



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

**Análisis de la función y localización nuclear de la catepsina D (Tv-CatD) de
*Trichomonas vaginalis***

T E S I S

Que presenta :

L. C. LIZBETH SANCHEZ AYALA

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS EN
INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR**

Directora de Tesis:

DRA. ROSSANA ARROYO VERÁSTEGUI

CIUDAD DE MÉXICO

JULIO, 2018

Asesores:

Dra. Patricia Talamás Rohana

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular (DIPM), CINVESTAV-IPN

Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular (DIPM), CINVESTAV-IPN

Dr. Jaime Ortega López

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería (DBB), CINVESTAV-IPN

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio 11 del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular (DIPM) del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV-IPN) bajo la dirección de la Dra. Rossana Arroyo Verástegui. Contó con el financiamiento parcial del proyecto de Conacyt 237937. L. S. A. fue becaria del Conacyt con No. 780922.

AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Rossana Arroyo Verástegui** por haberme aceptado en su grupo de investigación, por sus recomendaciones y críticas constructivas, por su asesoría constante y dedicación a este trabajo.

A la **Dra. Patricia Talamás Rohana**, al **Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez** y al **Dr. Jaime Ortega López** por su asesoría y críticas constructivas a este trabajo.

A la **Q.F.B. Leticia Ávila González** por su asistencia técnica y por la enseñanza de las técnicas del laboratorio.

A mis compañeros del laboratorio, **Ino, Sarahí, Mar, Jesús, Diana** por su apoyo durante mi estancia en el laboratorio, pero sobre todo a **Luis** por su asistencia técnica en microscopía confocal, por su apoyo durante mi estancia en el laboratorio y por su amistad.

Al **Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular (DIPM)** por aceptarme en el programa de maestría.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt)** por la beca de maestría No. 780922.

Y por supuesto a mis padres, **Columba** y **Aniceto**, por su apoyo incondicional, porque siempre han estado ahí para mí, gracias.

ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

Capítulo 1.

1. Introducción.....	1
1.1. Tricomoniasis.....	1
1.2. <i>Trichomonas vaginalis</i>	2
1.3. Proteasas.....	5
1.3.1. Aspártico proteasas.....	7
1.3.1.1. Mecanismo de acción de las APs.....	7
1.3.1.2. Catepsina D.....	9

Capítulo 2.

2. Antecedentes.....	15
----------------------	----

Capítulo 3.

3. Justificación.....	22
-----------------------	----

Capítulo 4.

4. Hipótesis.....	23
-------------------	----

Capítulo 5.

5. Objetivos.....	24
5.1. Objetivo general.....	24
5.2. Objetivos particulares.....	24

Capítulo 6.

6. Estrategia experimental.....	25
---------------------------------	----

Capítulo 7.

7. Materiales y métodos.....	29
7.1. Análisis bioinformático.....	29
7.1.1. Modelado de la estructura tridimensional de proteínas.....	29
7.1.2. Análisis estructural entre Tv-CatD Y SAF.....	29
7.1.3. Búsqueda de dominios funcionales, SLN, SEN y modificaciones postraduccionales.....	29
7.1.4. Interactoma.....	30
7.2. Cultivo de <i>T. vaginalis</i>	30
7.3. Fraccionamiento celular.....	31
7.4. Western Blot.....	32
7.5. Ensayo de Inmunofluorescencia indirecta.....	33
7.6. Ensayos de actividad proteolítica de Tv-CatD.....	33
7.7. Electroforesis bidimensional.....	34

Capítulo 8.	
8. Resultados.....	35
8.1. Análisis bioinformático.....	35
8.1.1. Análisis estructural entre Tv-CatD y SAF.....	35
8.1.2. Análisis <i>in silico</i>	49
8.1.3. Interactoma.....	52
8.2. Fraccionamiento celular en restricción y baja glucosa.....	52
8.3. Efecto del hierro en la cantidad de proteína de Tv-CatD.....	58
8.3.1. Ensayo de inmunofluorescencia indirecta.....	58
8.3.2. Fraccionamiento celular.....	67
8.4. Actividad proteolítica de Tv-CatD.....	75
8.4.1. Efecto de la glucosa en la actividad proteolítica de Tv-CatD de <i>T. vaginalis</i>	75
8.4.2. Efecto del hierro en la actividad proteolítica de Tv-CatD de <i>T. vaginalis</i>	75
8.5. TC-2 como posible sustrato de Tv-CatD nuclear.....	95
8.6. Electroforesis en doble dimensión del extracto nuclear.....	98
8.7. Proteoma nuclear de <i>T. vaginalis</i> cultivado en glucosa normal.....	101
8.8. Proteoma nuclear de <i>T. vaginalis</i> cultivado en alto hierro.....	106
Capítulo 9.	
9. Discusión.....	111
9.1. Análisis bioinformático.....	111
9.1.1. Análisis estructural entre Tv-CatD y SAF.....	111
9.1.2. Análisis <i>in silico</i>	112
9.2. Localización nuclear de Tv-CatD.....	113
9.3. Función nuclear de Tv-CatD.....	116
9.4. TC-2 como posible sustrato de Tv-CatD.....	117
9.5. Proteoma del extracto nuclear.....	118
Capítulo 10.	
10. Resumen de resultados.....	120
Capítulo 11.	
11. Conclusión.....	124
Capítulo 12	
12. Perspectivas.....	125
Referencias	126
Apéndices	137
1. Modelos lineales de las cinéticas de actividad proteolítica de Tv-CatD.....	137
2. Proteínas del extracto nuclear de la mancha de ~120 kDa identificadas por espectrometría de masas.....	143

3. Proteínas del extracto nuclear de la mancha de ~35 kDa identificadas por espectrometría de masas.....	144
4. Tablas de las proteínas del extracto nuclear de parásitos cultivados en glucosa normal identificadas por espectrometría de masas.....	166
5. Tablas de las proteínas del extracto nuclear de parásitos cultivados en alto hierro identificadas por espectrometría de masas.....	165
6. Soluciones.....	192

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Morfología de <i>Trichomonas vaginalis</i>	3
Figura 1.2. Ilustración de <i>Trichomonas vaginalis</i>	4
Figura 1.3. Mecanismo de acción general para las aspártico proteasas	10
Figura 1.4. Procesamiento y activación de Catepsina D	12
Figura 1.5. Estructura tridimensional de la catepsina D humana	13
Figura 2.1. Esquema del zimógeno de la aspártico proteasa tipo catepsina D de <i>T. vaginalis</i>	16
Figura 2.2. Efecto de la glucosa en la expresión de Tv-CatD	17
Figura 2.3. Múltiples localizaciones intracelulares de Tv-CatD en <i>T. vaginalis</i>	18
Figura 2.4. Localización intracelular de Tv-CatD en <i>T. vaginalis</i>	19
Figura 2.5. Tv-CatD degrada hemoglobina humana	21
Figura 8.1. Evolución del dominio psi-barril- β	36
Figura 8.2. Modelos estructurales hipotéticos de las proteínas Tv-CatD y SAF de <i>T. vaginalis</i>	37
Figura 8.3. Estructura del dominio psi-barril- β de VAT-N	39
Figura 8.4. Estructura de los dominios psi-barril- β amino y carboxilo terminal de Tv-CatD	41
Figura 8.5. Estructura del dominio psi-barril- β amino terminal de SAF	43
Figura 8.6. Comparación estructural de los dominios amino terminal psi-barril- β de Tv-CatD y SAF	45
Figura 8.7. Comparación estructural de los dominios psi-barril- β carboxilo y amino terminal de Tv-CatD y SAF, respectivamente	47
Figura 8.8. Interactoma <i>in silico</i> de Tv-CatD	53
Figura 8.9. Fraccionamiento celular de <i>T. vaginalis</i> en diferentes condiciones de glucosa	59
Figura 8.10. Efecto del hierro sobre Tv-CatD	61
Figura 8.11. Efecto de alto hierro en la inmunolocalización de Tv-CatD en <i>T. vaginalis</i>	63
Figura 8.12. Efecto de las concentraciones normales en la inmunolocalización de Tv-CatD en <i>T. vaginalis</i>	65
Figura 8.13. Efecto de la restricción de hierro en la inmunolocalización de Tv-CatD en <i>T. vaginalis</i>	68
Figura 8.14. Análisis comparativo del efecto del hierro en la localización nuclear de Tv-CatD en <i>T. vaginalis</i>	70
Figura 8.15. Fraccionamiento celular de <i>T. vaginalis</i> en diferentes condiciones de hierro	73
Figura 8.16. Efecto de la glucosa en la actividad proteolítica de Tv-CatD de extractos totales de <i>T. vaginalis</i>	76
Figura 8.17. Efecto de la glucosa en la actividad proteolítica de Tv-CatD en extractos nucleares de <i>T. vaginalis</i>	78

Figura 8.18. Relación de la actividad proteolítica de Tv-CatD nuclear con respecto a la actividad total de extractos de parásitos cultivados en restricción o alta glucosa a pH 4.5	180
Figura 8.19. Incremento de la actividad de Tv-CatD nuclear a pH 7.0	82
Figura 8.20. Efecto del hierro en la actividad proteolítica de Tv-CatD en extractos totales de <i>T. vaginalis</i>	85
Figura 8.21. Efecto del hierro en la actividad proteolítica de Tv-CatD de extractos nucleares de <i>T. vaginalis</i>	87
Figura 8.22. Relación de la actividad proteolítica de Tv-CatD nuclear con respecto a la total en diferentes condiciones de hierro a pH 4.5	89
Figura 8.23. Incremento de la actividad proteolítica de Tv-CatD nuclear a pH 7.0	91
Figura 8.24. Actividad proteolítica de Tv-CatD de extractos nucleares a pH 7.0 de <i>T. vaginalis</i> cultivada en diferentes condiciones ambientales	93
Figura 8.25. Ensayo de actividad usando a TC-2r como posible sustrato de Tv-CatD	96
Figura 8.26. Electroforesis en doble dimensión del extracto nuclear en la condición de glucosa normal y WB en 2-DE con el anticuerpo anti-Tv-CatD	99
Figura 8.27. Proteoma nuclear en GN, porcentaje de proteínas nucleares asignadas e hipotéticas del total de proteínas identificadas por EM en un extracto nuclear	102
Figura 8.28. Clasificación funcional de las proteínas nucleares de parásitos cultivados en GN identificadas por EM en un extracto nuclear	104
Figura 8.29. Clasificación funcional de las proteínas nucleares de parásitos cultivados en AH identificadas por EM en un extracto nuclear	107
Figura 8.30. Comparación de los proteomas nucleares de parásitos cultivados en GN y AH	109
Figura 9.1. Cromosomas condensados y diferentes fases de la mitosis de <i>T. vaginalis</i>	115
Figura 10.1 Modelo propuesto de la función nuclear de Tv-CatD	122

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1. Clasificación de las proteasas	6
Tabla 1.2. Genes que codifican para proteasas en el genoma de <i>T. vaginalis</i>	8
Tabla 8.1. Dominios funcionales de Tv-CatD	50
Tabla 8.2. Posibles sitios de sumoilación y fosforilación de Tv-CatD	51
Tabla 8.3. Lista de las proteínas con posibilidad de interactuar con Tv-CatD	55

