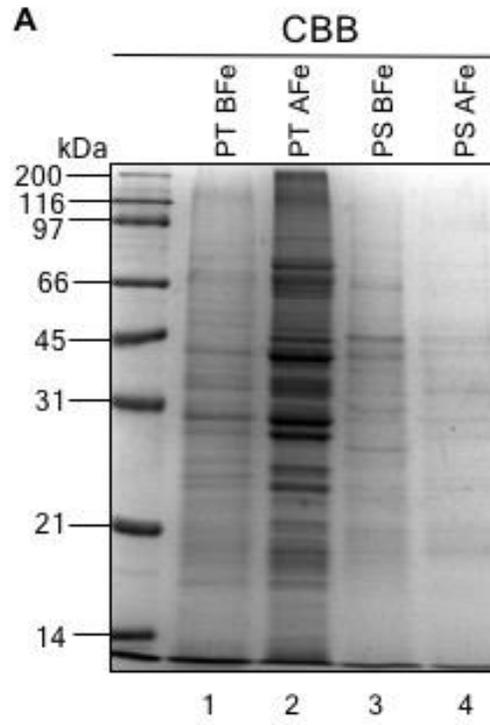
A**B**

Figura 8. Efecto del hierro en la secreción *in vitro* de TvTIM de *T. vaginalis*. (A) Perfil de proteínas totales (PT, carriles 1 y 2) y de proteínas de secreción (PS, carriles 3 y 4) de parásitos cultivados en BFe (<1 μ M) y AFe (250 μ M), analizados por SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 12% y teñido con azul brillante de Coomassie (CBB). (B) Ensayos de WB con geles duplicados de (A) transferidos a membranas de NC e incubados con suero PI como control negativo, o con diferentes anticuerpos: anti-EhHKr, que reconoce una banda de 40 kDa correspondiente a la hexoquinasa de tricomonas (TvHK) utilizado como control negativo de secreción; anti-TvCP4r que reconoce una banda de 24 kDa de la proteasa TvCP4 utilizado como control positivo de secreción; anti-TvTIMr que reconoce una banda de 27 kDa de las proteínas TvTIM de *T. vaginalis*. Los productos de secreción se obtuvieron después de 1 h de incubación a 37°C de los parásitos cultivados en BFe o AFe. Todos los anticuerpos se utilizaron en una dilución 1:1000. Los ensayos se realizaron por duplicado de manera independiente y las imágenes se analizaron con el software “Quantity One” (Bio-Rad).



8.2 Identificación de los tipos de secreción vesicular para la TvTIM en *T. vaginalis*.

Una vez determinadas las condiciones ambientales por las cuales se detecta la secreción de TvTIM en tricomonas, se seleccionaron solamente las condiciones de AG y RG. Además, dado que en el experimento previo se identificó a TvTIM en la fracción soluble de la secreción, quedaba la pregunta de si sólo se encuentra soluble o si se también se encuentra presente en material vesicular.

En primer lugar, los parásitos cultivados en RG y AG se analizaron por microscopía electrónica de barrido (MEB) y microscopía confocal para determinar si las distintas concentraciones de glucosa inducen la liberación de vesículas y si en algunas de éstas se encuentra TvTIM. Como se observa en la figura 9A, las micrografías electrónicas de barrido de los parásitos cultivados en RG presentan vesículas de entre 100-500 nm en su membrana (paneles a-e). Además, algunos parásitos presentan vesículas de 100-200 nm en el axostilo (paneles a, b y e). También se observan algunos parásitos con vesículas de ~200 nm en la base de los flagelos y en la membrana ondulante (panel b). En algunos de los parásitos también se observaron distintos poros en su superficie con diámetros de 100 nm (panel c), 300 nm (panel e) y 600 nm (panel a) a través de los cuales podría haber liberación de vesículas desde el interior del parásito.

En la figura 9B, se muestran las micrografías electrónicas de barrido de parásitos cultivados en AG, en los que se observan vesículas de más de 1 μm de diámetro (paneles a y d), vesículas de entre 100 y 200 nm en la base de los flagelos (panel c), la presencia de varias vesículas de entre 100-400 nm en la superficie del parásito (panel b), además de vesículas de 600 nm que parece estar en la punta de un pseudópodo del parásito (panel d). En dicha vesícula se observa a su vez la presencia de pequeñas vesículas de 100 nm en su membrana. Adicionalmente, en la membrana del parásito se detecta la presencia de poros de 600 nm (paneles b y e) donde se aprecian vesículas de 100 nm o menos en su interior, las cuales parecen estar a punto de liberarse

(panel e). Estos resultados muestran que los parásitos cultivados en ambas concentraciones de glucosa son capaces de liberar vesículas de entre 100-400 nm por vías de secreción no convencionales. Aunque sólo en la condición de AG es donde se observan vesículas de más de 500 nm liberándose de la membrana del parásito. Además, se observaron parásitos en las dos condiciones de glucosa con poros de diferentes diámetros en su membrana que probablemente utilice también para la liberación de vesículas extracelulares.

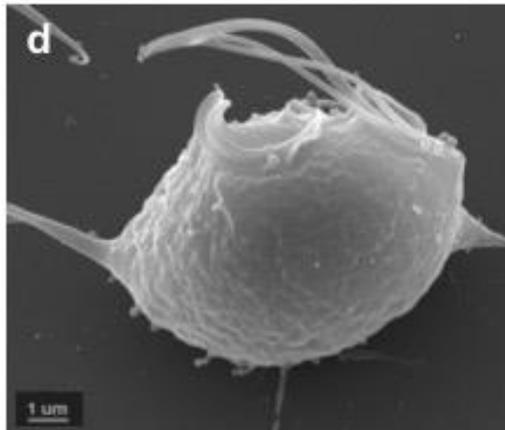
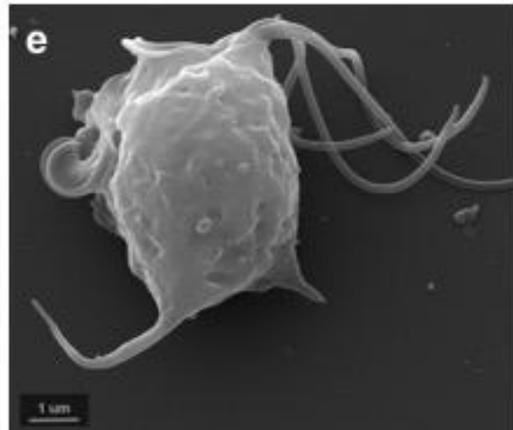
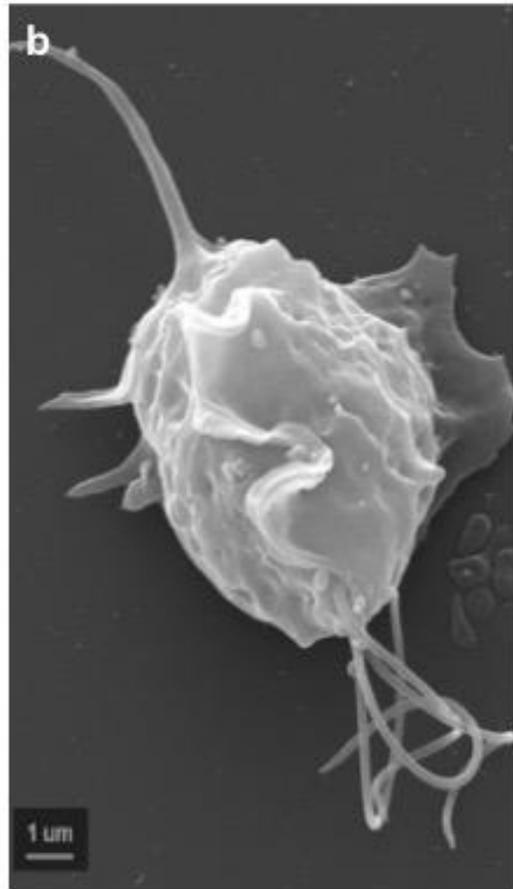
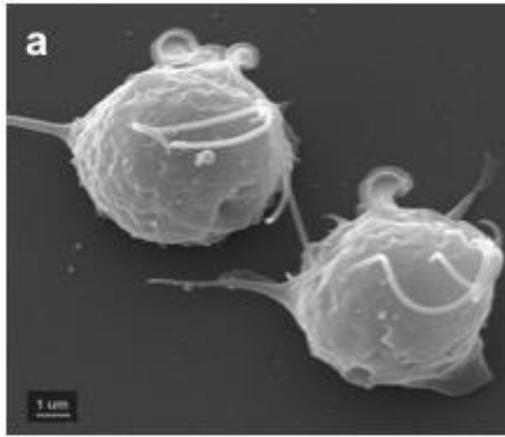
Ya que se determinó que en ambas concentraciones de glucosa *T. vaginalis* libera vesículas extracelulares por vías de secreción no convencionales (a través de los flagelos, del axostilo, de pseudópodos y de poros), lo siguiente fue determinar el tipo de vesículas que utiliza TvTIM durante la secreción. Por lo que se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo anti-TvTIMr en parásitos cultivados en RG y AG y se observaron por microscopía confocal. La Figura 10 muestra que los parásitos cultivados en RG presentan baja expresión de TvTIM (en verde) en el citoplasma y está ausente en la membrana del parásito (Fig. 10, paneles a-d). En cambio, en los parásitos cultivados en AG se observa la expresión y localización de TvTIM en el citoplasma (Fig. 10, paneles e-s). También se observa la formación de pseudópodos, los cuales en su terminación presentan vesículas en las que se detecta a TvTIM (Fig. 10, paneles i-l). Además, se observa a TvTIM de forma puntual en la membrana del parásito (Fig. 10, paneles m-s). Estos experimentos se repitieron en colaboración con Miranda-Ozuna ahora en presencia de DIL como marcador de membrana (Fig. 11), La Figura 11A (paneles a-o) muestra que en parásitos cultivados en AG TvTIM se detecta (en verde) en el citoplasma y formando vesículas en la membrana del parásito (Fig. 11, paneles a-d) y la señal colocaliza (en amarillo) con DIL (en rojo). También la colocalización de ambas marcas fluorescentes (TvTIM y DIL) se observa en vesículas liberadas de tamaño similar a las vesículas observadas por MEB en la membrana del parásito (Fig. 11, paneles e-h). Además, se detectan vesículas en la base de los flagelos (en amarillo) con colocalización

de la TvTIM con DIL (Fig. 11, paneles i-l). En los pseudópodos (Fig. 11, paneles m-o) se observa la presencia de TvTIM en vesículas formadas al final del pseudópodo que colocalizan con DIL. Estos resultados muestran que, aunque el parásito forma y libera vesículas de diferentes tipos y en diferentes formas tanto en RG como en AG; la expresión y localización de TvTIM en ciertos tipos de vesículas esta regulada positivamente por glucosa.

Figura 9. Microscopía electrónica de barrido (MEB) de *T. vaginalis* cultivada en RG y AG. (A) Micrografías de parásitos en RG, presencia en la membrana del parásito de vesículas entre 100-500 nm (paneles a-e) y de poros de entre 100 y 600 nm. **(B)** Micrografías de parásitos en AG con vesículas de entre 100 nm hasta 1 μ m en la membrana del parásito, en pseudópodos o ya liberadas cercanas al parásito (paneles a-e) y presencia de poros de entre 100-600 nm, los cuales también presentan vesículas en sus bordes. Los parásitos se fijaron con glutaraldehído al 2.5% y se observaron en un microscopio electrónico de barrido JEOL-JSM 7100 F.

A

RG



B

AG

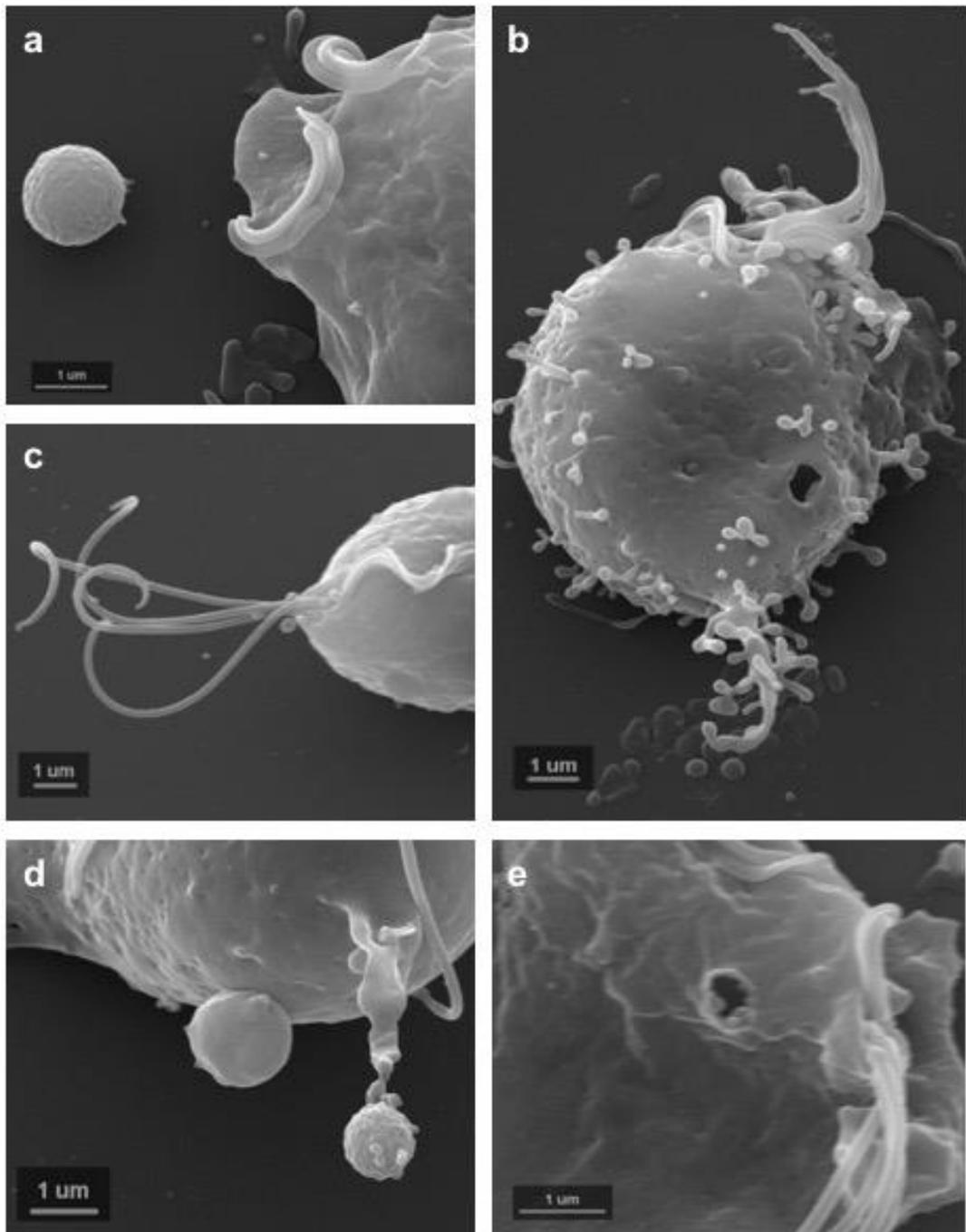


Fig. 10. Localización de la proteína TvTIM en *T. vaginalis*. Las imágenes de inmunofluorescencia indirecta muestran la localización de TvTIM en el citoplasma del parásito en condiciones de RG (paneles a-d) y de forma puntual en estructuras similares a vesículas en parásitos incubados en AG (paneles e-s) durante 45 min a 37 °C. Los parásitos se fijaron con formaldehído al 4% y se incubaron con un anticuerpo anti-TvTIMr (dilución 1:100), seguido de un anticuerpo secundario acoplado a FITC (dilución 1:100). La presencia de TvTIM se observa en color verde. Los núcleos se marcaron con DAPI (en azul).