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

°C: grados Celsius
μg: microgramos
μl: microlitro
μm: micrómetros
μM: micromolar
2DE: electroforesis en doble dimensión (por sus siglas en inglés, *two-dimensional gel electrophoresis*)
3D: tridimensional
aa: aminoácido
AG: alta glucosa
AH: alto hierro
APs: aspártico proteasas
Asn: asparagina
Asp: ácido aspártico
ATP: trifosfato de adenosina
BG: baja glucosa
BH: bajo hierro
C: carboxilo terminal
CatB: catepsina B
CatD: catepsina D
CatL: catepsina L
CP: cisteína proteasa
Cu²⁺: catión cobre
Cys: cisteína
D-AMC: MCA- GKPILFFRLK(Dnp)-D-R-NH₂
DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol (*4',6-diamidino-2-phenylindole*)
DNA: ácido desoxirribonucleico (por sus siglas en inglés, *deoxyribonucleic acid*)
DTT: ditioneitol (*Dithiothreitol*)
EC: extracto citoplásmico
EM: espectrometría de masas
EN: extracto nuclear

ET: extracto total
FITC: isotiocianato de fluoresceína (por sus siglas en inglés, *Fluorescein IsoTioCyanate*)
G: glicina
g: gramo
Gly: glicina
GN: glucosa normal
GR: restricción de glucosa (*glucose restriction*)
h: hora
H₂O: agua
Hb: hemoglobina
HCl: ácido clorhídrico
HG: alta glucosa (*high glucose*)
HIV: virus de la inmunodeficiencia humana (por sus siglas en inglés, *human immunodeficiency virus*)
HK: hexocinasa
IgA: inmunoglobulina A
IgG: inmunoglobulina G
K: lisina
kDa: kilodaltones
L: litro
M: molar
M6-P: manosa 6-fosfato
mg: miligramo
min: minutos
ml: mililitro
mM: milimolar
MPT: modificaciones postraduccionales
N: amino terminal
NaOH: hidróxido de sodio
NC: nitrocelulosa
NH: hierro normal
nm: nanómetros
NTF2: Factor de Transporte Nuclear 2 (por sus siglas en inglés, *Nuclear Transport Factor 2*)
OMS: Organización Mundial de la Salud
PBS: amortiguador salino de fosfatos
PBS-T: amortiguador salino de fosfatos/Tween 20
pH: potencial de hidrógeno
R: arginina
r: coeficiente de correlación de Pearson
RE: retículo endoplásmico
RNA: ácido ribonucleico (por sus siglas en inglés, *ribonucleic acid*)
rpm: revoluciones por minuto
RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (por sus siglas en inglés, *reverse transcription polymerase chain reaction*)
s: segundos

S: serina
SAF: factor asociado a espermatogénesis (por sus siglas en inglés, *spermatogenesis-associated factor*)
SBA: suero bovino adulto
SDS: dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (por sus siglas en inglés, *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)
SEN: secuencia de exporte nuclear
Ser: serina
SLN: secuencia de localización nuclear
SPI: suero preinmune
sub: subunidad
T: treonina
TA: temperatura ambiente
TBS: amortiguador Tris salino
TBS-T: amortiguador Tris salino/Tween 20
TC-2r: tricocistatina 2 recombinante
TCA: ácido tricloroacético
Thr: treonina
TLCK: Tosil-L-lisina clorometilcetona (*Tosyl-L-lysyl-chloromethane hydrochloride*)
Tv-CatD: catepsina D de *Trichomonas vaginalis*
TvLG: lipoglicano de *Trichomonas vaginalis*
URF: unidades relativas de fluorescencia
V: voltio
WB: western blot
Y: tirosina

RESUMEN

Trichomonas vaginalis, agente causal de la tricomoniasis humana, posee diversos factores de virulencia que le permiten parasitar los tejidos humanos, como adhesinas, fosfolipasas, porinas y proteasas, entre otros. Recientemente, se describió a una aspártico proteasa tipo catepsina D (Tv-CatD) que se regula positivamente por glucosa, degrada hemoglobina humana, se secreta *in vitro* y presenta múltiples localizaciones intracelulares: citoplasma, lisosomas, aparato de Golgi, retículo endoplásmico, vacuolas y núcleo. En este trabajo se estudió la localización nuclear de la Tv-CatD en parásitos cultivados en diferentes condiciones de glucosa y de hierro mediante inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal, así como por fraccionamiento celular y western blot. Además, se evaluó la posible función enzimática de la Tv-CatD nuclear mediante cinéticas enzimáticas usando un sustrato sintético fluorogénico a pH 4.5 y 7.0. Los resultados mostraron que la localización nuclear de la Tv-CatD es mayor en las condiciones de alta glucosa y de alto hierro. La Tv-CatD se regula positivamente por hierro a nivel de proteína. También, la Tv-CatD nuclear presenta actividad proteolítica que es influenciada por las condiciones ambientales, siendo mayor en la condición de restricción de hierro a pH 7.0. Sin embargo, en la condición de alto hierro, donde se observó mayor cantidad de proteína nuclear, la actividad enzimática fue muy escasa a pH 4.5 y aún menor a pH 7.0. Los datos anteriores sugieren que la Tv-CatD se localiza en el núcleo de *T. vaginalis* de manera dependiente de las condiciones ambientales, donde realiza una función enzimática, aunque aún se desconocen sus proteínas blanco. Sin embargo, no se descarta que Tv-CatD también posea una función no enzimática en el núcleo.

ABSTRACT

Trichomonas vaginalis, the causal agent of trichomoniasis, has several virulence factors that enable it to parasitize the human tissues, such as adhesins, phospholipases, porins and proteases, among others. A cathepsin D-like aspartic proteinase (Tv-CatD) was recently described. It is positively regulated by glucose, degrades human hemoglobin, it is secreted *in vitro*, and presents multiple subcellular localizations in cytoplasm, lysosomes, Golgi apparatus, endoplasmic reticulum, vacuoles, and in the nucleus. The goal of this work was to study the nuclear localization of Tv-CatD in parasites grown under different glucose and iron conditions by indirect immunofluorescence and confocal microscopy, as well as by cell fractionation and western blot. Additionally, the nuclear Tv-CatD proteolytic activity was evaluated by enzymatic kinetics using a synthetic fluorogenic substrate at pH 4.5 and 7.0. The results indicated that Tv-CatD is positively regulated by iron at the protein level. Also, the nuclear Tv-CatD is more abundant in the high glucose and high iron conditions. In addition, the nuclear Tv-CatD showed proteolytic activity and it was influenced by environmental conditions, being higher in the iron restriction condition at pH 7.0. However, in the high iron condition, in spite that a greater amount of nuclear protein was observed, the enzymatic activity was very low at pH 4.5 and even lower at pH 7.0. These results suggest that Tv-CatD is localized in the nucleus of *T. vaginalis* depending of the environmental conditions, where it performs an enzymatic function. However, its target proteins are still unknown. Interestingly, the Tv-CatD non-enzymatic regulatory function in the nucleus of *T. vaginalis* is not discarded yet.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Tricomoniasis

La tricomoniasis es la infección de transmisión sexual no viral más común en el mundo de acuerdo con los datos de la OMS, 2012 (Menezes *et al.*, 2016; Hirt y Sherrard, 2015). Esta infección es causada por el protozooario *Trichomonas vaginalis*. *T. vaginalis* es un parásito del humano que coloniza principalmente el epitelio escamoso del tracto urogenital y tiene un periodo de incubación que va de 4 a 28 días (Petrin *et al.*, 1998). *T. vaginalis* también puede causar conjuntivitis (Abdolrasouli *et al.*, 2013) e infecciones pulmonares (Duboucher *et al.*, 2003; Carter y Whithaus, 2008; Temesvári *et al.*, 2002).

La tricomoniasis es una infección crónica no mortal, que es considerada un factor de riesgo para problemas de salud mayores como parto prematuro (Leitsch, 2016) por ruptura prematura de las membranas placentarias y recién nacidos de bajo peso (Petrin *et al.*, 1998; Bachmann *et al.*, 2011). También es un factor para la transmisión y adquisición del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (Hirt y Sherrard, 2015; McClelland *et al.*, 2007; Van Der Pol *et al.*, 2008). Además de aumentar la susceptibilidad a desarrollar neoplasias en próstata y en cérvix (Leitsch, 2016; Gram *et al.*, 1992; Kharsany *et al.*, 1993; Zhang y Begg, 1994).

Tanto hombres como mujeres se infectan de manera comparable con *T. vaginalis* (Leitsch, 2016). La tricomoniasis en los hombres suele ser asintomática, por lo que se consideran los portadores del parásito (Petrin *et al.*, 1998). Cuando se presentan síntomas en los hombres suelen ser leves y el sistema inmune acaba con la infección en cuestión de semanas. Sin embargo, puede haber complicaciones como uretritis, prostatitis, epididimitis e incluso infertilidad (Kissinger, 2015; Hirt y Sherrard, 2015). En las mujeres, la infección puede persistir por años y los síntomas comunes son prurito, inflamación de la vagina y del cuello uterino, flujo vaginal espumoso de olor desagradable y de color amarillo o verde y dolor abdominal (Kissinger, 2015). Aproximadamente el 2% de las pacientes presentan pequeños puntos hemorrágicos en la mucosa vaginal y cervical que da un aspecto de fresa

conocido como “cérvix de fresa” (Petrin *et al.*, 1998; Kissinger, 2015). También puede haber casos en los que no se presentan síntomas en las mujeres y estos representan hasta un 80% (Petrin *et al.*, 1998; Leitsch, 2016; Kissinger, 2015).

1.2. *Trichomonas vaginalis*

T. vaginalis es un protozoo flagelado anaerobio/microaerófilo (Leitsch, 2016), agente etiológico de la tricomoniasis (Menezes *et al.*, 2016). El parásito urogenital posee una forma piriforme (Figura 1.1A) con un tamaño promedio de 10-20 μm de longitud y de 2-14 μm de ancho (Kissinger, 2015). Las condiciones fisicoquímicas alteran la apariencia del parásito, por lo que puede adoptar una forma ameboide cuando se adhiere a las células epiteliales vaginales (Petrin *et al.*, 1998) (Figura 1.1B), pero también puede presentar una forma de pseudoquiste bajo condiciones desfavorables en las que *T. vaginalis* se redondea e internaliza sus flagelos (Arroyo *et al.*, 1993; Petrin *et al.*, 1998; Kusdian y Gould, 2014; Pereira-Neves *et al.*, 2003) como en las condiciones de bajo hierro (Dias-Lopes *et al.*, 2017) (Figura 1.1C).

T. vaginalis posee cinco flagelos: cuatro de ellos se encuentran localizados en la porción anterior del parásito y el otro se encuentra adosado a la membrana ondulante (Figura 1.2). Tanto los flagelos como la membrana ondulante brindan la capacidad de movimiento al parásito (Hirt y Sherrard, 2015; Petrin *et al.*, 1998). Este protozoo es un organismo amitocóndriado, es decir, carece de mitocondrias, pero en su lugar posee hidrogenosomas (Figura 1.2). Al igual que las mitocondrias, los hidrogenosomas poseen una doble membrana y producen ATP, pero por fosforilación a nivel de sustrato (Petrin *et al.*, 1998) y carecen de DNA.

Como ya se mencionó, *T. vaginalis* infecta el tracto urogenital de hombres y de mujeres parasitando el epitelio escamoso y provoca prostatitis o vaginitis. Para poder parasitar los tejidos el parásito posee diversos factores de virulencia como: adhesinas, fosfolipasas, mucinasas, TvLG, porinas, proteasas, entre otros (Hernández *et al.*, 2014; Hirt y Sherrard, 2015; Leitsch, 2016; Petrin *et al.*, 1998).