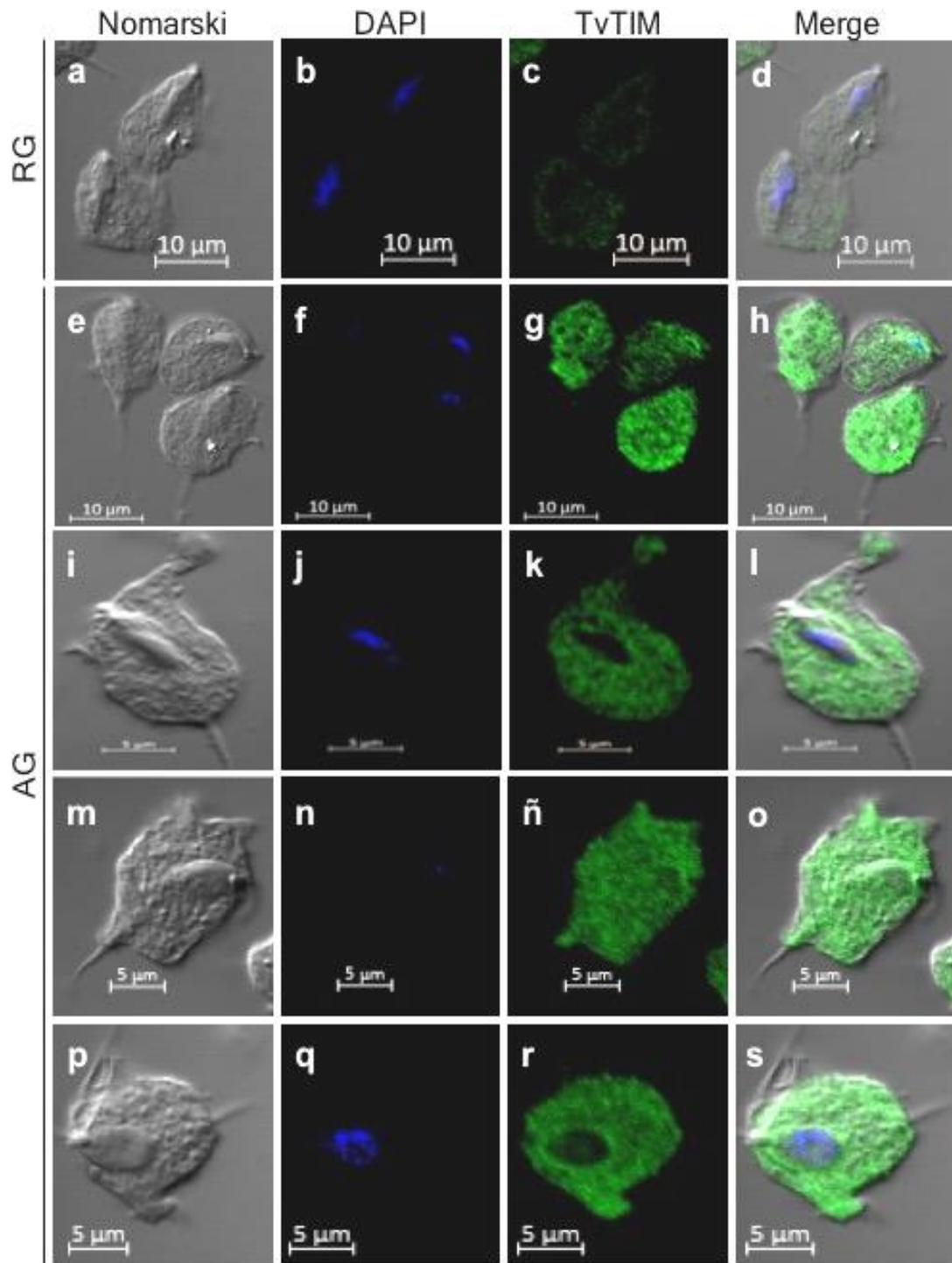
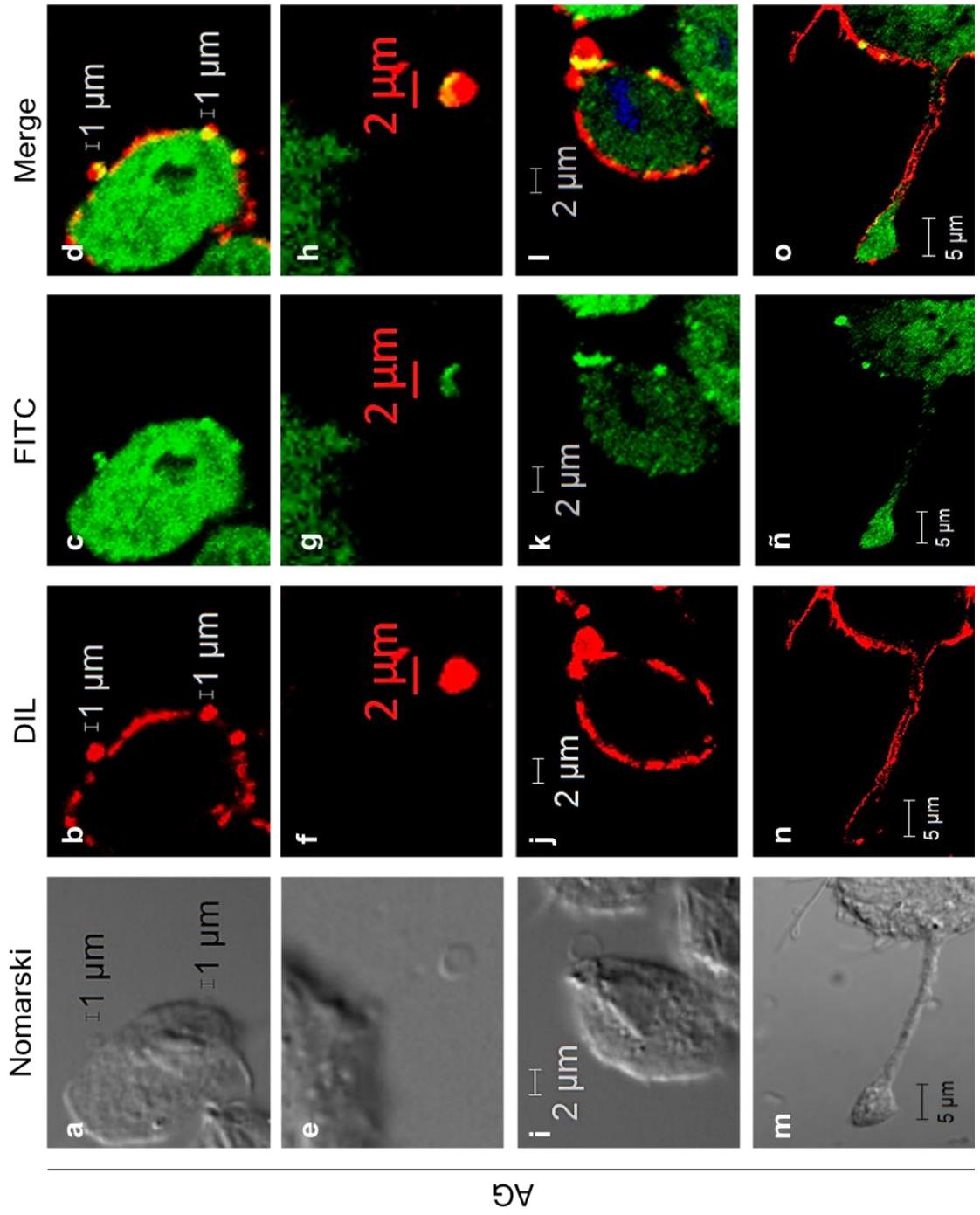


Fig. 11. Presencia de la TvTIM en la superficie y en vesículas de parásitos cultivados en AG. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta de parásitos cultivados en AG muestran a TvTIM marcada con FITC (en verde) en el citoplasma y de forma puntual en estructuras parecidas a vesículas, las cuales colocalizan con componentes de membrana (en amarillo). Los parásitos se fijaron con formaldehído al 4% y se incubaron con un anticuerpo anti-TvTIMr (dilución 1:100), seguido de un anticuerpo secundario acoplado a FITC (dilución 1:100) para observar a TvTIM en verde. La membrana de los parásitos se marcó con DIL (dilución 1:1000, en rojo). El ensayo se realizó en colaboración con JFT Miranda-Ozuna.



8.3 Interacción de *T. vaginalis* con células HeLa en RG y AG.

Con los resultados previos se confirmó que *T. vaginalis* secreta a la proteína TvTIM en AG tanto en forma soluble como en vesículas, principalmente. Por lo que la siguiente pregunta a responder es si es posible lograr la internalización de TvTIM (proveniente de parásitos en AG o RG) en células HeLa utilizadas como modelo *in vitro* que permita reproducir el fenómeno observado *in vivo*. Las células epiteliales vaginales de pacientes con *T. vaginalis* muestran señal de TvTIM de tricomonas en membrana, en citoplasma, perinuclear y nuclear. Lo que permitirá en un futuro estudiar el efecto de la presencia de TvTIM en la célula hospedera.

Para probarlo se utilizaron dos estrategias. Primero, se realizó la interacción de *T. vaginalis* cultivada en AG y RG con monocapas de células HeLa en relación 1:5 células-parásitos, por 45 min para evitar la destrucción total de las monocapas celulares y se buscó a TvTIM. Estas interacciones se analizaron por MEB y por inmunofluorescencia indirecta. En la Figura 12A se muestran las micrografías de MEB de la interacción de Tv con células HeLa en RG (paneles a-e) y los controles de las células HeLa y de parásitos crecidos en RG (Fig. 12, paneles a y b). Los parásitos que interaccionaron con células HeLa presentan en su superficie vesículas similares a las previamente observadas en los parásitos solos (Fig. 12A, paneles c-e). También, se observa la presencia de poros de 600 nm en la superficie de algunos parásitos (Fig. 12A, paneles c y d), cerca de los cuales se observan algunas vesículas de entre 200-300 nm. Este tipo de vesículas también se vieron en la superficie de las células HeLa. Adicionalmente, las células epiteliales ya no se observan en monocapa y presentan “blebbing”.

En la Figura 12B se muestra la interacción de parásitos en AG con monocapas de células HeLa y los controles de células HeLa y parásitos sin interaccionar (Fig. 12B, paneles a-b). En los parásitos que interaccionaron con células HeLa (Fig. 12B, panel c-e) también se observan vesículas de entre 200-500 nm de diámetro en la superficie del parásito, además de poros en las membranas del

parásito, los cuales tienen un diámetro de entre 200-500 nm. Interesantemente, también se observa que en las células HeLa al estar en contacto con el parásito se inducen alargamientos tipo filamentos, los cuales están en contacto directo con el parásito (Fig. 12B, panel c y d), posiblemente para sujetarlo o atraparlo. Las células presentan “blebbing”, además de que se observó destrucción de la monocapa igual que en la condición de RG.

Estos resultados muestran que en contacto con las células HeLa el parásito libera diferentes tipos de vesículas.

La siguiente pregunta por responder es ¿Dónde quedó TvTIM durante la interacción? Para responderla se hicieron ensayos de inmunofluorescencia indirecta de un duplicado de los ensayos de interacción de tricomonas con monocapas de células HeLa para detectar la localización de TvTIM durante la interacción. Como control negativo se usaron monocapas de células HeLa sin interaccionar e incubadas con el anticuerpo anti-TvTIM. Los resultados muestran que no hay señal verde fluorescente debido a que el anticuerpo anti-TvTIM no cruza con la TIM de humano (Fig. 13A, paneles a-d) y una señal muy débil de TvTIM en parásitos cultivados en RG (Fig. 10). En condiciones de RG (Fig. 13B, paneles a-e) se observa nuevamente la destrucción parcial de la monocapa. Sin embargo, después de 45 min de interacción el parásito presenta un incremento en la señal de la proteína TvTIM (posiblemente debido a la glucosa proporcionada por las células HeLa que destruyó tricomonas), comparado con la señal del control (Fig. 10). Además, algunas de las células HeLa presentan señal de la proteína TvTIM en su interior (Fig. 13B, panel e). Al hacer el análisis estadístico de la frecuencia de este fenómeno, se aprecia que en ~45% de las células HeLa que interaccionaron con parásitos en condiciones de RG por 45 min se detecta a la proteína TvTIM (Fig. 13D; Tabla 1).

En cambio, en la interacción de Tv con células HeLa en AG, se observa que los parásitos mantienen los niveles altos de fluorescencia de TvTIM (Fig. 13C, paneles a-e) observados en los parásitos sin interaccionar usados como control (Fig. 10). Además, después de la interacción con tricomonas se puede

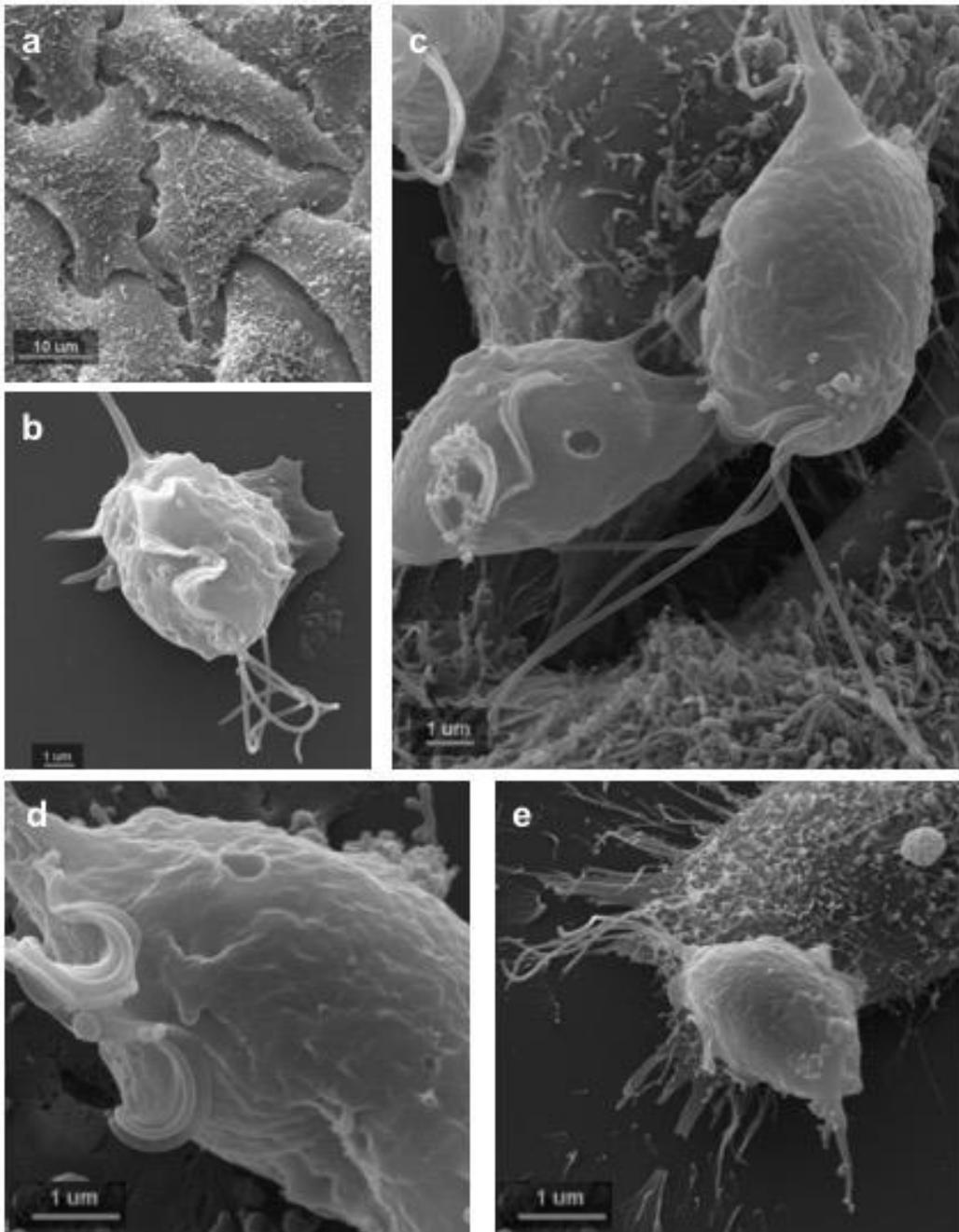
detectar la presencia de TvTIM en el interior de las células HeLa (Fig. 13C, panel e). Mediante el análisis estadístico de la frecuencia de este fenómeno se determinó que en ~82% de las células HeLa se detecta señal de TvTIM en su interior (Fig. 13D; Tabla 1). La diferencia de la presencia de TvTIM en el interior de las células HeLa entre parásitos cultivados en condiciones de RG y AG fue significativa ($P < 0.05$).

Estos resultados muestran que se logró reproducir el efecto observado *in vivo* en las células de pacientes con tricomoniasis. También se determinó que en las dos condiciones de glucosa (RG y AG) se puede observar la presencia de TvTIM en el interior de algunas de las células HeLa, particularmente en AG ya que se observa un mayor número de células HeLa con señal de TvTIM en su interior.

Fig. 12. Micrografías de MEB de las interacciones de *T. vaginalis* con células HeLa en diferentes concentraciones de glucosa (RG y AG). (A) Imágenes de MEB de la interacción de parásitos con células HeLa en RG (paneles c-e). Como controles se utilizaron monocapas de células HeLa y parásitos en RG (paneles a y b) antes de la interacción. Durante las interacciones se observó la presencia de vesículas y formación de poros en la membrana del parásito. **(B)** Imágenes de MEB de la interacción de parásitos con células HeLa en AG (paneles c-e). Como controles se utilizaron monocapas de células HeLa y parásitos en AG (paneles a y b). Durante las interacciones se observó la presencia de vesículas y la formación de poros en la membrana del parásito. Las imágenes muestran cambios en las células HeLa, al presentar “blebbing” y alargamiento de filopodios. Para ambas condiciones la interacción se realizó por 45 min a 37 °C en relación 1:5 células-parásitos, posteriormente se fijaron con glutaraldehído al 2.5% y se observaron en un microscopio electrónico de barrido JEOL-JSM 7100 F.

A

RG



B

AG

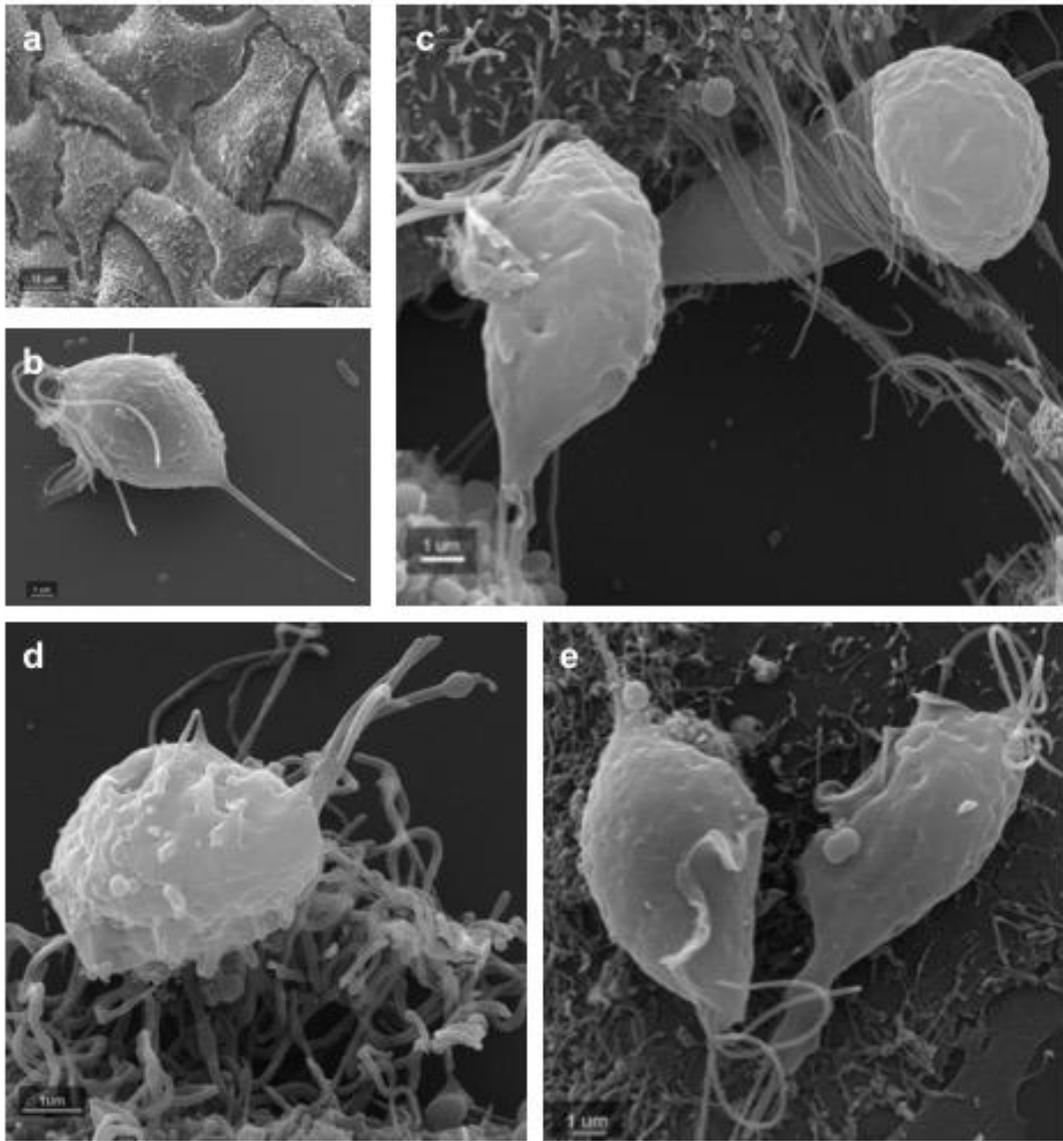
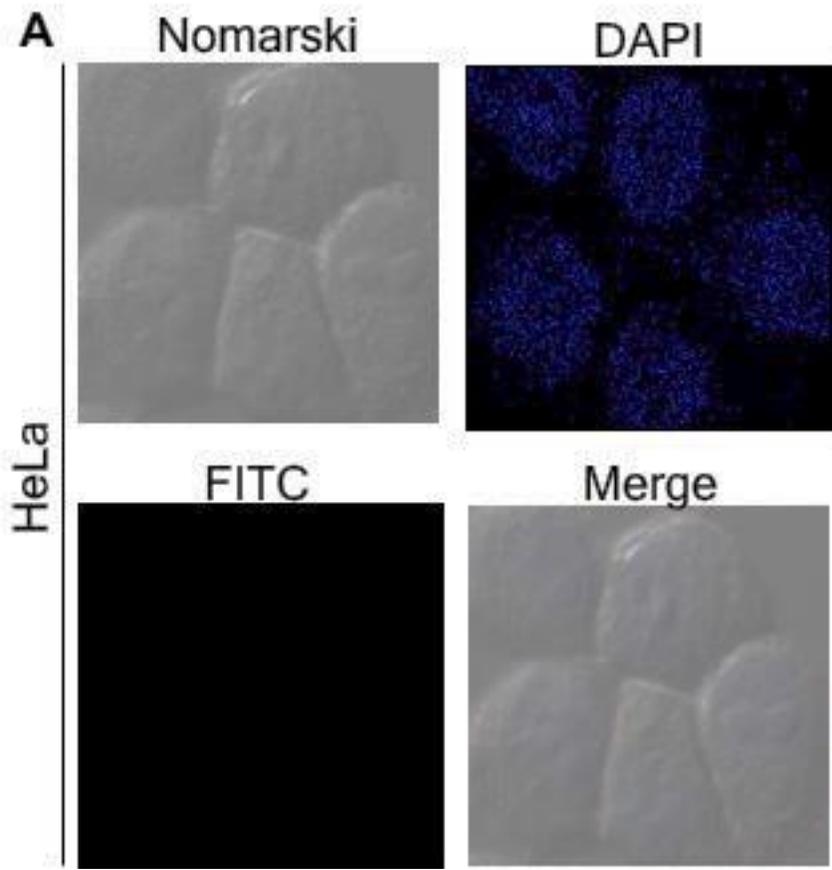
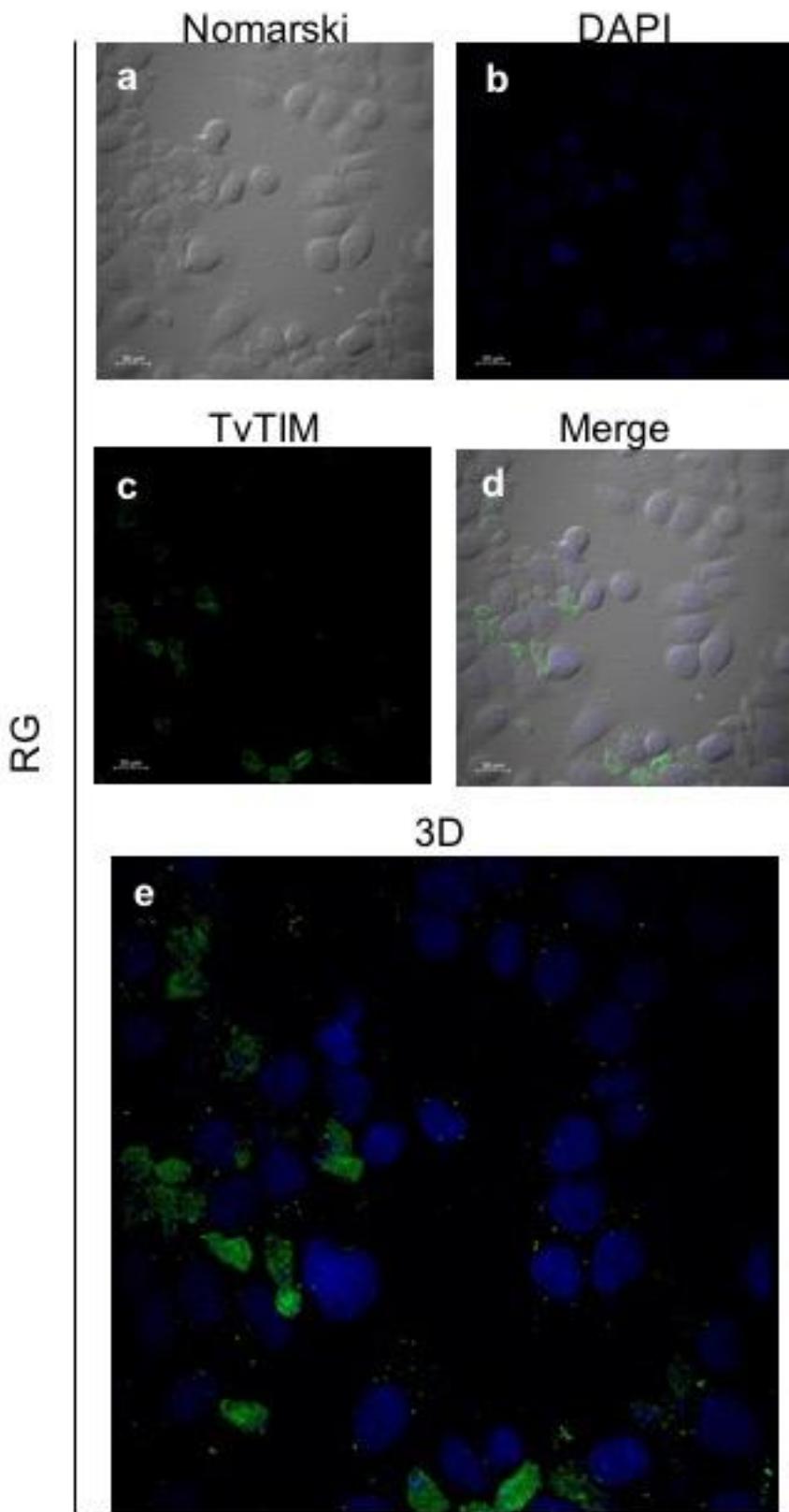