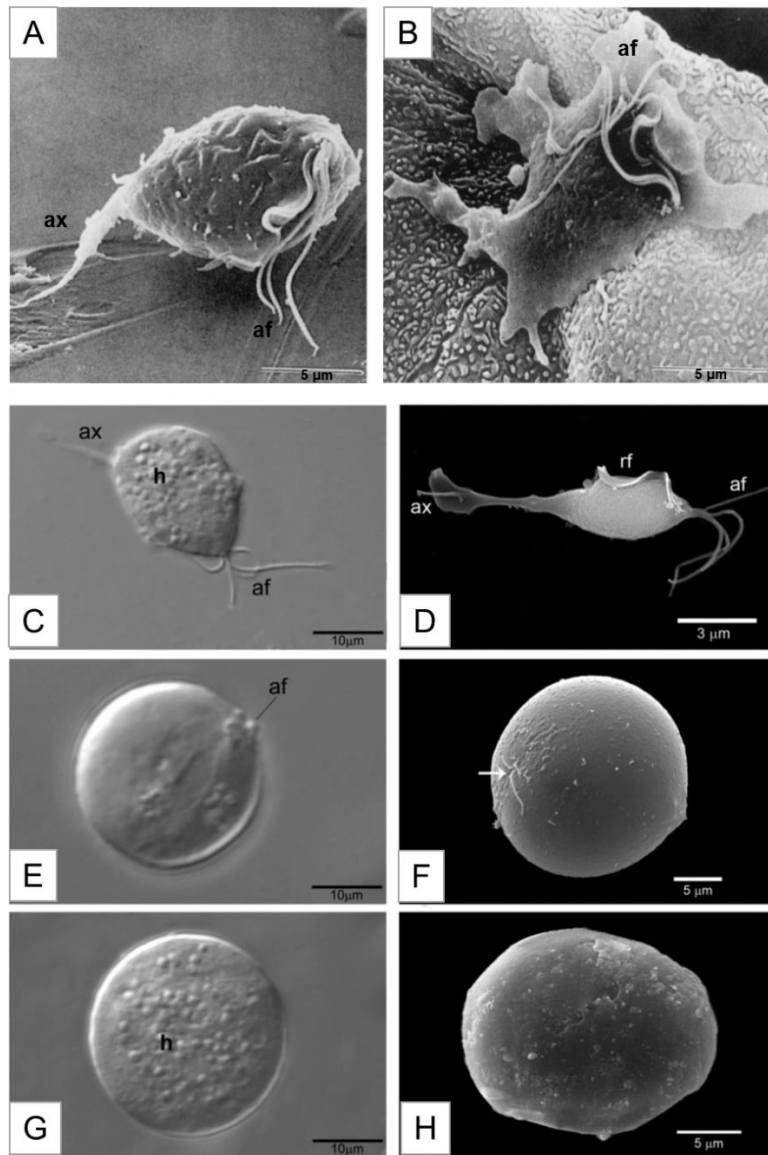


Figura 1.1. Morfología de *Trichomonas vaginalis*. A), C) y D) Morfología piriforme del parásito en cultivo. B) Morfología ameboide de *T. vaginalis* en cocultivo celular. E-H) Parásitos cultivados en condiciones de bajo hierro, con morfología esférica a diferentes estados de la internalización del flagelo (E, F) y pseudoquistes típicos con los flagelos internalizados (G, H). La flecha en F indica la internalización de los flagelos. ax: axostilo; af: flagelos anteriores; h: hidrogenosomas. (Modificada de Arroyo *et al.*, 1993; Petrin *et al.*, 1998 y Dias-Lopes *et al.*, 2017).

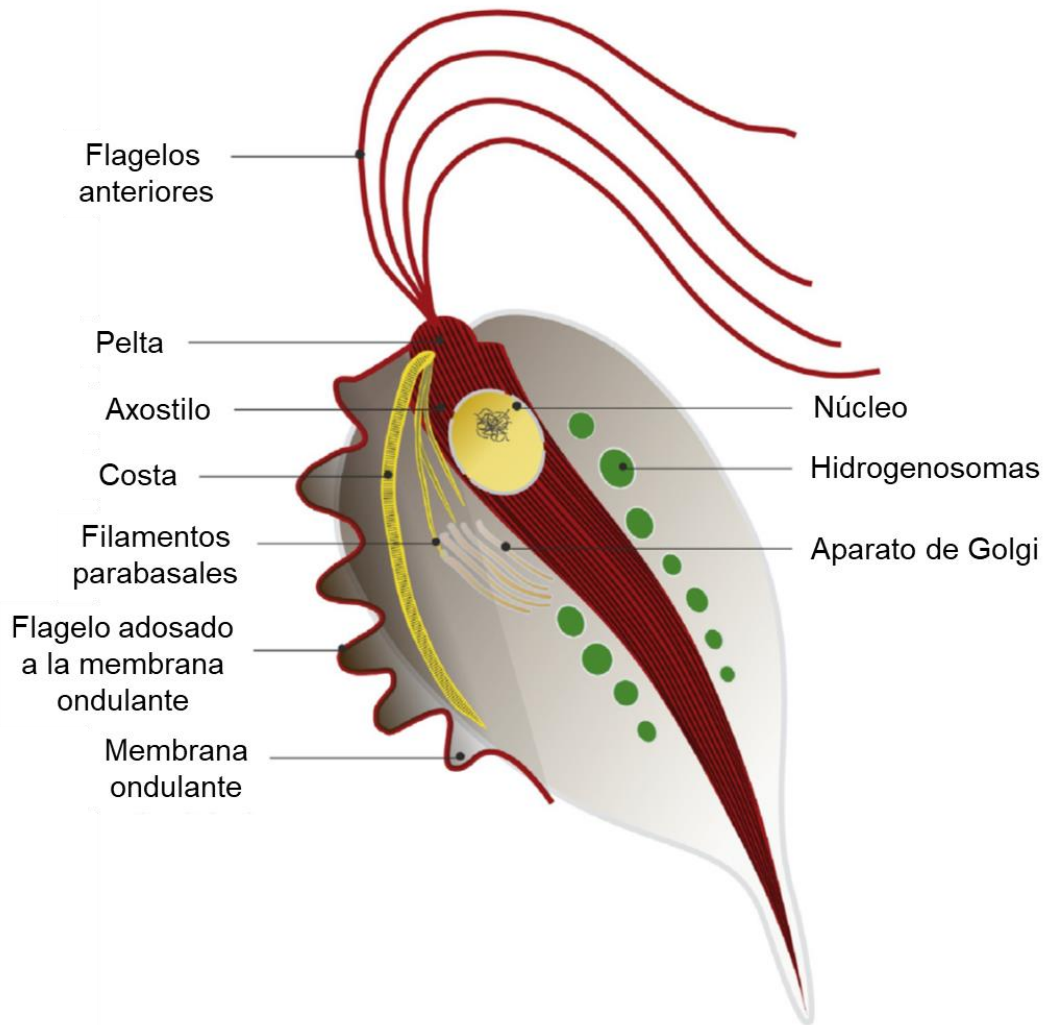


Figura 1.2. Ilustración de *Trichomonas vaginalis*. Morfología general de *T. vaginalis*. El parásito posee cuatro flagelos anteriores y uno adosado a la membrana ondulante que posee un organelo como soporte denominado costa. Además, se muestra al axostilo, al núcleo, a los filamentos parabasales, al aparato de Golgi y a los hidrogenosomas. (Tomado de Preisner *et al.*, 2016).

1.3. Proteasas

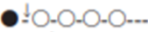
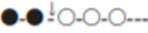

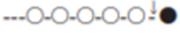
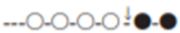


Las proteasas, peptidasas o proteinasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos, es decir son proteínas capaces de hidrolizar a otras proteínas o péptidos (Santos *et al.*, 2013). Estas proteínas se encuentran en los tres dominios de la vida: *Eukarya*, *Bacteria* y *Archaea* e incluso en los virus (López-Otín y Bond, 2018) y se clasifican de acuerdo con los aminoácidos del sitio catalítico (Kay *et al.*, 2011), dependiendo de la naturaleza del residuo nucleófilo que participa en la reacción catalítica en: aspártico, cisteína, metalo, serina, treonina, glutámico y asparagina proteasas. También se pueden clasificar de acuerdo con el tipo de reacción que catalizan en: endopeptidasas y exopeptidasa; o por la relación evolutiva a nivel estructural (Barrett, 1994; Rao *et al.*, 1998) (Tabla 1.1).

Las proteasas tienen una amplia gama de funciones en todos los organismos porque participan en procesos fisiológicos y patológicos en los vertebrados (Dunn, 2002), en procesos de senescencia, respuesta al estrés (Simões y Faro, 2004) y en la defensa contra patógenos en las plantas (Xia *et al.*, 2004). En cambio, las proteasas en los organismos patógenos facilitan la infección a los tejidos del huésped, ya que funcionan como factores de virulencia y ayudan contra la evasión de la respuesta inmune del huésped (López-Otín y Bond, 2008; Coombs *et al.*, 2001).

Las proteasas juegan un papel relevante en la patogenia de *T. vaginalis* ya que participan en procesos como la lisis de eritrocitos, adherencia a células epiteliales, degradación de inmunoglobulinas de tipo IgG e IgA (Petrin *et al.*, 1998), degradación de componentes de matriz extracelular, entre otras (Kusdian y Gould, 2017; Hernández *et al.*, 2014).

T. vaginalis presenta altos niveles de actividad proteolítica, principalmente por cisteína proteasas (Hernández *et al.*, 2014). El parásito posee ~446 genes que codifican para proteasas entre los cuales se encuentran cisteína proteasas, metaloproteasas, serina proteasas, treonina proteasas y aspártico proteasas, de acuerdo con la clasificación del sitio catalítico (Tabla 1.2) (Carlton *et al.*, 2007).

Tabla 1.1. Clasificación de las proteasas

Proteasa	Modo de acción	EC no.
Exopeptidasas		
Aminopeptidasas		3.4.11
Dipeptidil peptidasas		3.4.14
Tripeptidil peptidasas		3.4.14
Carboxipeptidasas		3.4.16-3.4.18
Proteasas tipo serina		3.4.16
Metaloproteasas		3.4.17
Proteasas tipo cisteína		3.4.18
Peptidil dipeptidasas		3.4.15
Dipeptidasas		3.4.13
Omega peptidasas		3.4.19
Endopeptidasas		
Serina proteasas		3.4.21
Cisteína proteasas		3.4.22
Aspártico proteasas		3.4.23
Metaloproteasas		3.4.24
Endopeptidasas de mecanismo desconocido		3.4.99

Los círculos representan a los aminoácidos en la cadena polipeptídica, los círculos en negro indican a los aminoácidos terminales, mientras que, las flechas indican el sitio de acción de la enzima (Tomada de Rao *et al.*, 1998).

T. vaginalis posee tres familias de aspártico proteasas: A1, A2 y A22, agrupadas en dos clanes (AA y AD) (Carlton *et al.*, 2007). Las APs pueden funcionar como factores de virulencia de los parásitos porque facilitan la infección (Santos *et al.*, 2013; Kay *et al.*, 2011; Coombs *et al.*, 2001).

1.3.1. Aspártico proteasas

Las APs son un tipo de endopeptidasas que presentan dos residuos ácido aspártico en el sitio catalítico y actúan sobre los enlaces peptídicos de las regiones internas del péptido blanco. Estas proteasas tienen actividad hidrolítica a pH ácido, se sintetizan como precursores que carecen de actividad y para activarse sufren procesos de proteólisis autocatalítica (Santos *et al.*, 2013).