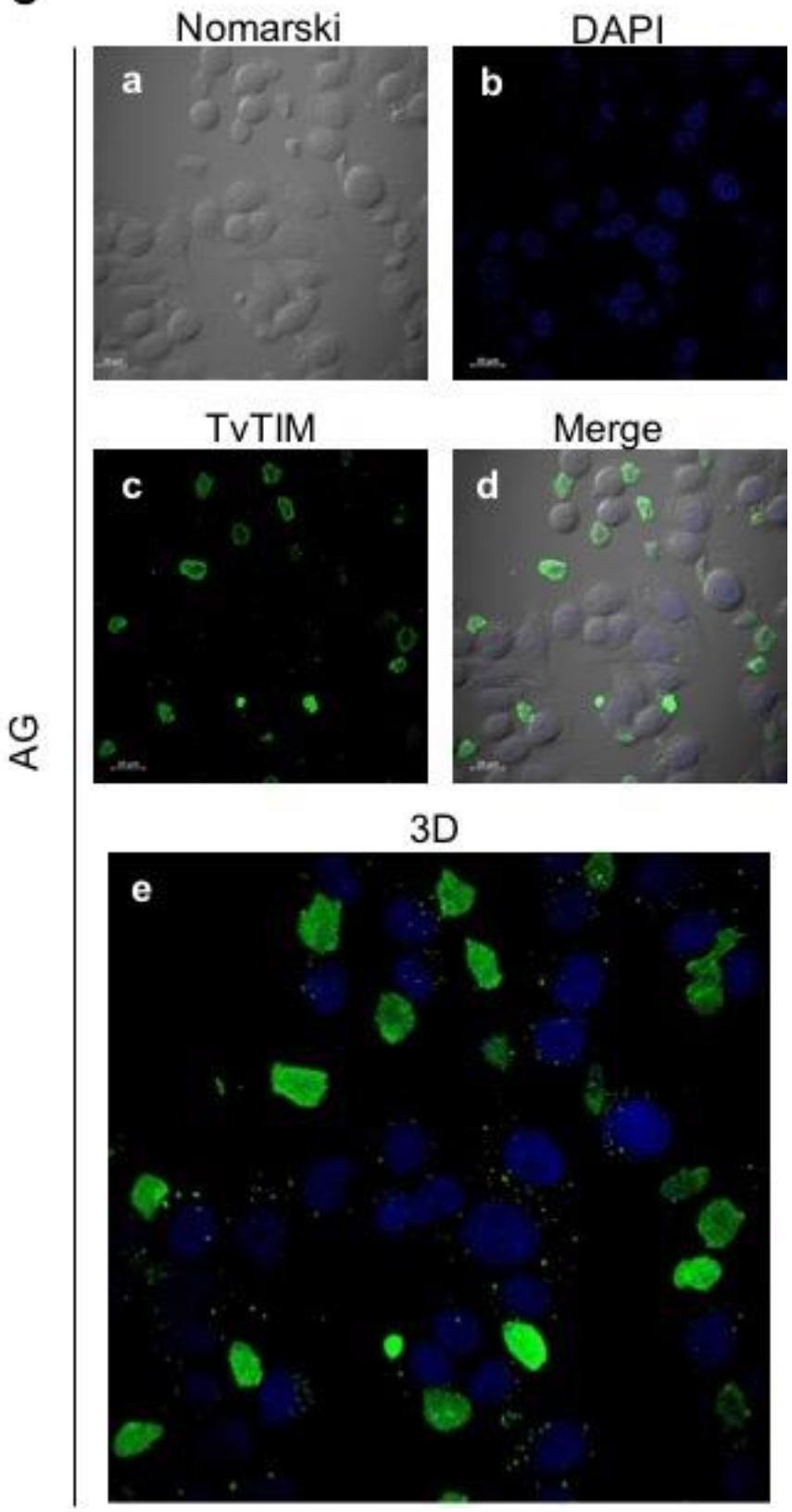
Fig. 13. Efecto de la glucosa en la localización de TvTIM durante la interacción de parásitos con células HeLa. (A) IFI de Control de monocapa de células HeLa antes de la interacción e incubada con el anticuerpo anti-TvTIM. **(B)** Interacción de parásitos con monocapas de células HeLa en RG (paneles a-e), Destrucción parcial de la monocapa (panel a), incubadas con el anticuerpo anti-TvTIM (panel e). **(C)** Interacción de parásitos con células HeLa en AG e incubadas con el anticuerpo anti-TvTIM para detectar la presencia de TvTIM por inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal. Para ambas condiciones la interacción se realizó por 45 min a 37 °C en relación 1:5 células-parásitos, las interacciones se fijaron con formaldehído al 4% y se incubaron con el anticuerpo anti-TvTIMr (dilución 1:100), seguido de un anticuerpo secundario acoplado a FITC (dilución 1:100) para observar a TvTIM en verde. **(D)** Análisis estadístico de la presencia de la TvTIM en células HeLa posterior a la interacción con parásitos en condiciones de RG y AG. Las barras de error indican la desviación estándar (SD) de tres experimentos independientes. Las diferencias fueron significativas ($p < 0.05$) mostradas en asteriscos (**), determinada por el método estadístico ANOVA.



B



C



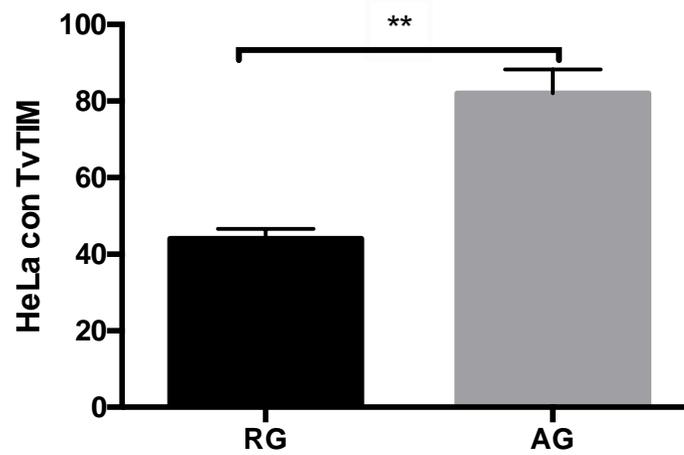
D

Tabla 1. Localización de la proteína TvTIM en células HeLa después de la interacción con parásitos en RG o AG.

Condición	RG				AG			
	1	2	3	\bar{X}	1	2	3	\bar{X}
Células con TvTIM	45	41	46	44 ± 2.64	87	75	84	82 ± 6.24
Células sin TvTIM	55	59	54	56 ± 2.64	13	25	16	18 ± 6.24
Total	100				100			

8.4 Obtención de vesículas secretadas por *T. vaginalis*.

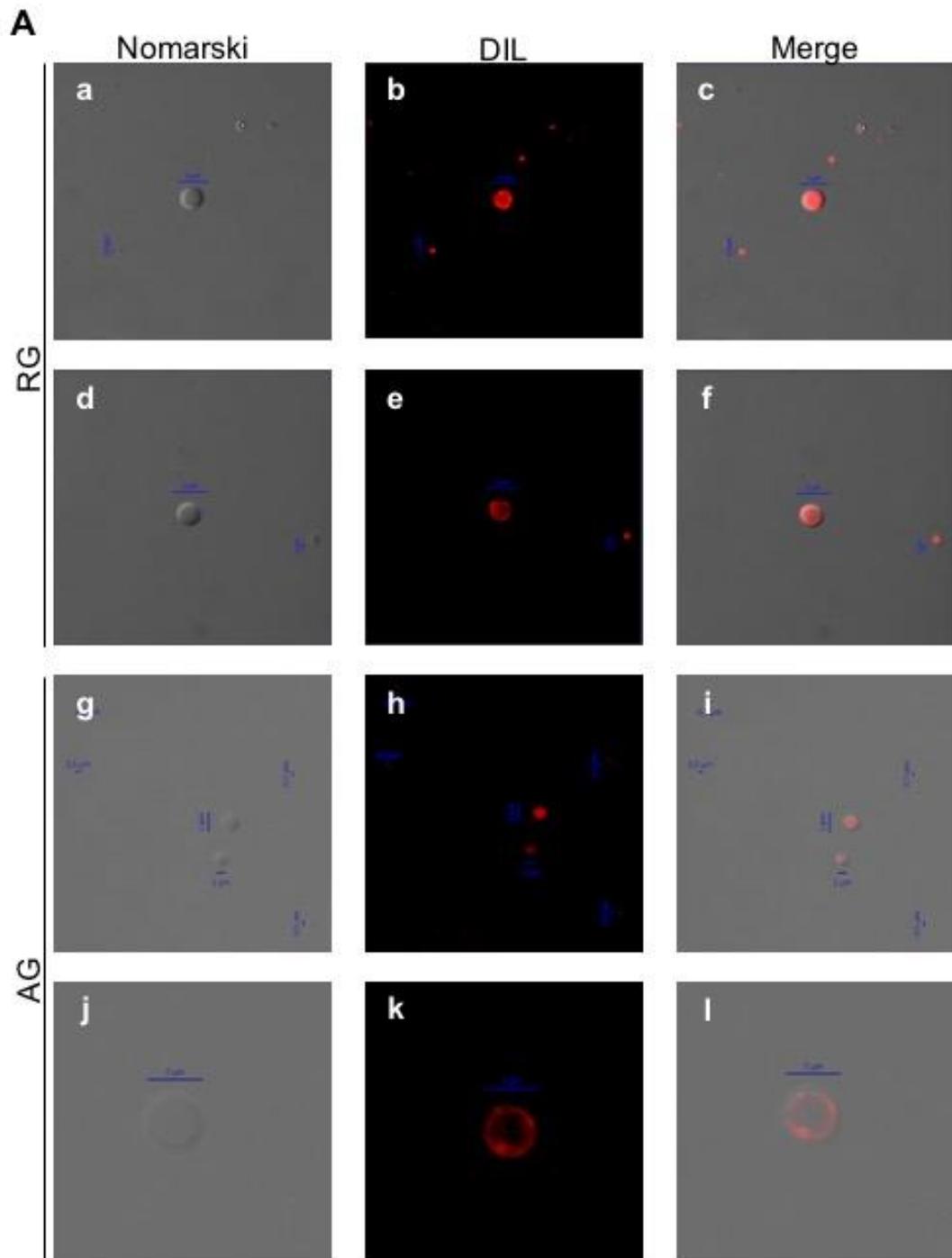
Con los resultados obtenidos hasta el momento se sabe que es posible reproducir *in vitro* el efecto observado en las células de pacientes con tricomoniasis al observar a la proteína TvTIM en el interior de células HeLa interaccionadas por 45 min con *T. vaginalis*. Por lo que surge la duda de si para la internalización de dicha proteína es necesario el contacto directo del parásito con la célula o si por medio solamente de vesículas secretadas por el parásito es posible reproducir dicho efecto.

De ahí que el siguiente objetivo fue la obtención de vesículas extracelulares secretadas por el parásito y caracterizarlas morfológicamente. Parásitos cultivados en AG y RG se pusieron a secretar *in vitro* por 1 h a 37 °C. El producto de secreción se procesó mediante centrifugación diferencial para empastillar las vesículas secretadas en diferentes concentraciones de glucosa. Las vesículas obtenidas se analizaron por ensayos de microscopía de fluorescencia y microscopía electrónica de transmisión para observar, analizar, comparar y clasificar los distintos tipos de vesículas secretadas por tricomonas en AG y RG (Fig. 14). Por fluorescencia con DIL en RG las vesículas teñidas con DIL (color rojo) presentaron diámetros desde 500 nm hasta 5 μ m (Fig. 14A, panel a-f). En AG se observaron también vesículas de los mismos tamaños (Fig.14A, paneles g-l). Por lo que al no observar diferencias entre las vesículas en este tipo de microscopía se realizó el análisis de ultraestructura por microscopía electrónica de transmisión (MET). Por MET se observa que en RG (Fig. 14B, paneles a y c) el parásito secreta vesículas de gran tamaño (≥ 1000 nm), las cuales no son electrondensas en su interior. También se observan vesículas de entre 100-500 nm, las cuales presentan en su interior material granular electrondenso. En AG (Fig. 14B, paneles b y d) se puede observar una gran cantidad de vesículas electrondensas y no electrondensas de entre 100-500 nm, así como vesículas no electrondensas de casi 1 μ m de diámetro, las cuales tienen una membrana bien definida. Además, se observan en ambas condiciones de glucosa la presencia de vesículas que en su interior contienen otras vesículas de menor tamaño que

pueden ser o no electrondensas y que podrían corresponder a cuerpos multivesiculares.

En la tabla 2 se observa el análisis comparativo de los distintos tipos de vesículas presentes en las secreciones de parásitos en RG o AG. En las secreciones de parásitos en AG hay mayor variedad en el tipo de vesículas secretadas; sin embargo, las características entre los tipos de vesículas secretadas presentan ciertas coincidencias. Con estos resultados se corrobora lo observado en los resultados anteriores respecto a que en AG y RG el parásito es capaz de liberar distintos tipos de vesículas, siendo la condición de AG la que induce una aparente mayor secreción de vesículas de tamaño que varía entre ≤ 100 nm- 1μ m.

Fig.14. Tipos de vesículas secretadas por *T. vaginalis* en RG y AG. (A) Imágenes del ensayo de fluorescencia de vesículas entre 0.5-5 μm de diámetro en RG (paneles a-f) y en AG (paneles g-l teñidas con DIL en dilución 1:1000. **(B)** Imágenes de ultraestructura de las vesículas obtenidas por centrifugación diferencial. En los paneles a y c se observan las vesículas secretadas en RG, con tamaños entre 100 nm hasta 2 μm de diámetro. Las vesículas en AG (paneles b y d) presentan tamaños de ≤ 100 nm-1 μm de diámetro. En ambas condiciones se observan vesículas con contenido granular y electrondensas, además de vesículas que en su interior presentan vesículas de tamaño y contenido variable. Para los dos ensayos las vesículas se obtuvieron de parásitos en secreción *in vitro* por 1 h a 37°C.



B

RG

AG

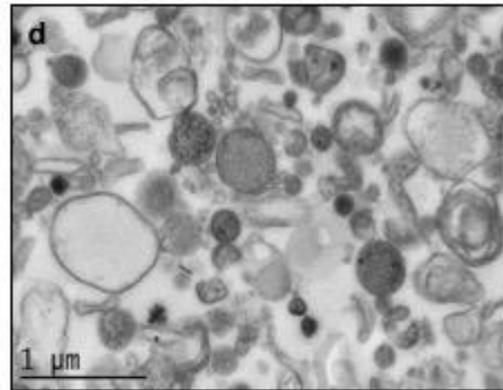
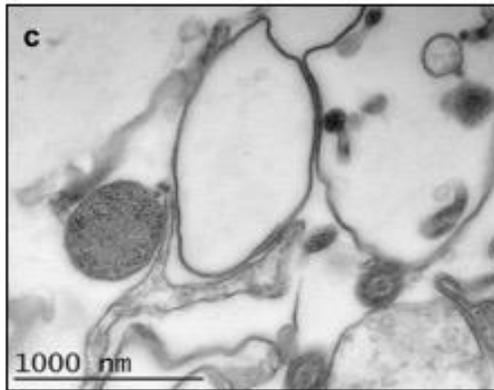
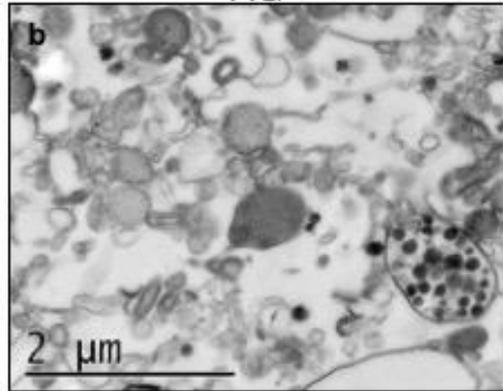
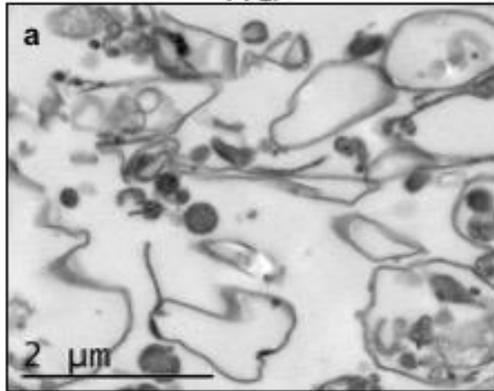
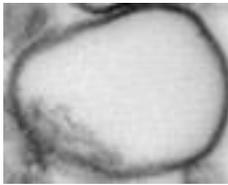
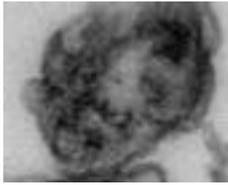
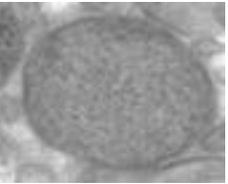
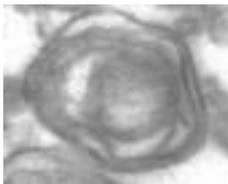
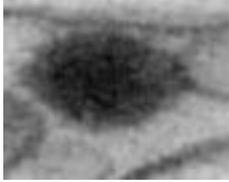
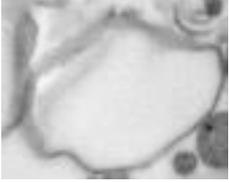
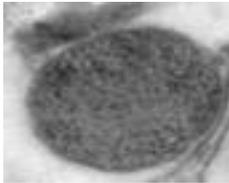
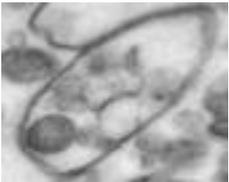
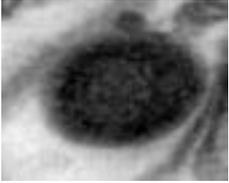


Tabla 2. Tipos de vesículas secretadas por *T. vaginalis* cultivado en AG y RG.

Condición	Características	Vesícula
AG	<ul style="list-style-type: none"> ·Vesículas de entre 200-500 nm. ·Presenta membrana bien definida. ·En su interior presenta un poco de material granular. 	
	<ul style="list-style-type: none"> ·Vesículas de 200-300 nm. ·Presenta membrana. ·En su interior lleva material granular. 	
	<ul style="list-style-type: none"> ·Vesículas de entre 100-500 nm. ·Presentan membrana. ·Interior granular electrodensso. 	
	<ul style="list-style-type: none"> ·Vesículas de entre 500 nm a 1 µm. ·Presentan doble membrana. ·En su interior presenta más vesículas con membrana similar, algunas interiores electrodensas. 	
	<ul style="list-style-type: none"> ·Vesículas de <100 nm. ·Presentan membrana definida. ·Su interior es ligeramente electrodensso. 	

	<ul style="list-style-type: none"> ·Vesículas de 100 nm. ·No se observa membrana. ·Interior totalmente electrodensso. 	
RG	<ul style="list-style-type: none"> ·Vesículas de 1-2 μm de diámetro. ·Presentan membrana. ·Interior con un poco de material granular. 	
	<ul style="list-style-type: none"> ·Vesículas de entre 100-500 nm ·Presentan membrana. ·Interior granuloso electrodensso. 	
	<ul style="list-style-type: none"> ·Vesículas de 1 μm de diámetro. ·Presentan membrana. ·En su interior presentan distintos tipos de vesículas de menor tamaño. 	
	<ul style="list-style-type: none"> ·Vesículas de $\leq 100-200$ nm. ·Presentan membrana. ·Interior totalmente electrodensso. 	

8.5 Detección de TvTIM en las vesículas secretadas por *T. vaginalis* en RG y AG.

Una vez estandarizada la metodología para la obtención de vesículas y al observar la gran variedad de vesículas presentes en las secreciones se procedió a la identificación de TvTIM en dichas vesículas. Debido a los resultados anteriores se trabajó solamente con vesículas obtenidas de parásitos en AG. Primeramente, se realizó un ensayo de WB (Fig. 15A), como controles se usó el extracto de proteínas totales (PT) de parásitos cultivados en AG (Fig. 15A, carril 1). También se incluyeron las proteínas de la fracción soluble de las secreciones en AG (Fig. 15A, línea 2). En ambos controles se detectó una banda de 27 kDa la cual corresponde a TvTIM. En el carril 3 se muestran las proteínas contenidas en las vesículas secretadas en AG, en la que se detectó a la proteína TvTIM. Sin embargo, en el sobrenadante de las vesículas (carril 4) no se detectó señal de TvTIM.

Posteriormente, una pastilla de vesículas se utilizó para ensayos de inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo anti-TvTIMr. En la Figura 15B se observaron vesículas de entre 2-5 μm las cuales presentaban marca de TvTIM en su interior y en la membrana que muestra colocalización (en amarillo) con DIL (Fig. 15B). Lo que significa que la proteína se encuentra tanto en el interior como en la membrana de las vesículas TvTIM (+). Para corroborar este resultado, se realizaron ensayos de inmunolocalización con oro por (MET) con el anticuerpo anti-TvTIMr y vesículas de secreción obtenidas de parásitos en AG. En la Figura 15C se muestran los controles: negativo de vesículas en AG incubadas solo con el anticuerpo secundario (Fig. 15C, paneles a-b), positivo de vesículas que presentan el inmunomarcaje con partículas de oro de la localización de TvCP4, proteína que se secreta en AG (Fig. 15C, paneles c-d), la cual se encuentra en el interior de vesículas granulares electrondensas. En los paneles c-j observamos el inmunomarcaje con partículas de oro de TvTIM, localizada principalmente en la membrana de vesículas de entre 200-600 nm (paneles e, f, h, i, j). También se detectó a TvTIM en el interior de algunas de estas vesículas (panel e y g). Estas vesículas presentan

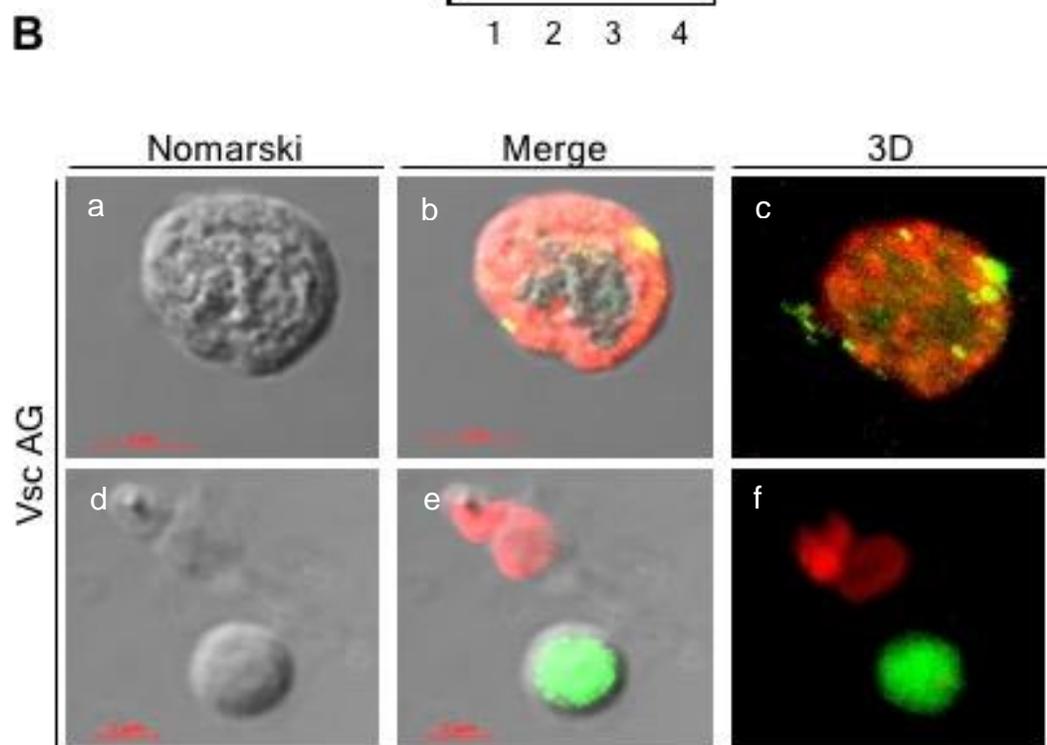
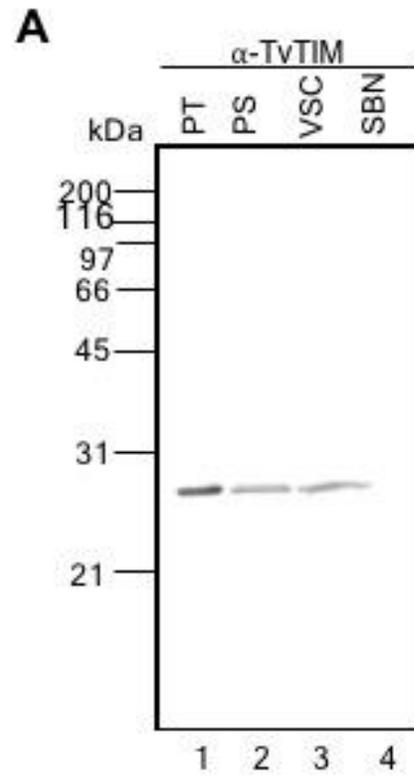
generalmente una membrana y contenido granular en su interior. Estos datos sugieren que TvTIM se encuentra principalmente en la membrana de vesículas secretadas, aunque también en su interior, además de estar presentes en distintos tipos de vesículas con tamaños diversos.

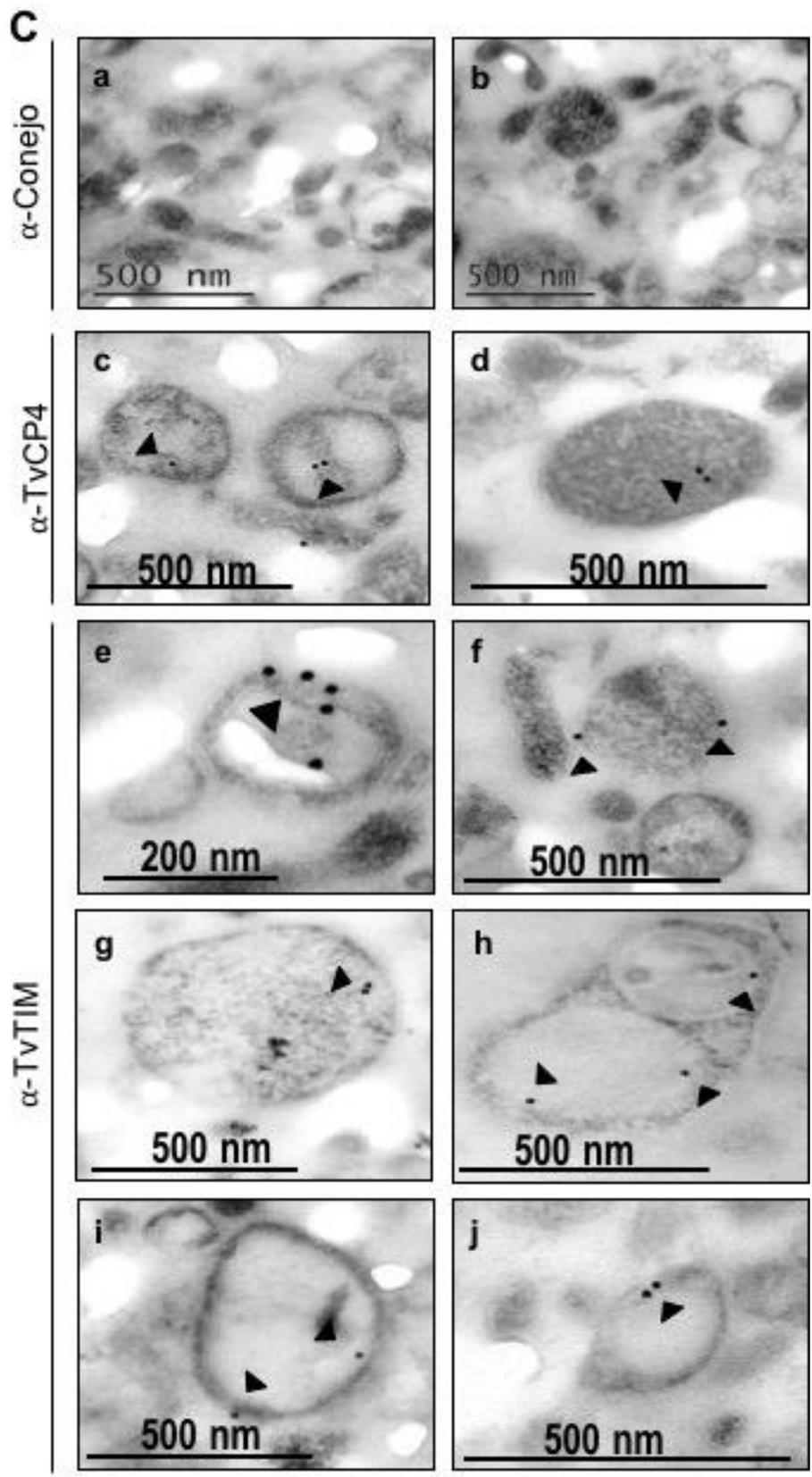
Fig. 15. Localización de la TvTIM en distintos tipos de vesículas en AG.

(A) Ensayo de WB vesículas en extractos de proteínas totales (línea 1), proteínas de productos completos de secreción (línea 2), vesículas (línea 3), y sobrenadante de las vesículas (línea 4); en las primeras tres líneas se observa el reconocimiento de una banda en la región de 27 kDa correspondiente a TvTIM, mientras que en el sobrenadante de las vesículas no se observa reconocimiento alguno. El anticuerpo se utilizó en dilución 1:1000 y se reveló por quimioluminiscencia. Es necesario realizar los duplicados de dicho estudio.

(B) Imágenes de inmunofluorescencia indirecta donde se localiza a la TvTIM (en verde) en la membrana y el interior de vesículas de hasta 5 μm , al estar presente en la membrana se observa una colocalización con DIL (en amarillo). El anticuerpo se utilizó a una dilución de 1:100, mientras que el DIL se usó en dilución 1:1000.

(C) Inmunomarcaje de vesículas en AG incubados con el anticuerpo anti-TvTIMr (1:15) y un anticuerpo secundario conjugado a partículas de oro. Las vesículas se analizaron por MET.





8.6 Interacción de las vesículas con células HeLa

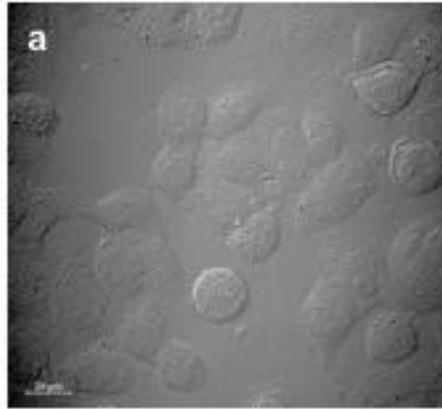
Una vez determinado el tipo de vesículas que contienen a TvTIM proveniente de secreciones de tricomonas en AG, se realizó el ensayo de interacción entre vesículas y monocapas de células HeLa para determinar si para que se internalice TvTIM durante la interacción es necesario el contacto directo de parásitos vivos o solamente con las vesículas se puede recrear lo observado en las células epiteliales vaginales de pacientes con tricomoniasis.

Monocapas de células HeLa se interaccionaron con vesículas de parásitos en AG, previamente teñidas con DIL, durante 45 min a 37 °C. Posteriormente, se fijaron con formaldehído al 4% y se incubaron con el anticuerpo anti-TvTIMr (dilución 1:100) y con un anticuerpo secundario acoplado a FITC para detectar a TvTIM en verde. Como se observa en la figura 16A, la monocapa de células HeLa presenta cambios morfológicos en algunas de las células posterior a la interacción (Fig. 16A, panel a), se observan ligeramente más redondeadas. En rojo se detectan a las vesículas (rojo), algunas de las cuales presentan colocalización con TvTIM (en amarillo). Al observar la proyección máxima en 3D (Fig. 16A, panel f) se puede apreciar como las vesículas se encuentran en las células HeLa. Además, se detecta a TvTIM no sólo en las vesículas, sino también internalizadas en algunas células HeLa. En la Figura 16B se muestran acercamientos de distintos cortes de las células, donde se aprecia a TvTIM cercana a la membrana (Fig. 16B, paneles a-c), en el citoplasma y en el núcleo (Fig. 16B, paneles d-f), además, de la presencia de vesículas las cuales contienen a TvTIM (Fig. 16B, paneles a-c, g-i). Con este resultado se infiere que no es necesario el contacto directo con parásitos vivos para que suceda la internalización de la TvTIM, pues sólo con la interacción con vesículas que la contienen se pudo observar dicho efecto, además de observar que el contacto con las vesículas induce ciertos cambios morfológicos en las células HeLa.