Las APs se pueden clasificar en cinco clanes distintos: AA, AC, AD, AE y AF, que se distribuyen en 16 familias diferentes. El clan AA está formado por 8 familias (Santos *et al.*, 2013; Barrett, 1994; Barrett *et al.*, 2003). Dos de las ocho familias que conforman al clan AA son las familias A1 y A2.

Las proteínas de la familia A1 se caracterizan por tener una estructura terciaria conformada por hojas β y por presentar dos dominios similares de tipo barril β que contribuyen a la formación del sitio catalítico (Santos *et al.*, 2013). En cambio, la familia A2 posee un solo dominio barril β por lo que la dimerización de las proteasas forma el sitio activo (Santos *et al.*, 2013). A la familia A1 pertenecen enzimas tipo pepsina como pepsina, catepsina D y E, entre otras (Santos *et al.*, 2013; Barrett *et al.*, 2003).

1.3.1.1. Mecanismo de acción de las APs

Se ha propuesto un mecanismo general para la hidrólisis de proteínas por las aspártico proteasas. Mediante estudios de cristalografía de enzimas de la familia de la pepsina se mostró que son moléculas bilobuladas con el sitio activo localizado entre los lóbulos y cada lóbulo contribuye con un residuo ácido aspártico para el

Tabla 1.2. Genes que codifican para proteasas en el genoma de *T. vaginalis*.

Tipo de proteasa	Número
Cisteína proteasas	220
Metaloproteasas	123
Serina proteasas	80
Treonina proteasas	17
Aspártico proteasas	6
Total	446

(Modificado de Carlton *et al.*, 2007)

sitio catalítico (Benes *et al.*, 2008). Los lóbulos son homólogos por lo que pudieron haber surgido por una duplicación genética (Tang y Wong, 1987). En la mayoría de las enzimas de la familia de la pepsina, los residuos ácido aspártico se encuentran dentro de los motivos Asp-Thr-Gly-Ser/Thr en la región N-terminal y C-terminal. La retropepsina, otra aspártico proteasa de la familia A2, tiene un solo lóbulo que contiene un solo residuo ácido aspártico y para que esta enzima sea activa se requiere de la formación de un homodímero no covalente (Santos *et al.*, 2013).

El mecanismo de acción de las aspártico proteasas involucra una catálisis ácido-base en la que una molécula de agua participa directamente en la reacción y actúa como un nucleófilo. Un aspartato (forma ionizada del ácido aspártico) extrae un protón de molécula de agua, la molécula de agua activada puede atacar entonces al carbono del carbonilo del enlace peptídico del sustrato a escindir, generando un oxianión tetraédrico como intermediario. Tras el rearrreglo de este intermediario, la amida escindible se protona (Figura 1.3). Este mecanismo se ha propuesto en base a estructuras cristalizadas de varias aspártico proteasas en complejo con sus inhibidores (Bjelic y Åqvist, 2006; Neitzel, 2010; Rao *et al.*, 1998; Coombs *et al.*, 2001).

1.3.1.2. Catepsina D

La catepsina D es una AP lisosomal perteneciente a la familia A1 del clan AA que se sintetiza como procatepsina D (forma inactiva) en los ribosomas adosados al retículo endoplásmico (Benes *et al.*, 2008). La catepsina D sufre dos modificaciones postraduccionales en el retículo endoplásmico rugoso: corte proteolítico y glicosilaciones. Después de la eliminación del péptido señal, que ocurre durante la translocación a través de la membrana del retículo endoplásmico rugoso, la procatepsina D de 52 kDa (en humanos) se dirige a lisosomas, endosomas y fagosomas (Benes *et al.*, 2008; Hasilik y Neufeldg, 1984). La procatepsina D tiene 2 N-glicosilaciones (manosa 6-fosfato; M6-P) en los residuos asparagina 70 y 199 (Benes *et al.*, 2008; Fortenberry *et al.*, 1995). En compartimentos ácidos como

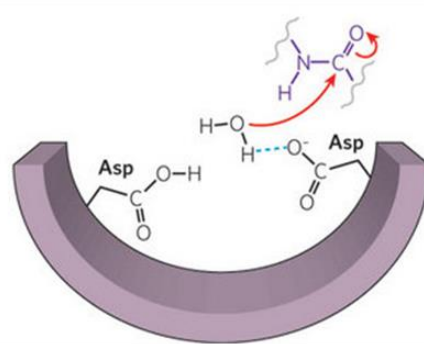
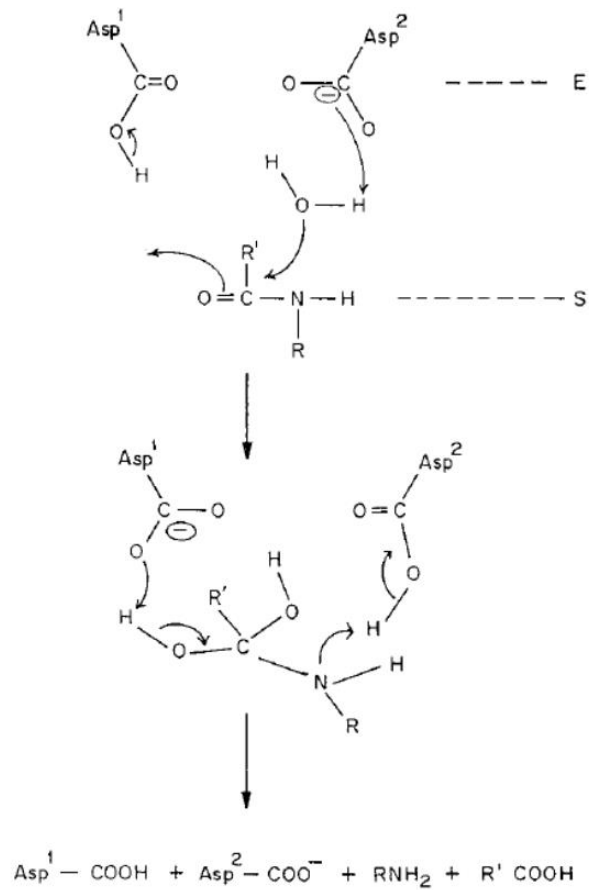
A**B**

Figura 1.3. Mecanismo de acción general para las aspártico proteasas.
(Tomada de Neitzel, 2010 y Rao *et al.*, 1998).

lisosomas y endosomas se lleva a cabo la escisión del propéptido de 44 aminoácidos de la región N-terminal dando como resultado la forma activa intermedia de 48 kDa. Por último, ocurre una escisión proteolítica adicional que no disocia la estructura globular, pero da lugar a una cadena pesada de 34 kDa y una cadena ligera de 14 kDa unidas por interacciones no covalentes. Esta última es la forma activa madura presente en los lisosomas (Benes *et al.*, 2008) (Figura 1.4). La catepsina D hidroliza proteínas en un rango óptimo de pH ácido que va de 3.5 a 5 (Barrett *et al.*, 2013).

La glicosilación de la catepsina D no es requerida para la actividad enzimática o para su plegamiento, pero juega un papel importante para su localización subcelular. La M6-P que le es añadida permite que la catepsina D se localice en lisosomas ya que este organelo posee receptores para M6-P (Barrett *et al.*, 2013).

Estructuralmente, la catepsina D está formada por dos lóbulos divididos por una hendidura del sitio activo en el cual están los dos residuos aspartato catalíticos: Asp33 y Asp231 (Barrett *et al.*, 2013) (Figura 1.5).

La catepsina D participa en varias funciones: degradación de proteínas intracelulares, activación y degradación de hormonas peptídicas y factores de crecimiento, activación de precursores enzimáticos, procesamiento de activadores e inhibidores enzimáticos y regulación de la muerte celular programada (apoptosis) (Benes *et al.*, 2008; Baechle *et al.*, 2006; Conus *et al.*, 2012) y autofagia (Hasui *et al.*, 2011). A la catepsina D se le ha relacionado con diversos procesos patológicos como la enfermedad de Alzheimer, arterioesclerosis y cáncer (Benes *et al.*, 2008; Cataldo *et al.*, 1995; Leto *et al.*, 2004) y también podría participar en el proceso de metástasis (Pranjol *et al.*, 2015).

Además, se ha reportado que la Catepsina D puede tener otras funciones, como es la producción de péptidos antimicrobianos al procesar a la histona H2A no acetilada (Cho *et al.*, 2002); intensifica la represión transcripcional de TRPS1 para regular la progresión del ciclo celular (Bach *et al.*, 2015) y escinde a la histona H3 murina en el proceso de involución de la glándula mamaria (Khalkhali-Ellis *et al.*, 2014).

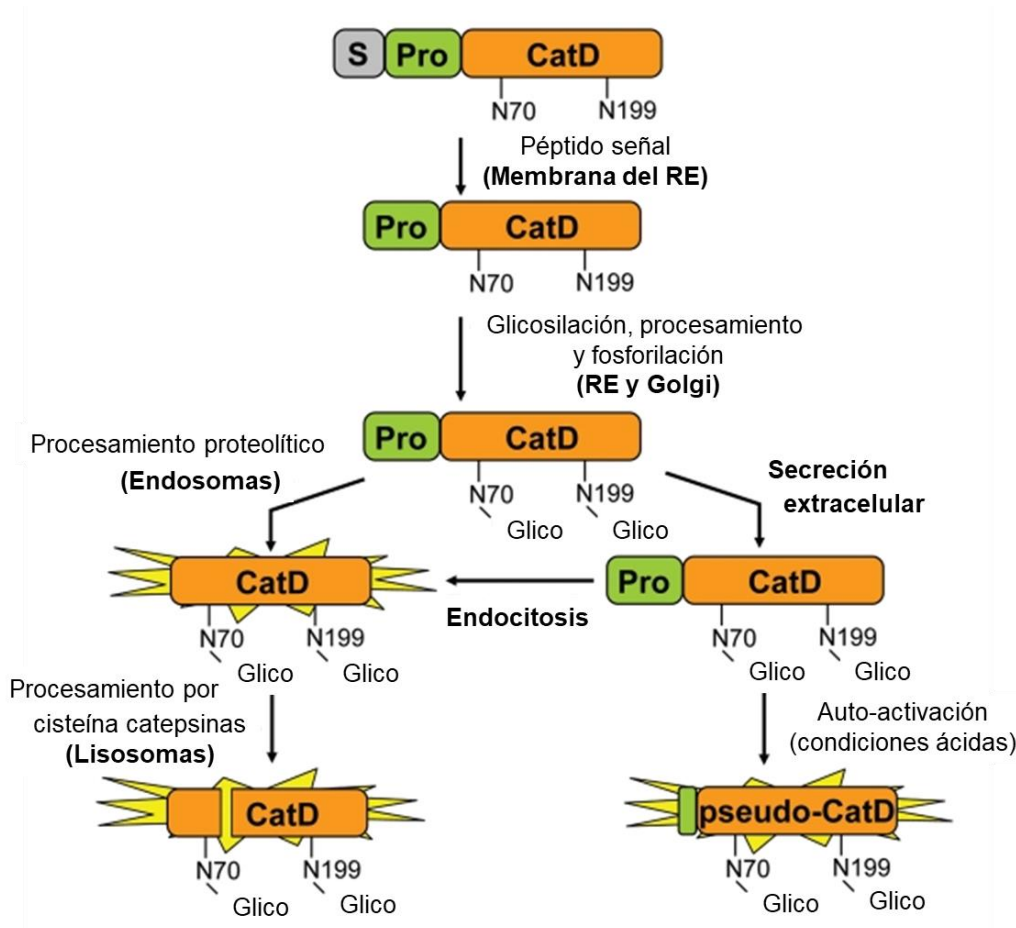


Figura 1.4. Procesamiento y activación de la Catepsina D. La CatD es producida como una preproenzima de 412 aa. El péptido señal de 20 aa es removido durante la translocación cotraduccional a través de la membrana del retículo endoplásmico (RE) generando una pro-CatD proteolíticamente inactiva. En el RE la pro-CatD es glicosilada en los residuos Asn70 y Asn199 (de la CatD madura) y en el aparato de Golgi el residuo de manosa es fosforilado para mediar la localización de la pro-CatD hacia los lisosomas a través de la vía de endosomas. En los endosomas ciertas proteasas remueven el propéptido de 44 aa para generar una sola cadena de la CatD, mientras que en los lisosomas la catepsina B (CatB) y la catepsina L (CatL) procesan a la CatD para generar la forma activa de doble cadena. En algunos tipos celulares la pro-CatD puede ser secretada al medio extracelular donde puede tener funciones extracelulares no catalíticas y en ambientes ácidos puede activarse mediante un corte autoproteolítico en un sitio alternativo de procesamiento para generar a la pseudo-CatD. (Tomada de Radisky, 2010).