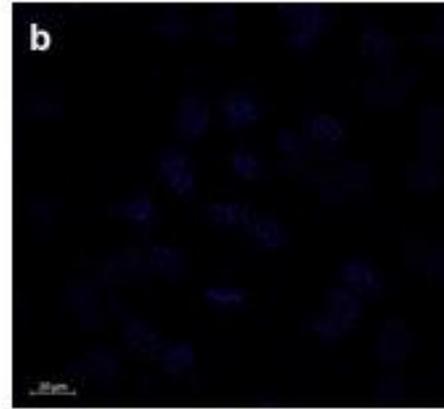
Fig. 16. Detección de TvTIM después de la interacción entre vesículas extracelulares de parásitos cultivados en AG y monocapas de células HeLa. (A) Imágenes de inmunofluorescencia indirecta de la interacción entre vesículas de parásitos en AG y monocapas de células HeLa. Previa a la interacción, las vesículas se tiñeron con DIL (en rojo, dilución 1:1000), posteriormente se interaccionaron por 45 min a 37 °C y se fijaron con formaldehído al 4%, se incubaron con el anticuerpo anti-TvTIMr y el anticuerpo secundario acoplado a FITC, para observar a TvTIM (en verde) (ambos Acs en dilución 1:100). Núcleos teñidos con DAPI (en azul). **(B)** Acercamiento de distintos cortes consecutivos para mostrar la localización de TvTIM en vesículas y su posible colocalización con DIL (en amarillo) cercana a la membrana, en el citoplasma y en el núcleo de las células HeLa, similar a lo observado en células vaginales de pacientes con tricomoniasis.

A

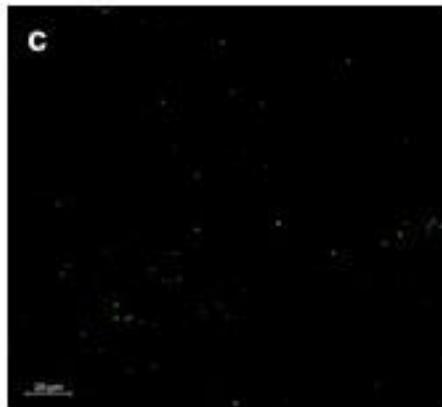
Nomarski



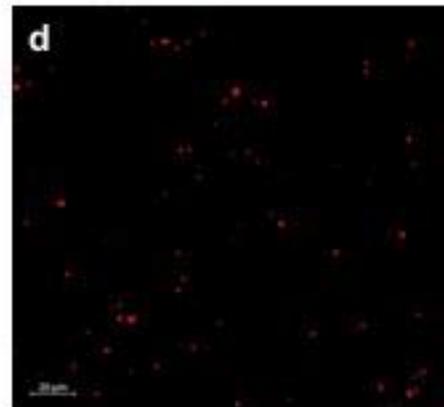
DAPI



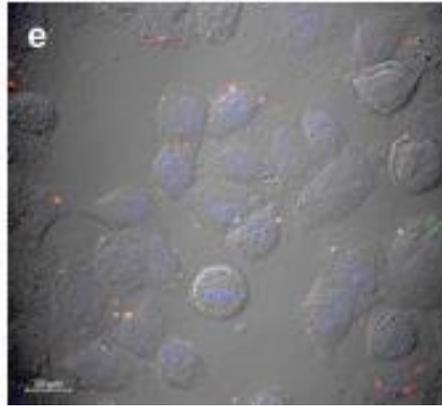
TvTIM



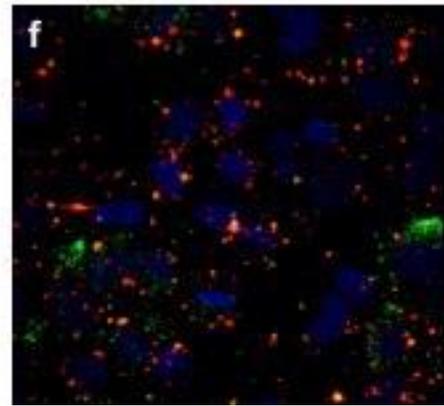
DIL



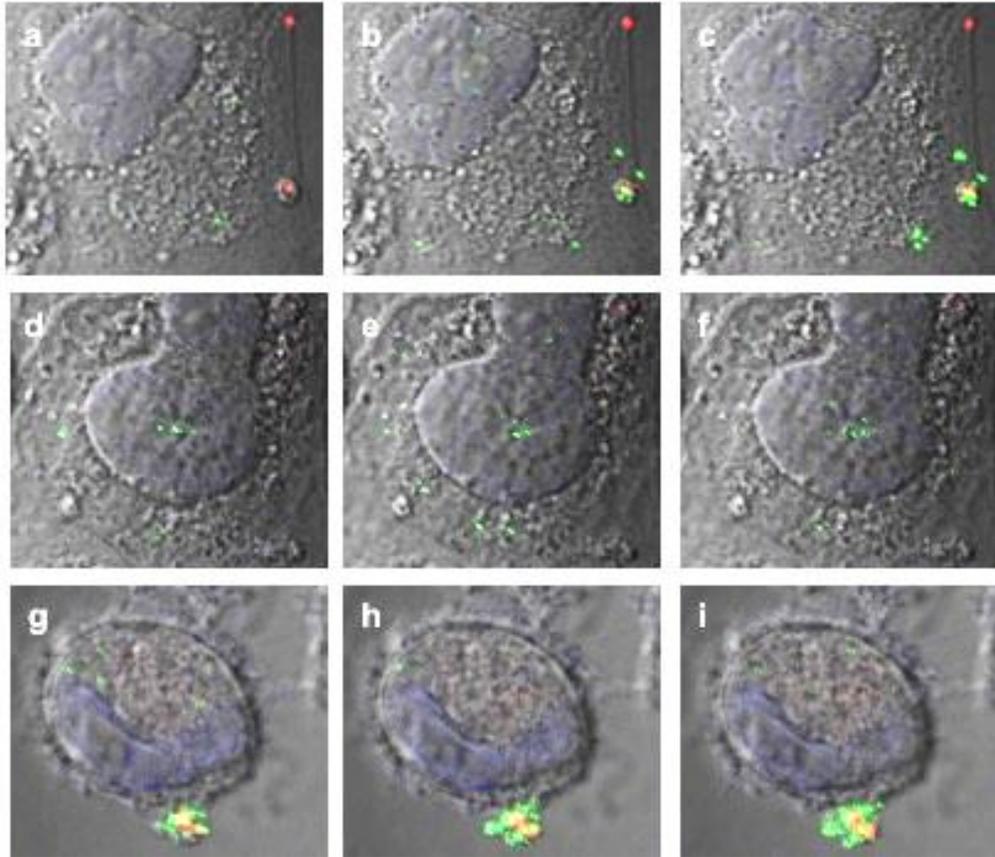
Merge



3D



B

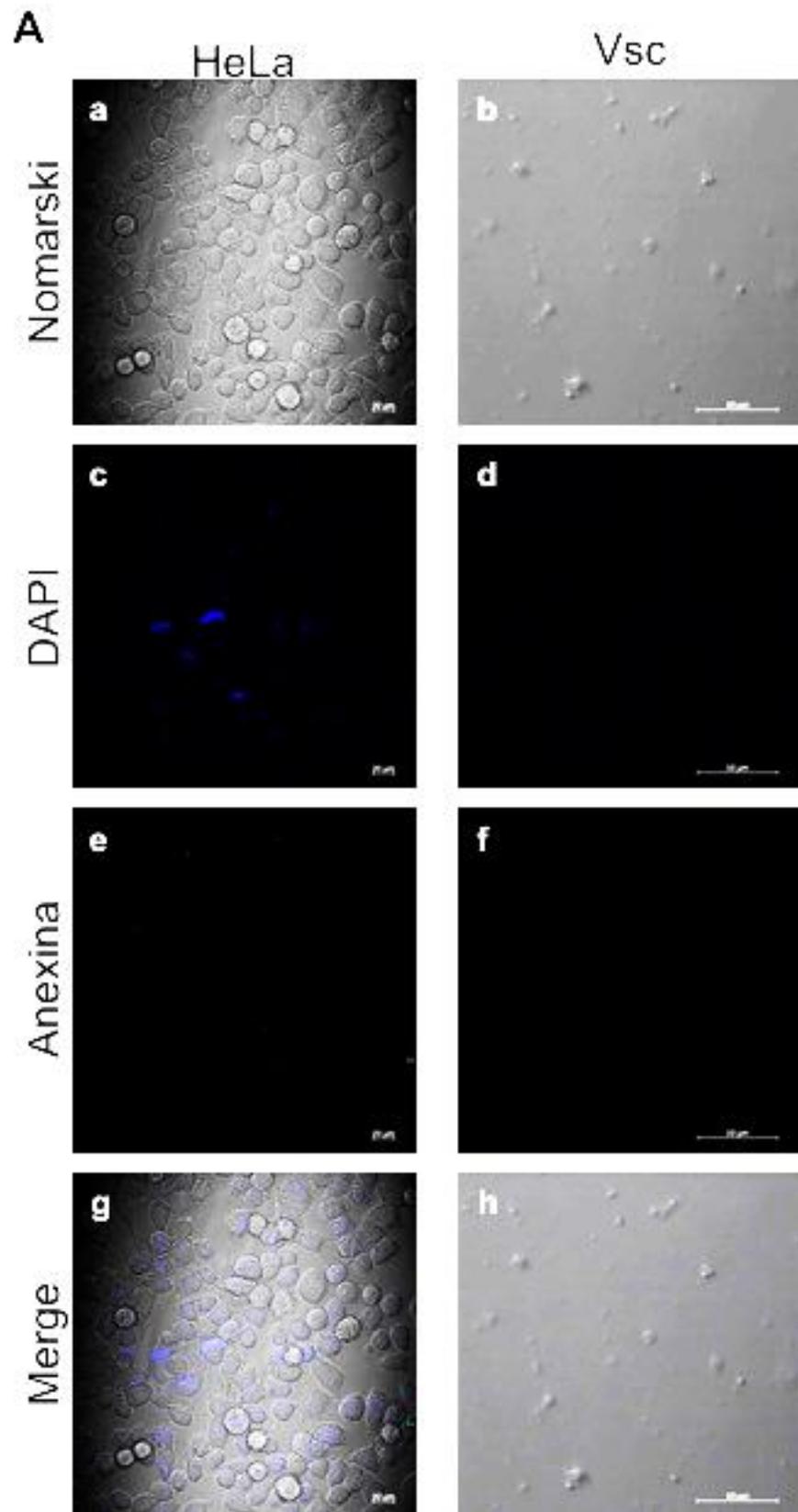


8.7 Efecto de las vesículas al interaccionar las células HeLa

Como se observó en la interacción de vesículas-células HeLa, la monocapa de células mostró cierto daño, ya que las células se redondearon al entrar en contacto con las vesículas y presentaron “blebbing”, por lo que la cuestión ahora fue determinar si las vesículas pueden inducir apoptosis a las células HeLa.

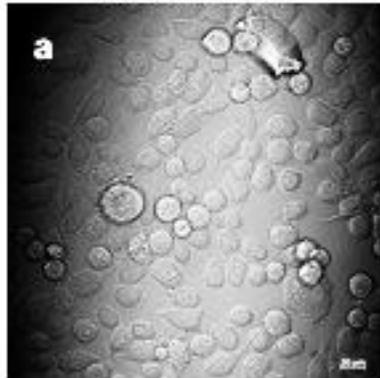
En un ensayo preliminar se determinó el daño producido por las vesículas a las células mediante fluorescencia para detectar a la Anexina V, una proteína que sirve como indicador de células apoptóticas. Una pastilla de vesículas de parásitos en AG se interaccionó con una monocapa de células HeLa por 45 min, posteriormente se realizó el ensayo de fluorescencia. La figura 17A muestra como controles a las células HeLa y vesículas por separado, donde se observa que las células HeLa presentan un mínimo de fluorescencia, mientras que las vesículas por si solas no presentan fluorescencia. En la figura 17B se aprecia en los paneles a-d el corte de mayor intensidad, mientras que en el panel (e) se aprecia la proyección máxima en 3D que al comparar con el control, las células HeLa presentan mayor fluorescencia de Anexina V comparada con el control. Este experimento solo se realizó una vez, por lo que es necesario realizar el duplicado.

Fig.17 Efecto de la interacción entre vesículas y células HeLa. (A) Imágenes de los controles del ensayo de fluorescencia para anexina V para detectar el efecto de las vesículas. La monocapa de células HeLa (paneles a, c, e, f) tratada con anexina V, (panel e). El control de vesículas (paneles b, d, f, h) tratadas con anexina V. La anexina acoplada a FITC se usó a dilución 1:10. **(B)** Interacción de vesículas en AG y células HeLa, la interacción se llevó a cabo por 45 min a 37°C, posteriormente se realizó la tinción con anexina V acoplada a FITC (color verde), indicando así que las células han iniciado el proceso de apoptosis al observar la marca en verde. Ensayo preliminar.

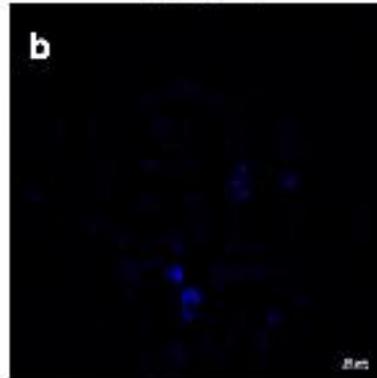


B

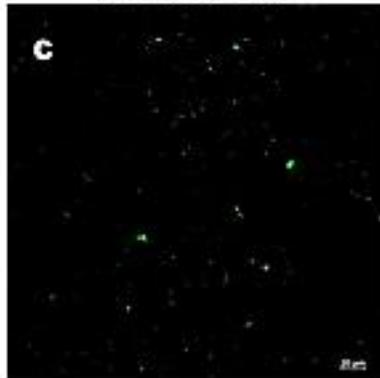
Nomarski



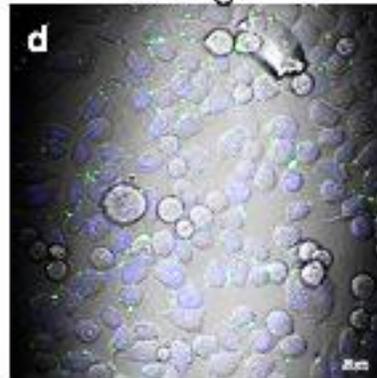
DAPI



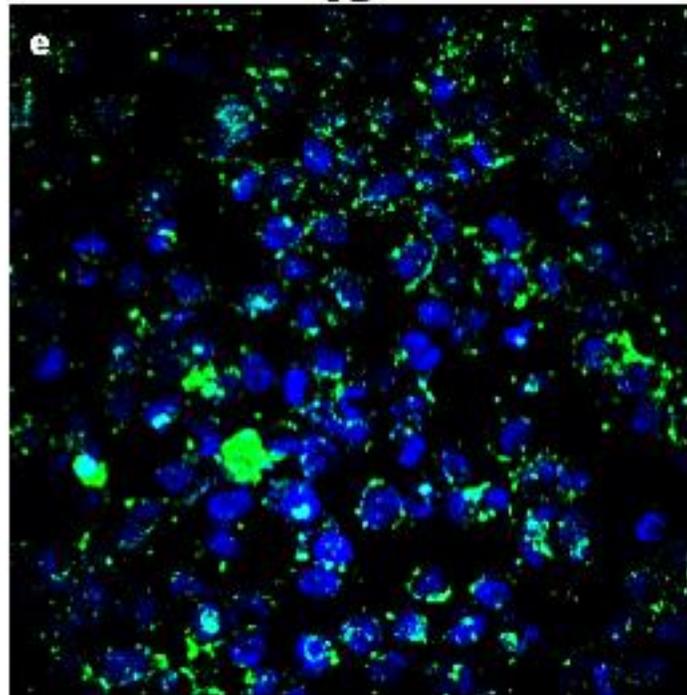
Anexina



Merge



3D



9. DISCUSIÓN

En este trabajo se demostró que TvTIM es secretada dentro de vesículas extracelulares de entre 300 nm hasta 5 μ m en condiciones ambientales de alta glucosa. Dichas vesículas al interaccionar con células HeLa logran reproducir el efecto observado *in vivo*, es decir, se logra observar a TvTIM dentro de las células, además el contacto entre vesículas y células puede tener un posible efecto citotóxico.

Se ha demostrado que *T. vaginalis* presenta un genoma repetitivo, donde la mayoría de las enzimas metabólicas son codificadas por una o más copias de genes (Carlton *et al.*, 2007).

En los ensayos de secreción *in vitro* se detectó la presencia de TvTIM solamente en condiciones de AG, mientras que, en condiciones de RG, AFe y BFe no fue detectada (Fig. 7 y 8), lo que nos sugiere que la condición ambiental induce la secreción de proteínas; sin embargo, no se puede descartar que la TvTIM se secrete en estas condiciones en la fracción no soluble. Además, se ha demostrado que la secreción proteica de *T. vaginalis* es dependiente del tiempo y el contacto con las células huésped (Kucknoor *et al.*, 2007; Štáfková *et al.*, 2018).

En estudios previos se ha analizado el proteoma de la secreción de *T. vaginalis* en condiciones normales del cultivo, donde se ha observado que el parásito secreta en mayor abundancia cisteína proteasas, adhesinas, proteínas de choque térmico e interesantemente enzimas glicolíticas, lo cual puede estar asociado a un mecanismo implicado en el cambio de localización a membrana de ciertas proteínas “moonlighting” como GAPDH, la cual se sabe es secretada y se encuentra presente en la membrana plasmática de *T. vaginalis* (de Miguel *et al.*, 2010; Hirt *et al.*, 2011; Kucknoor *et al.*, 2007; Lama, Kucknoor, Mundodi, & Alderete, 2009).

Al analizar a *T. vaginalis* en condiciones ambientales de AG o RG por MEB y por IFI se observó la formación de vesículas extracelulares en la membrana parasitaria (Figs. 9-11), lo cual es consistente con lo reportado de que *T.*

vaginalis es capaz de liberar exosomas de 100 nm (Nievas *et al.*, 2018; Olmos-Ortiz *et al.*, 2017; Twu *et al.*, 2013). Además, mediante el estímulo con CaCl₂, el cual se sabe induce la formación de microvesículas en células de mamíferos, el parásito es capaz de formar microvesículas de membrana con tamaños de entre 300-900 nm los tamaños tanto de los exosomas como de las microvesículas son similares a los obtenidos en ambas condiciones de cultivo. Esto sugiere que los estímulos ambientales como la glucosa en este caso, inducen naturalmente la formación de vesículas extracelulares en el parásito sin la necesidad de estímulos externos, como el calcio, para la formación de vesículas (Cocucci & Meldolesi, 2011), ya que las concentraciones de glucosa usadas (AG 50 mM, RG <1 mM) coinciden con las presentes en secreciones vaginales de pacientes con cervicovaginitis causada o no por *T. vaginalis*, donde los valores individuales que variaron entre 0.3-56.6 mM (Miranda-Ozuna, 2016).

De igual forma, se han estudiado los proteomas de las vesículas presentes en el parásito, donde las proteínas mayoritarias encontradas son proteínas metabólicas, entre estas está la TvTIM2, lo que soporta que esta proteína sigue vías no convencionales para su secreción (Miranda-Ozuna *et al.*, 2016; Štáfková *et al.*, 2018; Twu *et al.*, 2013).

Un hallazgo sorprendente fue la presencia de vesículas no solo en la membrana plasmática, si no también en flagelos, membrana ondulante axostilo e incluso la formación de distintos poros de membrana que parecen estar liberando vesículas al medio. En *T. vaginalis* no se tiene reporte de la liberación vesicular en estas zonas del parásito. Sin embargo, se conoce que algunos tipos de algas y bacterias son capaces de liberar vesículas desde estructuras tipo flagelares o ciliares (McCaig, Koller, & Thanassi, 2013; Wood, Huang, Diener, & Rosenbaum, 2013). Además, se ha comprobado una relación entre proteínas glicolíticas y proteínas ligadas al citoesqueleto, como actina y tubulina, las cuales forman a los flagelos y al axostilo del parásito (Benchimol, 2005; de Andrade Rosa *et al.*, 2017; Preisner *et al.*, 2016), dicha asociación se ha observado en células de mamíferos y está ligado al

transporte de proteínas dentro de la célula (Lincet & Icard, 2015), por lo que es de interés el analizar la posible correlación de dichas proteínas en el parásito.

La formación de los poros en el parásito tampoco se ha descrito aún. Sin embargo, en diferentes tipos de células eucariontes, como neuronas y células hormonales, se ha descrito la formación de porosomas (Jena, 2005; Leabu & Niculite, 2014; Lee *et al.*, 2012), los cuales tienen un tamaño de aproximadamente 400 nm cuya función es la liberación de contenido celular que ayude a la comunicación intercelular. Además, ya se ha descrito que la formación de dichos poros es dependiente de estímulos ambientales presentes en el medio, por lo que resulta de interés el estudiar y caracterizar los poros presentes en *T. vaginalis* para así poder determinar otra vía de secreción no convencional presente en el parásito.

Al realizar la interacción del parásito en condiciones de AG y RG se pudo observar la formación de vesículas en el parásito (Figs. 12 y 13), por lo que al hacer IFI en dichas interacciones se observó a TvTIM en el interior de las células HeLa, efecto similar al reportado por Miranda-Ozuna (2016) en su tesis doctoral, donde se reporta la presencia de TvTIM en células epiteliales vaginales de pacientes con tricomoniasis. Además, se observó que, si bien es cierto no se esperaba observar a la proteína en las interacciones en RG, se puede ver la presencia de TvTIM no sólo en el interior del parásito si no también en el interior algunas de las células (tabla 1), lo que sugiere que el parásito al fagocitar gran parte de la monocapa de células HeLa induce a una síntesis *de novo* de la TvTIM, lo que induce su secreción. Al poder reproducir *in vitro* lo observado *in vivo* es posible estudiar mejor la patogenia del parásito, abriendo la posibilidad de la búsqueda de otras proteínas parasitarias en el interior de las células huésped. Además de que aún falta por determinar el efecto de TvTIM en las células infectadas.

En la interacción los parásitos con células HeLa se observó la formación de filamentos en la célula HeLa, los cuales se han reportado como una respuesta al estrés, además al contacto con parásitos como se han identificado la

formación de filamentos de actina los cuales inducen la entrada de los parásitos a la célula (Rosestolato, Dutra, De Souza, & de Carvalho, 2002); también se ha observado la formación de filamentos independientes de actina pero dependientes de tetraspanina en el contacto de células HeLa con el virus del papiloma humano (Spoden *et al.*, 2008). Por lo que es de interés el conocer si los filamentos producidos por el contacto con *T. vaginalis* son de actina o tetraspanina y que función pueden tener. Además, se observa el “blebbing” celular, el cual es una señal de apoptosis por estrés en las células HeLa.

La metodología empleada permitió la purificación de las vesículas extracelulares secretadas por el parásito en condiciones de AG y RG y se comprobó que los tamaños de las vesículas obtenidas coinciden con los ya reportados con anterioridad por Nieves y Twu (Nieves *et al.*, 2018; Twu *et al.*, 2013) . Sin embargo, encontramos también la presencia de megavesículas de un tamaño de entre 2 y 5 μm (fig. 14) y se detectaron distintos tipos de vesículas en la secreción (Tabla 2). Entre las características de dichas vesículas se puede hacer énfasis en los distintos tamaños de vesículas, los cuales concuerdan a los que se han observado con anterioridad; el contenido de las vesículas es diverso, pues se encuentran vesículas con un poco de material granular en su interior, similares a vesículas reportadas en el interior del parásito (Mirhaghani & Warton, 1996; Warton & Honigberg, 1979), así como vesículas totalmente electrondensas, las cuales presentan características similares a los glicosomas descritos en *T. vaginalis*, por lo que es de interés el lograr una caracterización de estas vesículas para poder realizar una clasificación adecuada.

También se determinó que TvTIM está presente en vesículas de entre 200 nm-3 μm , que presentan una pared bien definida y material granular en su interior, lo que sugiere que el cargo entre los distintos tipos de vesículas es diferente y puede depender de la condición inductora (calcio, glucosa, hierro, etc), su vía de secreción para determinar el contenido y las proteínas presentes en la membrana, pues TvTIM se detectó principalmente en las membranas de las

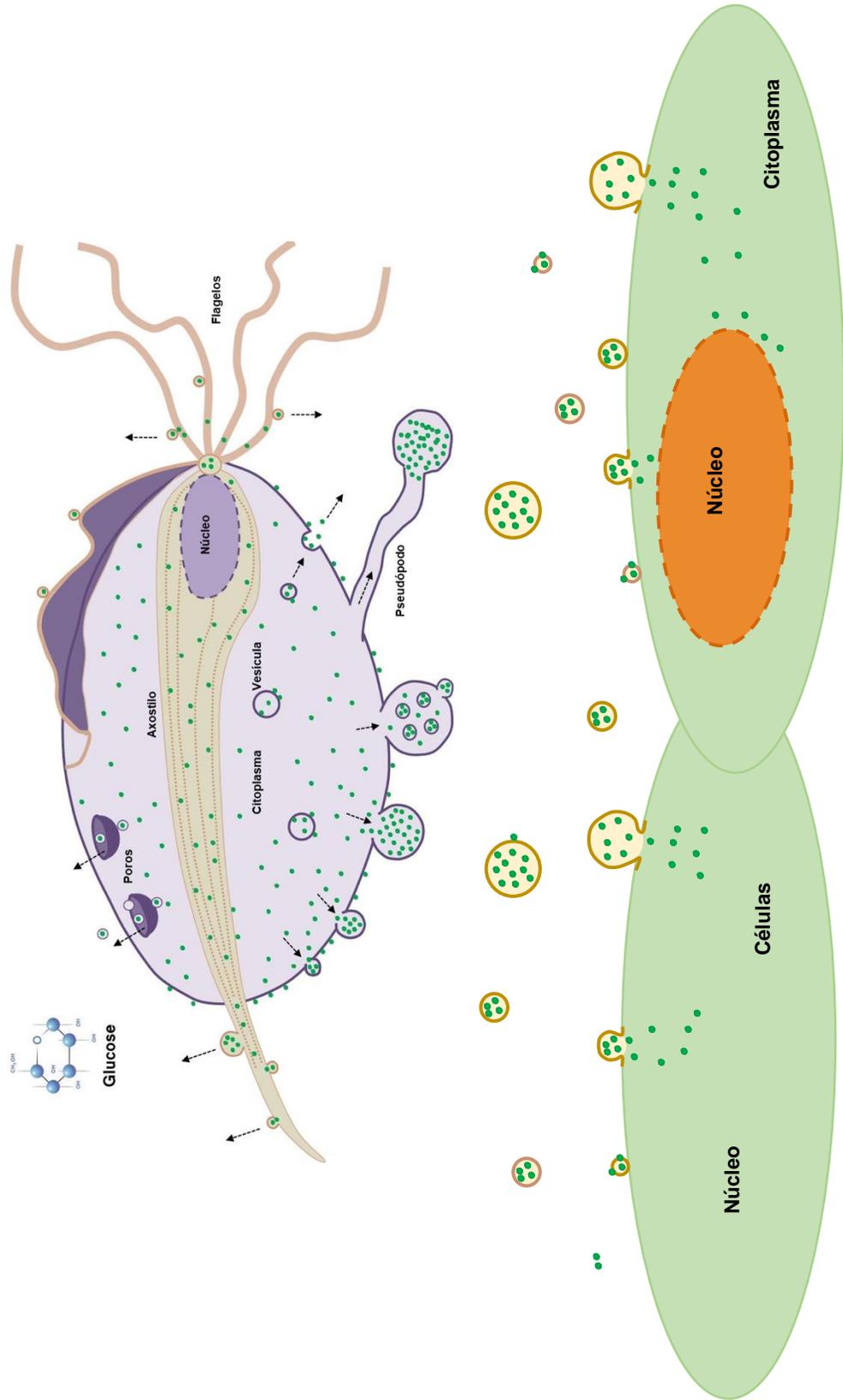
vesículas, lo que podría sugerir que quizá actúe como receptor para la interacción de las vesículas con las células infectadas.

Durante la interacción de las vesículas con las células HeLa se pudo observar que se repitió de nueva cuenta el efecto observado *in vivo*, al detectar la presencia de la TvTIM dentro de las células HeLa después de interactuar con las VEs. Esto nos muestra que no es necesario el contacto directo con el parásito para lograr la internalización de TvTIM. Se ha demostrado en células eucariontes que los ectosomas de otros microorganismos regulan la respuesta inmune y la inflamación de las células (Cocucci & Meldolesi, 2015; Sadallah, Eken, & Schifferli, 2011), lo que podría indicar una posible función de las vesículas que libera *T. vaginalis*.

Como se observa en la figura 17, la interacción entre vesículas y células HeLa puede inducir un posible efecto citotóxico por inducción de apoptosis, el cual puede estar ligado a la presencia de proteasas dentro de las vesículas, como la TvCP4 (Fig.15C). Además, se ha demostrado la presencia de otras cisteínas proteasas en las secreciones parasitarias (Kucknoor *et al.*, 2007), las cuales en contacto con las células epiteliales son capaces de inducir la expresión de genes, así como de inducir la respuesta de citocinas de la célula huésped.

Como resumen de resultados se observa en la figura 18 a *T. vaginalis*, el cual en condiciones ambientales de AG secreta a TvTIM en VEs, las cuales se van a encontrar en la membrana plasmática y atípicamente en flagelos, membrana ondulante y axostilo del parásito; estas vesículas extracelulares permiten la internalización de la TvTIM en células huésped directamente al contacto con parásitos vivos o con las VEs purificadas, como ocurre durante la infección.

Fig.18 Resumen de resultados. Esquema representativo de los resultados obtenidos durante el desarrollo de este proyecto. TvTIM en color verde. *T. vaginalis* presenta distintas vías de secreción de VEs, las cuales interactúan con la célula huésped internalizando su contenido.



10. CONCLUSIONES

En condiciones ambientales de alta glucosa *T. vaginalis* secreta distintos tipos de vesículas extracelulares, las cuales se observan en la membrana, flagelos, axostilo y poros membranales. Dentro de algunas de estas vesículas se detectó a TvTIM. Además, al interaccionar las vesículas con células HeLa se observó que la proteína TvTIM de tricomonas se internalizó dentro de las células epiteliales, reproduciendo así lo observado *in vivo*. Además, con dicha interacción, se detectó un posible efecto citotóxico inducido por el contacto con las vesículas. Estos resultados nos pueden ayudar a entender mejor la patogenia de *T. vaginalis*.

11. PERSPECTIVAS

- Identificar las moléculas que participan en las vías de secreción no convencionales presentes en el parásito.
- Estudiar los poros presentes en el parásito durante la secreción para su caracterización.
- Realizar un análisis proteómico comparativo del contenido de las vesículas extracelulares obtenidas en diferentes condiciones ambientales.
- Determinar y demostrar la fusión de las vesículas extracelulares con las membranas de las células huésped.
- Realizar cinéticas de interacción entre células y parásitos o vesículas para determinar el tiempo que TvTIM tarda en internalizarse.
- Verificar el efecto citotóxico por inducción de apoptosis de las vesículas extracelulares de parásitos en AG al interactuar con las células huésped.
- Estudiar los cambios morfológicos observados en las células huésped.
- Identificar la respuesta inmune desencadenada por las vesículas en la célula huésped.
- Comparar los fenómenos observados con otras líneas celulares.