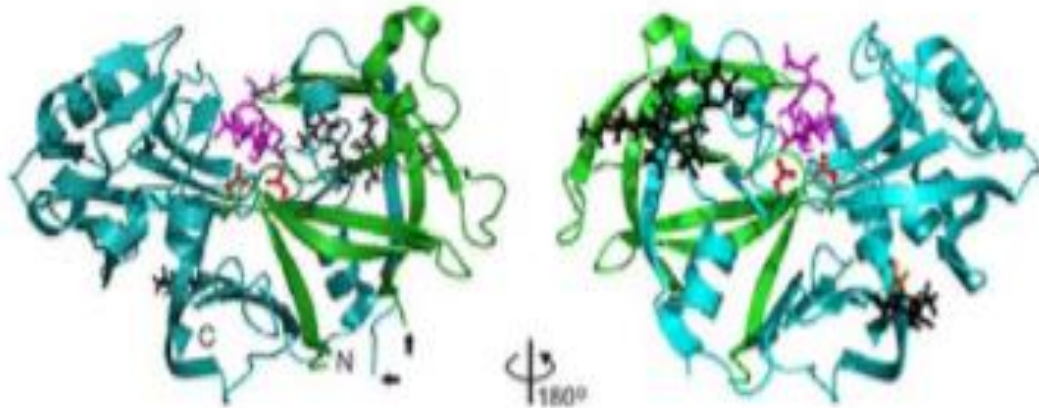


Figura 1.5. Estructura tridimensional de la catepsina D humana. La estructura de la proteasa (representación en listones) está formada por una cadena pesada (cian) y una cadena ligera (verde) derivadas del procesamiento proteolítico. Las flechas indican los sitios de corte durante el proceso proteolítico; los extremos N-terminal y C-terminal están marcados como N y C, respectivamente; los residuos Asp33 y Asp231 del sitio catalítico se muestran en rojo, también se muestra al inhibidor pepstatina A en el sitio catalítico en color magenta; los residuos Asn70 y Asn199 en color naranja son glicosilados (N-glicanos en color negro) (Tomado de Handbook of proteolytic enzymes, 3^o edición, vol. 1).

En los parásitos, las peptidasas tipo catepsina D son factores de virulencia que participan en los mecanismos de tráfico de proteínas de los parásitos apicomplexos, participan en los procesos de penetración del parásito a los tejidos del huésped, en la degradación de la matriz extracelular, ayudan al parásito a evadir la respuesta inmune del huésped, entre otras (Santos *et al.*, 2013; Sojka *et al.*, 2016).

T. vaginalis posee una AP tipo catepsina D (Tv-CatD) perteneciente a la familia A1 del clan AA que parece tener un papel importante como factor de virulencia, ya que es capaz de degradar hemoglobina humana (Mancilla-Olea, Tesis de doctorado 2017; Mancilla-Olea *et al.*, 2018).

2. ANTECEDENTES

La Tv-CatD está formada por 370 aa que corresponden a la proteasa inactiva (zimógeno) con un peso molecular de ~41 kDa. Los primeros 56 aa (~6 kDa) de la región N-terminal corresponden al propéptido. Cuando el propéptido es escindido, la proteasa se activa y tiene un peso molecular de ~35 kDa. La Tv-CatD posee los dos residuos de ácido aspártico característicos del sitio activo, uno localizado en el dominio N-terminal, en la posición 20, y el otro en el dominio C-terminal, en la posición 205 (Mancilla-Olea, Tesis de doctorado 2017; Mancilla-Olea *et al.*, 2018) (Figura 2.1).

Estudios recientes del grupo de trabajo muestran que la expresión de Tv-CatD es regulada positivamente por glucosa. Los transcritos del gen *tv-catd* se sobreexpresan en parásitos que crecen en condiciones de alta glucosa (AG) en comparación con aquellos que crecen en condiciones de restricción de glucosa (RG) (Figura 2.2 A y B) y la cantidad de proteína Tv-CatD en su forma madura se comporta de forma similar al transcrito. En condiciones de AG la cantidad de Tv-CatD incrementa en comparación con la condición de RG (Figura 2.2 C y D) (Mancilla-Olea, Tesis de doctorado 2017; Mancilla-Olea *et al.*, 2018).

Ensayos de inmunofluorescencia indirecta muestran que Tv-CatD se localiza en diferentes regiones subcelulares de *T. vaginalis*: lisosomas, citoplasma, retículo endoplásmico (RE), aparato de Golgi y núcleo (Figura 2.3). Sin embargo, las diferentes localizaciones subcelulares podrían estar influenciadas por glucosa, ya que se observa un incremento de la intensidad de fluorescencia en el citoplasma en parásitos cultivados en alta glucosa en comparación con los cultivados en restricción de glucosa (Figuras 2.3A y 2.4). Además, en parásitos cultivados en alta glucosa Tv-CatD se localiza también de forma perinuclear, posiblemente RE, mientras que en parásitos cultivados en restricción de glucosa se localiza principalmente en el núcleo y aparato de Golgi. También, ensayos de secreción *in vitro* mostraron que *T. vaginalis* secreta a la Tv-CatD cuando se cultiva en diferentes concentraciones de glucosa (Mancilla-Olea, Tesis de doctorado 2017; Mancilla-Olea *et al.*, 2018). Estos

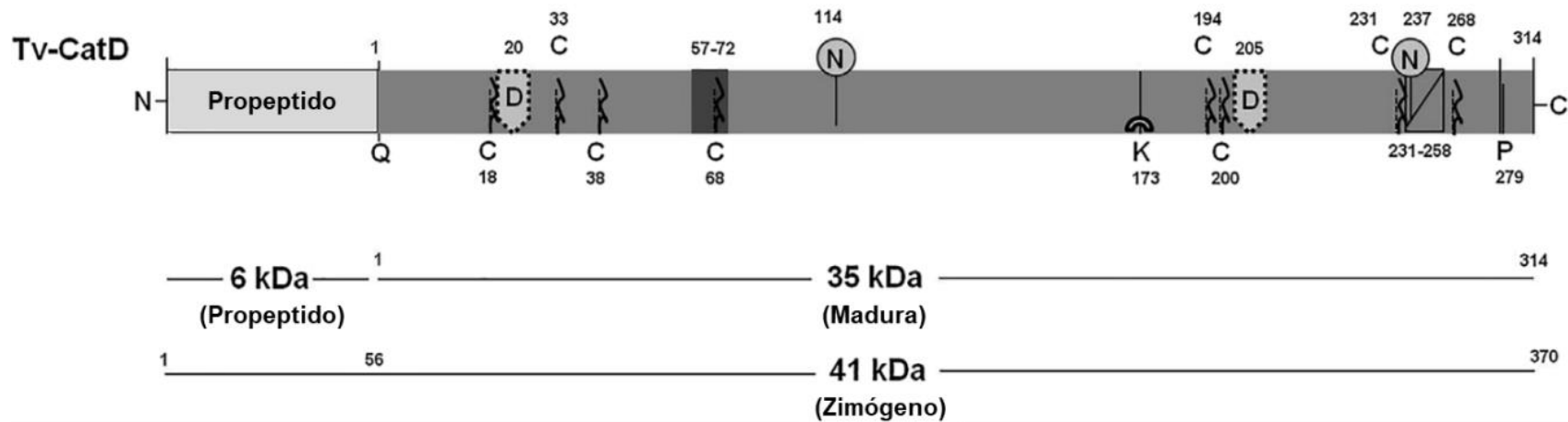


Figura 2.1. Esquema del zimógeno de la aspártico proteasa tipo catepsina D de *T. vaginalis*. El zimógeno corresponde a una secuencia de 370 aa (41 kDa), el propeptido a 56 aa (6 kDa) y la forma madura a 314 aa (35 kDa). Los residuos Asp20 y Asp205 (recuadros grises claro en la forma madura) conforman al sitio catalítico mientras que los Asn114 y Asn237 (círculos) son los posibles sitios de glicosilación. Además, posee ocho residuos Cys (C) que podrían estar formando cuatro puentes disulfuro. (Tomado de Mancilla-Olea *et al.*, 2018).

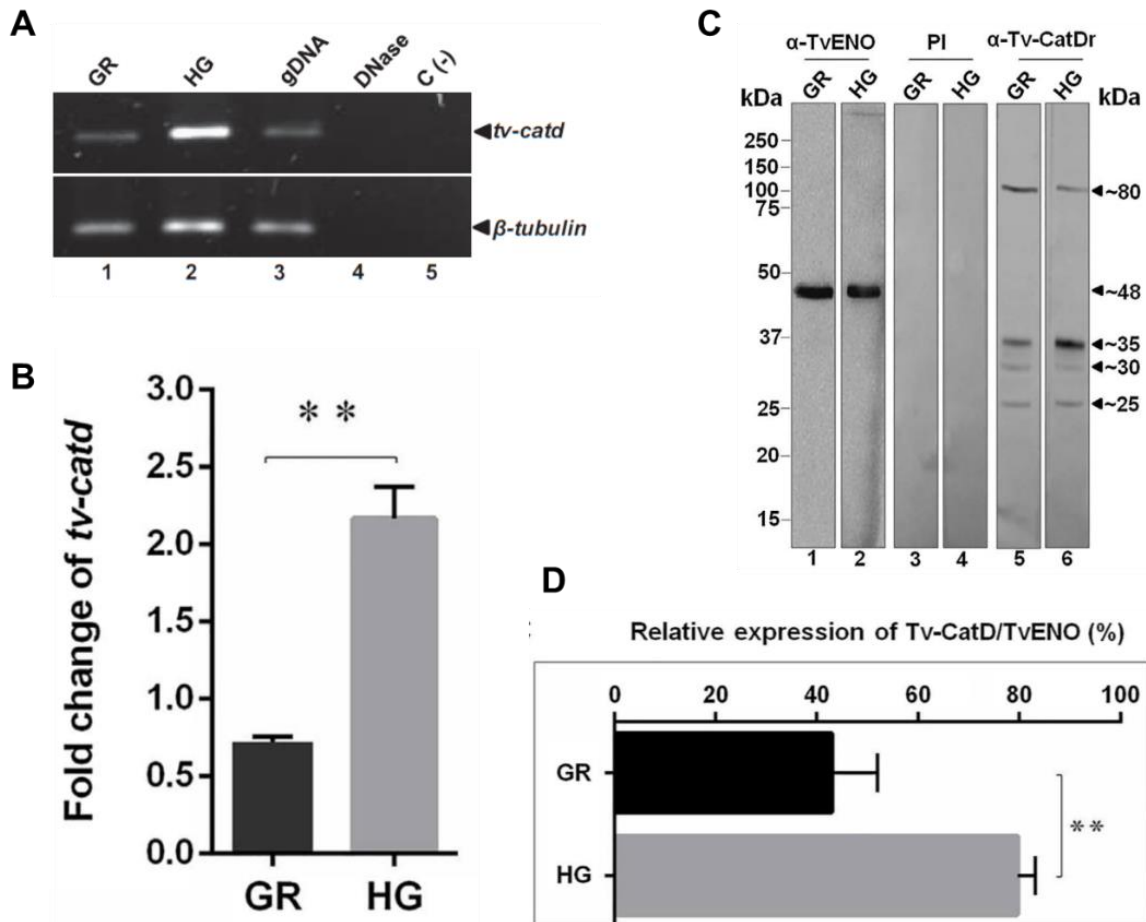


Figura 2.2. Efecto de la glucosa en la expresión de la Tv-CatD. A) RT-PCR cuantitativa del gen *tv-catd* en cDNA de parásitos cultivados en restricción (GR) y alta glucosa (HG), *β-tubulina* fue usado como control. B) Análisis densitométrico del ensayo de RT-PCR cuantitativa. C) Ensayo de western blot con el anticuerpo anti-Tv-CatDr en extractos de parásitos cultivados en GR y HG (carriles 5 y 6), anticuerpo anti-TvENO como control de carga (carril 1 y 2) y suero preinmune como control negativo (carriles 3 y 4). D) Análisis densitométrico, la cantidad de proteína de la Tv-CatD madura se normalizó con base en los niveles de la TvENO (Tomado de Mancilla-Olea *et al.*, 2018).

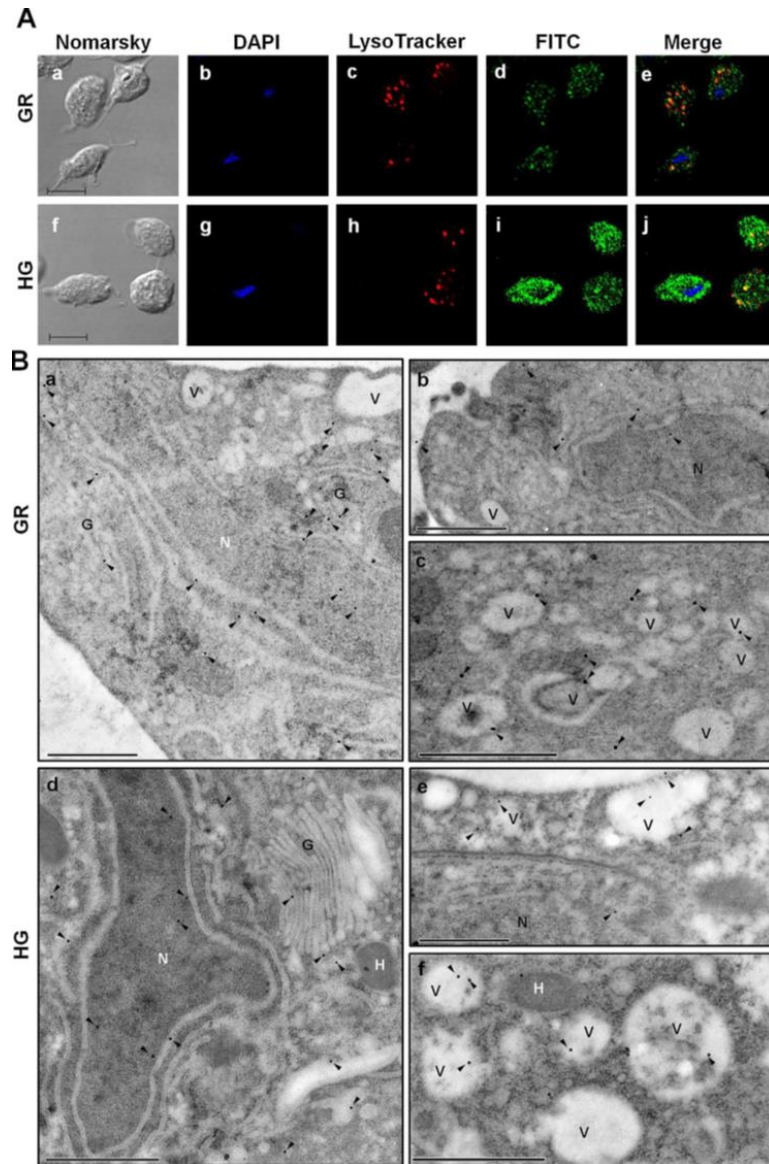


Figura 2.3. Múltiples localizaciones intracelulares de Tv-CatD en *T. vaginalis*.

A) Microscopía confocal de ensayos de inmunofluorescencia indirecta de parásitos cultivados en restricción (GR, a-e) y alta glucosa (HG, f-j). Localización de Tv-CatD marcada con FITC (verde), núcleos con DAPI (azul), lisosomas con LysoTracker (rojo). La colocalización con los lisosomas se muestra en amarillo. B) Microscopía electrónica de transmisión de parásitos cultivados en GR (a-c) y HG (d-f). La Tv-CatD se etiquetó con partículas de oro. Las cabezas de flecha muestran la inmunodetección de la Tv-CatD en vacuolas (V), aparato de Golgi (G), retículo endoplásmico (ER), alrededor del núcleo y en el núcleo (Tomado de Mancilla-Olea *et al.*, 2018).

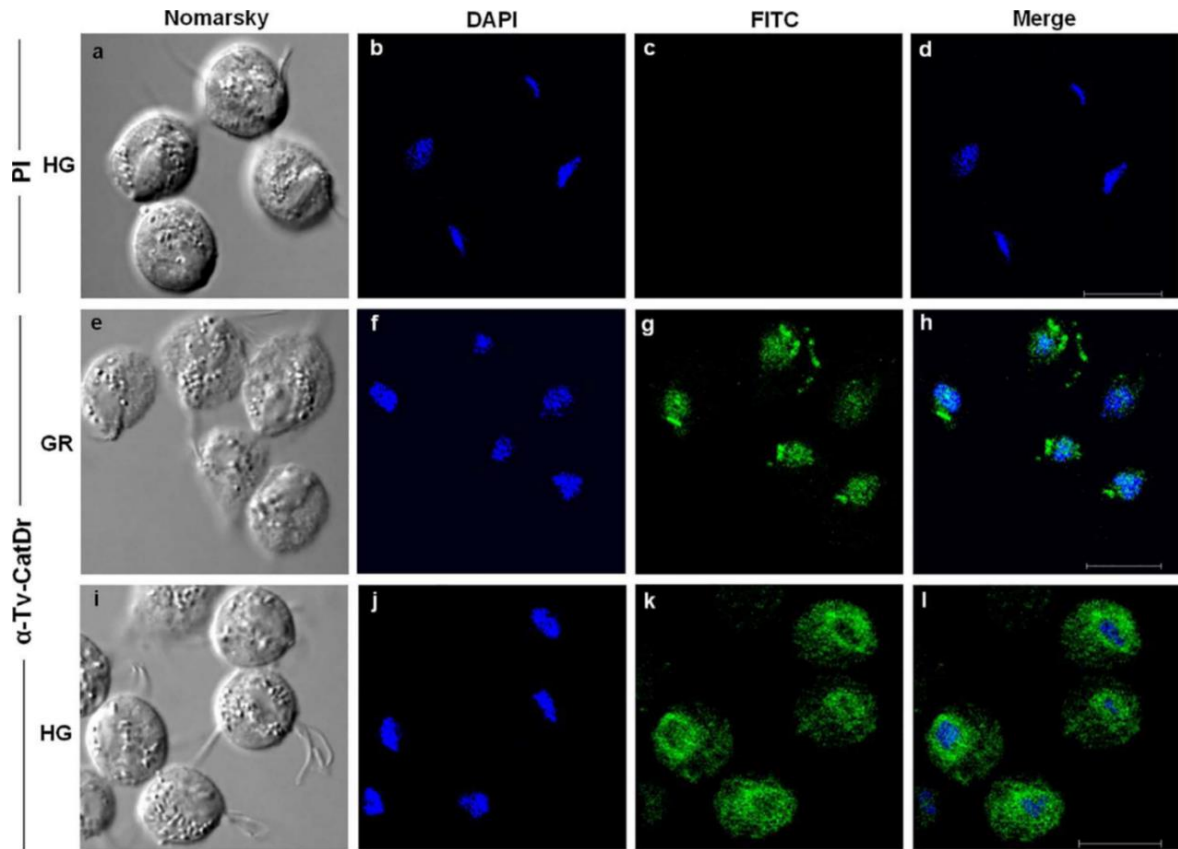


Figura 2.4. Localización intracelular de Tv-CatD en *T. vaginalis*. Ensayos de inmunofluorescencia indirecta y Nomarsky (a, e, i) de parásitos cultivados en alta (HG, b-d y j-l) y restricción de glucosa (GR, f-h). Localización de Tv-CatD marcada con FITC (verde), núcleos con DAPI (azul). La colocalización de la Tv-CatD con los núcleos se muestra en cian. Parásitos incubados con el suero preinmune como control negativo (Tomado de Mancilla-Olea *et al.*, 2018).

datos sugieren que esta AP se secreta en el huésped durante la infección. Asimismo, Tv-CatD es capaz de degradar hemoglobina (Hb) humana, tanto en restricción como en alta glucosa (Figura 2.5). Por lo que se sugiere que esta enzima participa en el proceso de degradación de Hb durante la infección, posiblemente durante la hemólisis. Todas estas evidencias dejan interrogantes acerca del papel que Tv-CatD pudiera tener como factor de virulencia e incluso si pudiera estar relacionada con cáncer.

Como se observa en la Figura 2.2, el anticuerpo policlonal anti-Tv-CatD reconoció una banda en ~80 kDa, este reconocimiento también se observó en el WB de los productos de secreción (datos no mostrados). Mediante espectrometría de masas (EM), en esta región se identificó a un factor asociado a espermatogénesis (SAF, *spermatogenesis associated factor*). Dado que el factor pertenece a la familia de las ATPasas AAA y que miembros de las ATPasas AAA y las aspártico proteasas están relacionadas evolutivamente a nivel estructural, se propuso que SAF podría compartir algún dominio estructural con Tv-CatD que pudiera explicar la reactividad cruzada en los ensayos de WB (Mancilla-Olea *et al.*, 2018).

Hasta el momento se desconocen las funciones que Tv-CatD pudiera tener en las “localizaciones atípicas”, particularmente en la localización nuclear. También, se desconoce si alguna otra condición de cultivo, como diferentes concentraciones hierro, pudiera contribuir a las diferentes localizaciones de Tv-CatD. Por lo que en este trabajo se analizó la localización nuclear de Tv-CatD en diferentes condiciones de glucosa y de hierro y la posible función nuclear que pudiera desempeñar en este organelo celular.