12. REFERENCIAS

- Amblee, V., & Jeffery, C. J. (2015). Physical features of intracellular proteins that moonlight on the cell surface. *PLoS ONE*, 10(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130575>
- Benchimol, M. (2005). New ultrastructural observations on the skeletal matrix of *Trichomonas foetus*. *Parasitology Research*, 97(5), 408–416. <https://doi.org/10.1007/s00436-005-1480-x>
- Bouchemal, K., Bories, C., & Loiseau, P. M. (2017). Strategies for prevention and treatment of *Trichomonas vaginalis* infections. *Clinical microbiology reviews*, 30(3), 811–825.
- Carlton, J. M., Hirt, R. P., Silva, J. C., Delcher, A. L., Schatz, M., Zhao, Q., Johnson, P. J. (2007). Draft Genome Sequence of the Sexually Transmitted Pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science*, 315(5809), 207 LP-212. Retrieved from <http://science.sciencemag.org/content/315/5809/207.abstract>
- Coakley, G., Maizels, R. M., & Buck, A. H. (2015). Exosomes and other extracellular vesicles: the new communicators in parasite infections. *Trends in Parasitology*, 31(10), 477–489. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.06.009>
- Cocucci, E., & Meldolesi, J. (2015). Ectosomes and exosomes: Shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends in Cell Biology*, 25(6), 364–372. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.01.004>
- Cocucci, E., & Meldolesi, J. (2011). Ectosomes. *Current Biology*, 21(23), R940–R941. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.10.011>
- de Andrade Rosa, I., Caruso, M. B., de Oliveira Santos, E., Gonzaga, L., Zingali, R. B., de Vasconcelos, A. T. R., ... Benchimol, M. (2017). The costa of trichomonads: A complex macromolecular cytoskeleton structure made of uncommon proteins. *Biology of the Cell*, 109(6), 238–253. <https://doi.org/10.1111/boc.201600050>
- de Miguel, N., Lustig, G., Twu, O., Chattopadhyay, A., Wohlschlegel, J. A., & Johnson, P. J. (2010). Proteome analysis of the surface of *Trichomonas*

- vaginalis* reveals novel proteins and strain-dependent differential expression. *Molecular & Cellular Proteomics*, 9(7), 1554–1566. <https://doi.org/10.1074/mcp.M000022-MCP201>
- Edwards, T., Burke, P., Smalley, H., & Hobbs, G. (2016). *Trichomonas vaginalis*: Clinical relevance, pathogenicity and diagnosis. *Critical Reviews in Microbiology*, 42(3), 406–417. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.958050>
- Figueroa-Angulo, E. E., Estrella-Hernández, P., Salgado-Lugo, H., Ochoa-Leyva, A., Gámez-Puyou, A., Campos, S. S., ... Brieba, L. G. (2012). Cellular and biochemical characterization of two closely related triosephosphate isomerases from *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology*, 139(13), 1729–1738. <https://doi.org/10.1017/S003118201200114X>
- Figueroa-Angulo, E. E., Rendón-Gandarilla, F. J., Puente-Rivera, J., Calla-Choque, J. S., Cárdenas-Guerra, R. E., Ortega-López, J., ... Arroyo, R. (2012). The effects of environmental factors on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. *Microbes and Infection*, 14(15), 1411–1427. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.09.004>
- Furuya, H., & Ikeda, R. (2011). Interaction of triosephosphate isomerase from *Staphylococcus aureus* with plasminogen. *Microbiology and Immunology*, 55(12), 855–862. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2011.00392.x>
- Gould, S. B., Woehle, C., Kusdian, G., Landan, G., Tachezy, J., Zimorski, V., & Martin, W. F. (2013). Deep sequencing of *Trichomonas vaginalis* during the early infection of vaginal epithelial cells and amoeboid transition. *International Journal for Parasitology*, 43(9), 707–719. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.04.002>
- Henderson, B., Fares, M. A., & Martin, A. C. R. (2016). *Protein Moonlighting in Biology and Medicine*. *Protein Moonlighting in Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.1002/9781118952108>
- Hewitson, J. P., Ruckerl, D., Harcus, Y., Murray, J., Webb, L. M., Babayan, S. A., ... Maizels, R. M. (2014). The secreted triose phosphate isomerase of

- Brugia malayi* is required to sustain microfilaria production *in vivo*. *PLoS Pathogens*, 10(2). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003930>
- Hirt, R. P., de Miguel, N., Nakjang, S., Dessi, D., Liu, Y. C., Diaz, N., ... Mottram, J. C. (2011). *Trichomonas vaginalis* pathobiology. New insights from the genome sequence. *Advances in Parasitology* (Vol. 77). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391429-3.00006-X>
- Hirt, R. P., & Sherrard, J. (2015). *Trichomonas vaginalis* origins, molecular pathobiology and clinical considerations. *Current opinion in infectious diseases*, 28(1), 72–79. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000128>
- Ibáñez-Escribano, A., & Gómez-Barrio, A. (2017). *Trichomonas vaginalis*: The versatility of a tenacious parasite. *Anales de La Real Academia Nacional de Farmacia*, 83(1), 10–47. Retrieved from <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85017323008&partnerID=40&md5=856cf187c04c984d1c915c1df732164c>
- Jeffery, C. J. (1999). Moonlighting proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 24(1), 8–11.
- Jeffery, C. J. (2009). Moonlighting proteins - An update. *Molecular BioSystems*, 5(4), 345–350. <https://doi.org/10.1039/b900658n>
- Jeffery, C. J. (2015). Why study moonlighting proteins?. *Frontiers in Genetics*, 6(JUN). <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00211>
- Jeffery, C. J. (2016). Protein species and moonlighting proteins: Very small changes in a protein's covalent structure can change its biochemical function. *Journal of Proteomics*, 134, 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.10.003>
- Jena, B. P. (2005). Molecular machinery and mechanism of cell secretion. *Experimental Biology and Medicine* (Maywood, N.J.), 230, 307–319.
- Kissinger, P. (2015a). Epidemiology and Treatment of Trichomoniasis. *Current Infectious Disease Reports*, 17(6). <https://doi.org/10.1007/s11908-015-0484-7>
- Kissinger, P. (2015b). *Trichomonas vaginalis*: a review of epidemiologic,

- clinical and treatment issues. *BMC Infectious Diseases*, 15(1), 1–8.
<https://doi.org/10.1186/s12879-015-1055-0>
- Kissinger, P., & Adamski, A. (2013). Trichomoniasis and HIV interactions : a review. *Sex Transm Infect*, 89(6), 426–433.
<https://doi.org/10.1136/sextrans-2012-051005>
- Kucknoor, A. S., Mundodi, V., & Alderete, J. F. (2007). The proteins secreted by *Trichomonas vaginalis* and vaginal epithelial cell response to secreted and episomally expressed AP65. *Cellular Microbiology*, 9(11), 2586–2597.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00979.x>
- Lama, A., Kucknoor, A., Mundodi, V., & Alderete, J. F. (2009). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a surface-associated, fibronectin-binding protein of *Trichomonas vaginalis*. *Infection and Immunity*, 77(7), 2703–2711. <https://doi.org/10.1128/IAI.00157-09>
- Lara-González, S., Estrella-Hernández, P., Ochoa-Leyva, A., del Carmen Portillo-Téllez, M., Caro-Gómez, L. A., Figueroa-Angulo, E. E., ... Benítez-Cardoza, C. G. (2014). Structural and thermodynamic folding characterization of triosephosphate isomerases from *Trichomonas vaginalis* reveals the role of destabilizing mutations following gene duplication. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 82(1), 22–33. <https://doi.org/10.1002/prot.24333>
- Leabu, M., & Niculite, C. M. (2014). Porosome: a membrane microdomain acting as the universal secretory portal in exocytosis. *Discoveries*, 2(3), e29. <https://doi.org/10.15190/d.2014.21>
- Lee, J. S., Jeremic, A., Shin, L., Cho, W. J., Chen, X., & Jena, B. P. (2012). Neuronal porosome proteome: molecular dynamics and architecture. *Journal of Proteomics*, 75(13), 3952–3962.
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.05.017>
- Lehker, M. W., & Alderete, J. F. (2000). Biology of trichomonosis. *Current opinion in infectious diseases*, 13(1), 37-45.
- Lincet, H., & Icard, P. (2015). How do glycolytic enzymes favour cancer cell proliferation by nonmetabolic functions?. *Oncogene*, 34(29), 3751–3759.

<https://doi.org/10.1038/onc.2014.320>

- Lo Cicero, A., Stahl, P. D., & Raposo, G. (2015). Extracellular vesicles shuffling intercellular messages: For good or for bad. *Current Opinion in Cell Biology*, 35, 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.04.013>
- Mancilla-Olea, M. I., Ortega-López, J., Figueroa-Angulo, E. E., Avila-González, L., Cárdenas-Guerra, R. E., Miranda-Ozuna, J. F. T., ... Arroyo, R. (2018). *Trichomonas vaginalis* cathepsin D-like aspartic proteinase (Tv-CatD) is positively regulated by glucose and degrades human hemoglobin. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 97(June 2017), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.01.015>
- Mantel, P. Y., & Marti, M. (2014). The role of extracellular vesicles in Plasmodium and other protozoan parasites. *Cellular Microbiology*, 16(3), 344–354. <https://doi.org/10.1111/cmi.12259>
- McCaig, W. D., Koller, A., & Thanassi, D. G. (2013). Production of outer membrane vesicles and outer membrane tubes by *Francisella novicida*. *Journal of Bacteriology*, 195(6), 1120–1132. <https://doi.org/10.1128/JB.02007-12>
- Miranda-Ozuna, J. F. T. (2016). Influencia de la glucosa en la citotoxicidad y en la interacción de *T. vaginalis* con laminina y fibronectina mediada por la enzima triosafosfato isomerasa TvTIM.
- Miranda-Ozuna, J. F. T., Hernández-García, M. S., Brieba, L. G., Benítez-Cardoza, C. G., Ortega-López, J., González-Robles, A., & Arroyo, R. (2016). The glycolytic enzyme triosephosphate isomerase of *Trichomonas vaginalis* is a surface-associated protein induced by glucose that functions as a laminin- and fibronectin-binding protein. *Infection and Immunity*, 84(10), 2878–2894. <https://doi.org/10.1128/IAI.00538-16>. Editor
- Mirhaghani, A., & Warton, A. (1996). An electron microscope study of the interaction between *Trichomonas vaginalis* and epithelial cells of the human amnion membrane. *Parasitology Research*, 82, 43–47.
- Muzny, C. A. (2018). Why does *Trichomonas vaginalis* continue to be a “neglected” sexually transmitted infection?. *Clinical Infectious Diseases*,

- 67(June), 10–12. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy085>
- Nievas, Y. R., Coceres, V. M., Midlej, V., de Souza, W., Benchimol, M., Pereira-Neves, A., ... de Miguel, N. (2018). Membrane-shed vesicles from the parasite *Trichomonas vaginalis*: characterization and their association with cell interaction. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(12), 2211–2226. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2726-3>
- Olmos-Ortiz, L. M., Barajas-Mendiola, M. A., Barrios-Rodiles, M., Castellano, L. E., Arias-Negrete, S., Avila, E. E., & Cuéllar-Mata, P. (2017). *Trichomonas vaginalis* exosome-like vesicles modify the cytokine profile and reduce inflammation in parasite-infected mice. *Parasite Immunology*, 39(6), 1–10. <https://doi.org/10.1111/pim.12426>
- Organización Mundial de la Salud. (2011) Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections-2008
- Pereira, L. A., Bão, S. N., Barbosa, M. S., Da Silva, J. L. M., Felipe, M. S. S., De Santana, J. M., ... De Almeida Soares, C. M. (2007). Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function. *FEMS Yeast Research*, 7(8), 1381–1388. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2007.00292.x>
- Petrin, D., Delgaty, K., Bhatt, R., & Garber, G. (1998). Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clin.Microbiol.Rev.*, 11(0893–8512 (Print)), 300–317.
- Poole, D. N., & McClelland, R. S. (2013). Global epidemiology of *Trichomonas vaginalis*. *Sexually Transmitted Infections*, 89(6), 418–422. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2013-051075>
- Preisner, H., Karin, E. L., Poschmann, G., Stühler, K., Pupko, T., & Gould, S. B. (2016). The cytoskeleton of parabasalian parasites comprises proteins that share properties common to intermediate filament proteins. *Protist*, 167(6), 526–543. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2016.09.001>
- Raposo, G., & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*, 200(4), 373–383. <https://doi.org/10.1083/jcb.201211138>

- Rosestolato, C. T. F., Dutra, J. D. M. F., De Souza, W., & de Carvalho, T. M. U. (2002). Participation of host cell actin filaments during interaction of trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* with host cells. *Cell Structure and Function*, 27(2), 91–98. <https://doi.org/10.1247/csf.27.91>
- Saab-Rincón, G., Juárez, V. R., Osuna, J., Sánchez, F., & Soberón, X. (2001). Different strategies to recover the activity of monomeric triosephosphate isomerase by directed evolution. *Protein Engineering, Design and Selection*, 14(3), 149–155. <https://doi.org/10.1093/protein/14.3.149>
- Sadallah, S., Eken, C., & Schifferli, J. A. (2011). Ectosomes as modulators of inflammation and immunity. *Clinical and Experimental Immunology*, 163(1), 26–32. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04271.x>
- Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (2017) Vigilancia epidemiológica semana 52.
- Spoden, G., Freitag, K., Husmann, M., Boller, K., Sapp, M., Lambert, C., & Florin, L. (2008). Clathrin- and caveolin-independent entry of human papillomavirus type 16 - Involvement of tetraspanin-enriched microdomains (TEMs). *PLoS ONE*, 3(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003313>
- Štáfková, J., Rada, P., Meloni, D., Žárský, V., Smutná, T., Zimmann, N., ... Tachezy, J. (2018). Dynamic secretome of *Trichomonas vaginalis*: Case study of β -amylases. *Molecular & Cellular Proteomics*, 17(2), 304–320. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA117.000434>
- Sulaiman, I. M., Fayer, R., Bern, C., Gilman, R. H., Trout, J. M., Schantz, P. M., ... Xiao, L. (2003). Triosephosphate isomerase gen characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerging Infectious Diseases*, 9(11), 1444–1452. <https://doi.org/10.3201/eid0911.030084>
- Twu, O., de Miguel, N., Lustig, G., Stevens, G. C., Vashisht, A. A., Wohlschlegel, J. A., & Johnson, P. J. (2013). *Trichomonas vaginalis* exosomes deliver cargo to host cells and mediate host-parasite interactions. *PLoS Pathogens*, 9(7), 22–24.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003482>

Velanker, S. S., Ray, S. S., Gokhale, R. S., S, S., Balaram, H., Balaram, P., & Murthy, M. (1997). Triosephosphate isomerase from *Plasmodium falciparum*: the crystal structure provides insights into antimalarial drug design. *Structure*, 5(6), 751–761. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(97\)00230-X](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(97)00230-X)

Wartoń, A., & Honigberg, B. M. (1979). Structure of trichomonads as revealed by scanning electron microscopy. *The Journal of Protozoology*, 26(1), 56–62. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/314517>

Wood, C. R., Huang, K., Diener, D. R., & Rosenbaum, J. L. (2013). The cilium secretes bioactive ectosomes. *Current Biology*, 23(10), 906–911. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.04.019>