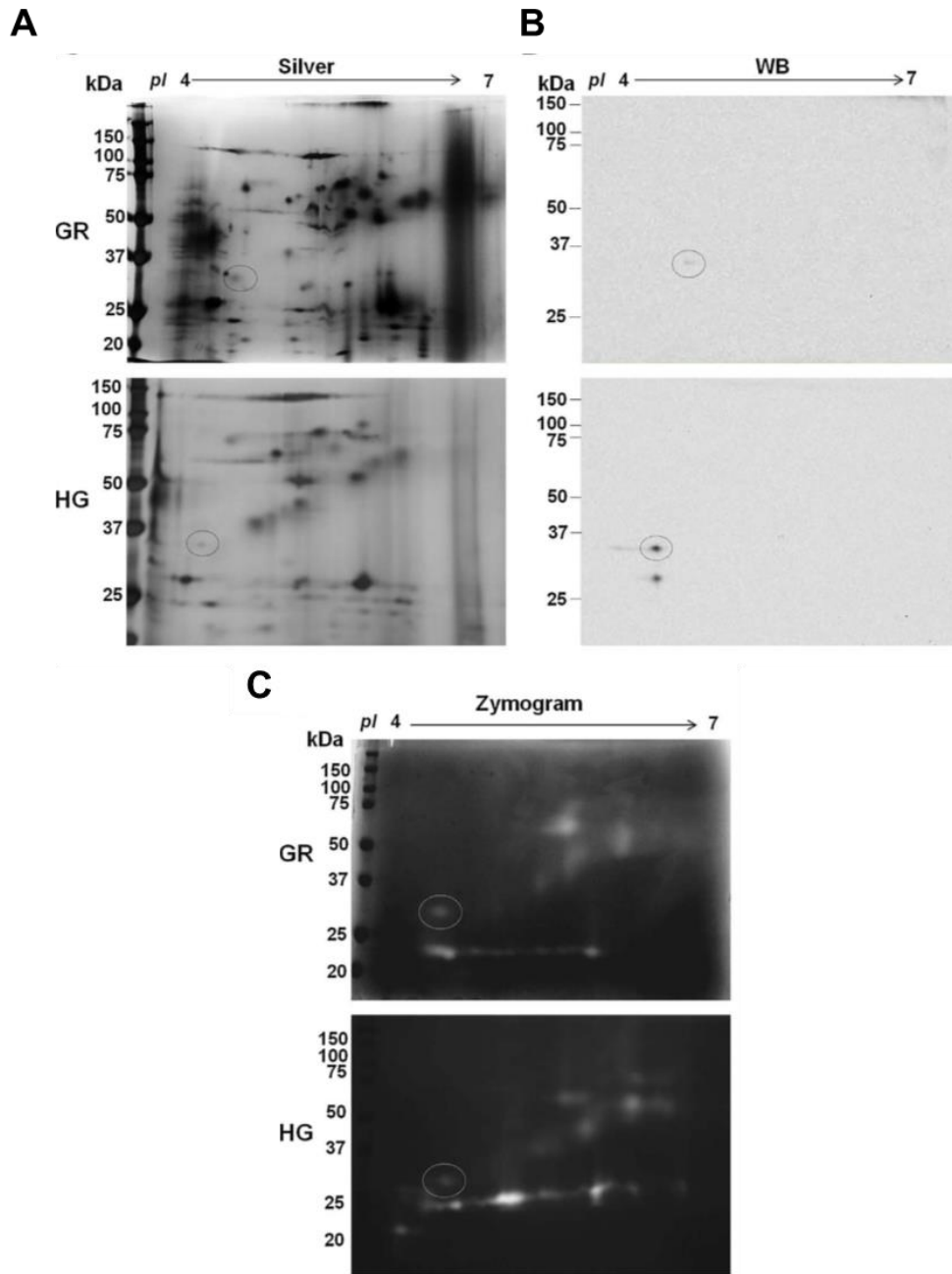


Figura 2.5. Tv-CatD degrada hemoglobina humana. El degradoma de *T. vaginalis* de las condiciones de restricción (RG) y alta glucosa (HG) se analizó mediante electroforesis en doble dimensión (2-DE). A) Geles 2-DE teñidos con plata. B) WB con anticuerpo anti-Tv-CatD. C) Zimograma 2-DE en geles copolimerizados con hemoglobina humana. La actividad proteolítica de Tv-CatD en extractos resistentes a proteasas de parásitos cultivados en GR y HG se muestra como una mancha blanca dentro del círculo (Tomado de Mancilla-Olea *et al.*, 2018).

3. JUSTIFICACIÓN

La catepsina D es una aspártico-proteasa lisosomal que, en parásitos, se considera como factor de virulencia porque degrada proteínas del hospedero como proteínas de matriz extracelular, proteínas séricas, hemoglobina, entre otras y participa en la evasión de la respuesta inmune. También se ha mostrado que la Catepsina D se localiza en el núcleo celular donde tiene actividad proteolítica sobre la histona H3, se une a factores de transcripción y es transportada a este organelo por cotransporte.

Estudios recientes han mostrado que una aspártico proteasa tipo catepsina D de *T. vaginalis*, Tv-CatD, se secreta al medio, degrada hemoglobina humana y se localiza en lisosomas, citoplasma, aparato de Golgi y en RE. Además, tiene una localización nuclear atípica que es más evidente en condiciones de restricción de glucosa; sin embargo, se desconoce su función o posibles funciones nucleares, así como el mecanismo de translocación nuclear. Es por eso que en este trabajo se realizó un análisis de la posible función nuclear de Tv-CatD y se comenzó a explorar el mecanismo de translocación nuclear mediante análisis *in silico*.

4. HIPÓTESIS

La aspártico proteasa tipo catepsina D de *Trichomonas vaginalis* (Tv-CatD) se localiza en el núcleo dependiendo de las condiciones ambientales y tiene actividad enzimática nuclear.

5. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

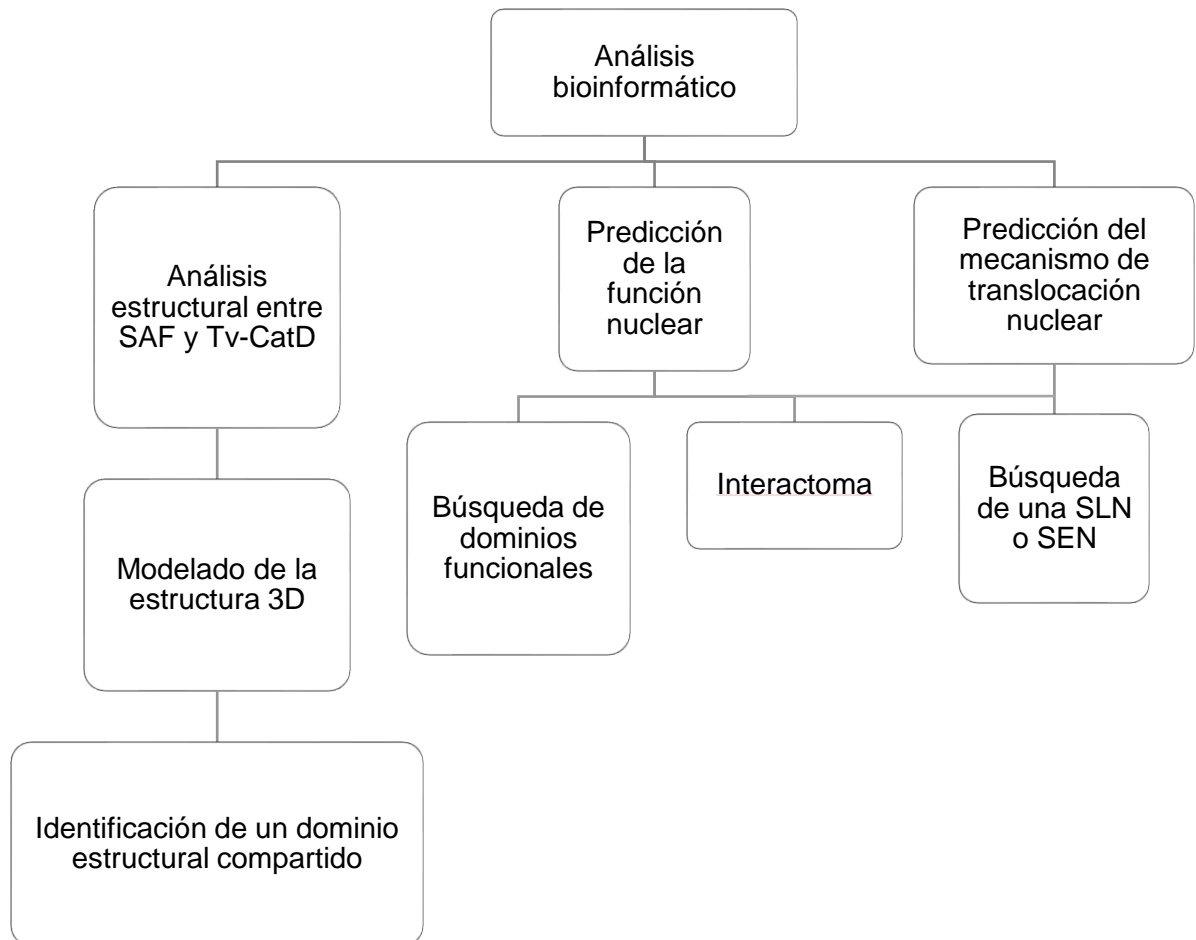
Confirmar la localización nuclear, así como analizar la posible función enzimática nuclear de la Tv-CatD en *T. vaginalis*.

2. OBJETIVOS PARTICULARES

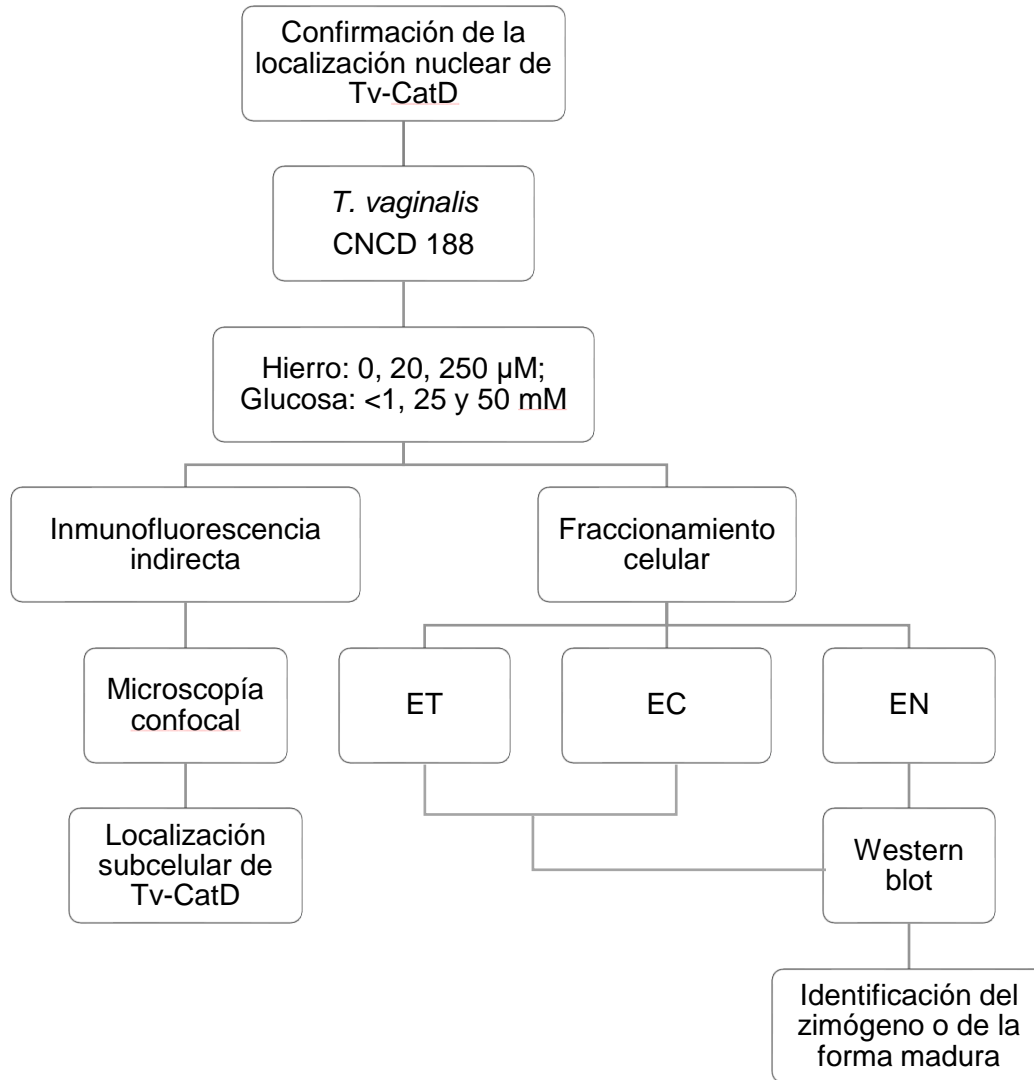
- I. Realizar un análisis bioinformático para:
 - a) Identificar el dominio estructural compartido entre SAF y Tv-CatD
 - b) Identificar dominios funcionales en la Tv-CatD, así como un interactoma para predecir sus posibles funciones nucleares.
 - c) Identificar una secuencia de localización nuclear, así como posibles interacciones con otras proteínas que permita predecir el mecanismo de translocación nuclear.
- II. Confirmar la localización nuclear de Tv-CatD en diferentes concentraciones de glucosa y de hierro e identificar las formas de Tv-CatD presentes en el núcleo.
- III. Explorar la posible función enzimática de Tv-CatD en el núcleo de *T. vaginalis*.
- IV. Obtener el proteoma nuclear de *T. vaginalis*.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

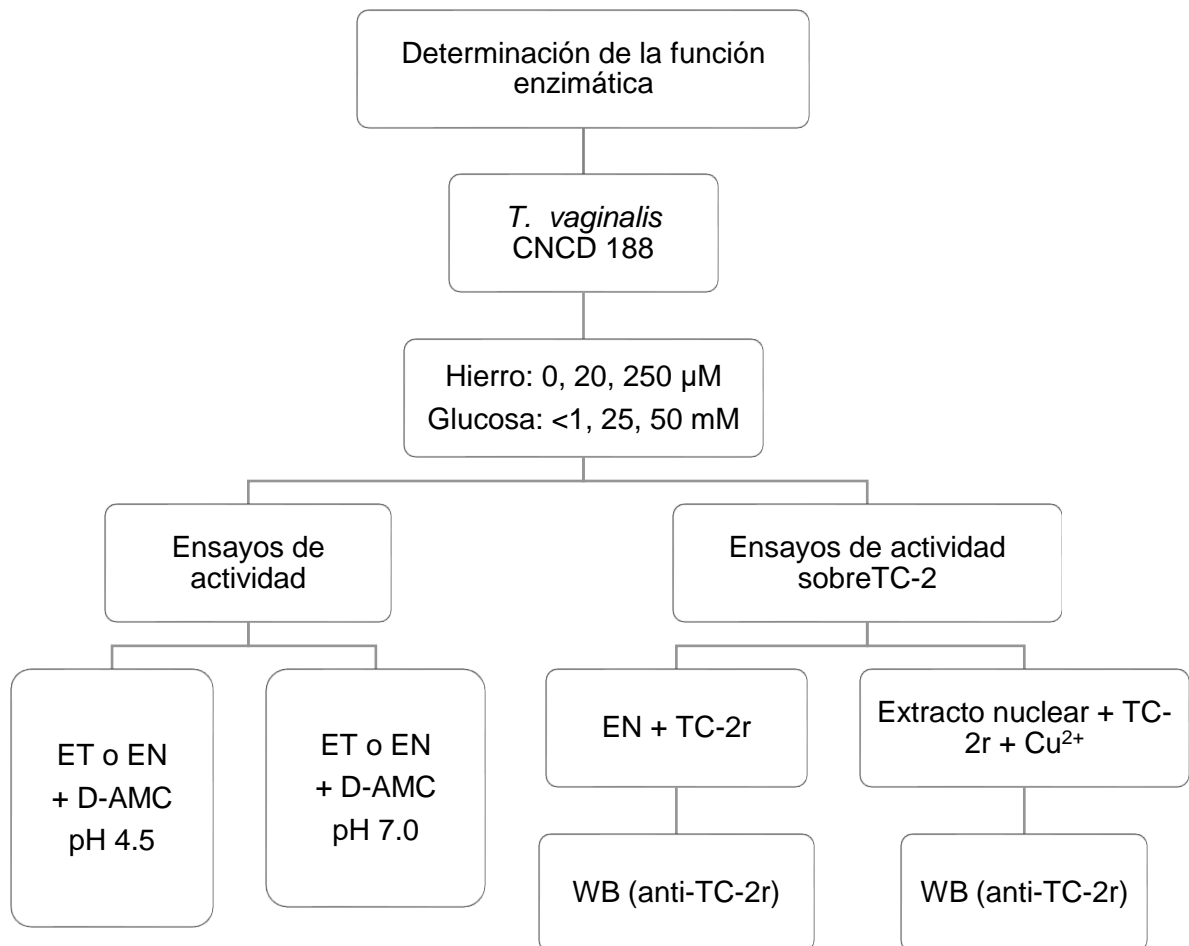
Objetivo 1



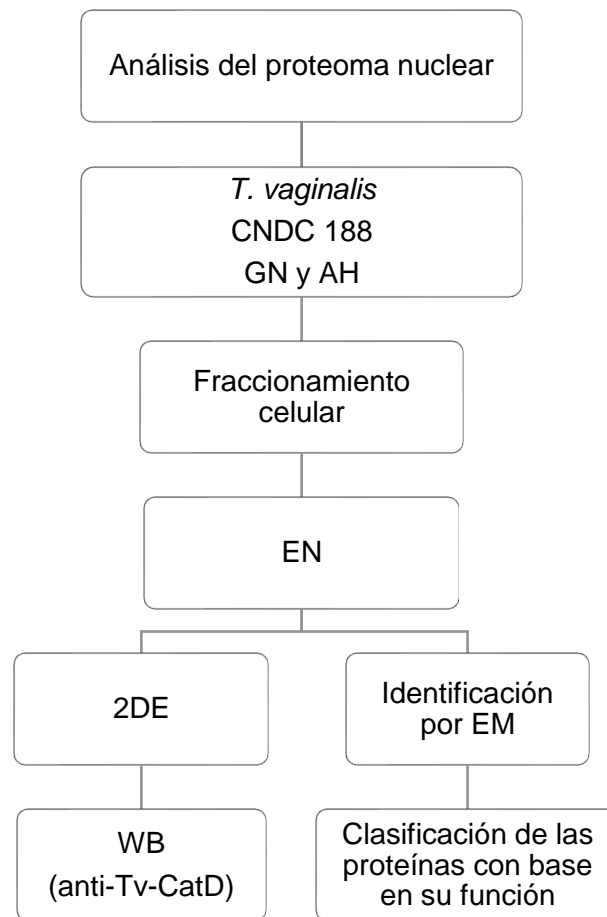
Objetivo 2



Objetivo 3



Objetivo 4



7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Análisis bioinformático

7.1.1. Modelado de la estructura tridimensional de proteínas

El modelado de la estructura de las proteínas Tv-CatD (TVAG_336300) y SAF (TVAG_318870) de *T. vaginalis* se realizó en el servidor I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) ingresando la secuencia de aminoácidos de dichas proteínas obtenidas de la base de datos del genoma de *T. vaginalis* (TrichDB; <http://trichdb.org>) en formato FASTA.

7.1.2. Análisis estructural entre Tv-CatD y SAF

Las estructuras tridimensionales de los modelos generados se visualizaron y analizaron en el programa UCSF Chimera (<http://www.rbvi.ucsf.edu/chimera>). Para los análisis comparativos entre los dominios amino o carboxilo terminal de las diferentes proteínas se utilizó el mismo algoritmo, Needleman-Wunsch, pero las matrices fueron distintas dependiendo de los dominios a analizar. Para los análisis entre los dominios amino terminal de Tv-CatD (Tv-CatDn) y SAF (SAFn) se utilizó la “matrix BLOSUM-75”. Para el dominio carboxilo terminal de Tv-CatD (Tv-CatDc) y SAFn se utilizó la “matrix BLOSUM-80”. Para la sobreposición de las estructuras Tv-CatDn y SAFn se usó la matrix “BLOSUM-75” mientras que para Tv-CatDc y SAFn se usó la matrix “BLOSUM-80” con el algoritmo antes mencionado.

7.1.3. Búsqueda de dominios funcionales, SLN, SEN y modificaciones postraduccionales

Con el objetivo de analizar las posibles funciones nucleares de la Tv-CatD en el núcleo de *T. vaginalis* se realizó una búsqueda de dominios funcionales en diversos servidores: ProDom (<http://prodom.prabi.fr>), InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>), MyHits (<https://myhits.isb-sib.ch/>), Pfam (<https://pfam.xfam.org/>), ScanProsite (<https://prosite.expasy.org/scanprosite/>),

P2RP (<http://www.p2rp.org/index.php>), DNAbinder
(<http://crdd.osdd.net/raghava/dnabinder/>), GYM 2.0
(<http://users.cis.fiu.edu/~giri/bioinf/GYM2/welcome.html>), Rhone-Alpes
Bioinformatics Center (PRABI) (<http://www.prabi.fr/>), 2Zip - Leucine Zippers
Prediction (<http://www.lirmm.fr/2zip/>), MotifFinder
(<http://www.genome.jp/tools/motif/>). Para todos los servidores se ingresó la
secuencia de aminoácidos de la Tv-CatD en formato FASTA. Las modificaciones
postraduccionales se buscaron, de igual forma, en diversos servidores: NetNGlyc
1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>), SUMOplot™ Analysis
Program (<http://www.abgent.com/sumoplot>), GPS 2.0 (Group-based Prediction
System, ver 2.0) (<http://gps.biocuckoo.org/>), MyHits (<https://myhits.isb-sib.ch/>).

La búsqueda de una Secuencia de Localización Nuclear (SLN) o de una
Secuencia de Exporte Nuclear (SEN) se realizó en: NetNES 1.1 Server
(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES/>), PSORT (<https://psort.hgc.jp/>).

7.1.4. Interactoma

En la base de datos String (<https://string-db.org>) se realizó un interactoma
entre la secuencia de aminoácidos de la Tv-CatD contra todo el genoma de
Trichomonas vaginalis G3. Una vez generado el interactoma se ajustó a no más de
50 interacciones.

7.2. Cultivo de *T. vaginalis*

El aislado CNCD 188 de *T. vaginalis* se cultivó en diferentes condiciones de
glucosa y de hierro a 37 °C. El parásito se cultivó en tres diferentes condiciones de
glucosa: ≤1, 25 y 50 mM, correspondientes a las condiciones de restricción, normal
y alta glucosa. Para restricción de glucosa, el parásito se cultivó en medio TY
(triptona y extracto de levadura) suplementado con 10% de suero bovino adulto
(SBA). Para las condiciones de normal y alta glucosa, el medio TY se suplementó
con glucosa a una concentración final de 25 o 50 mM, respectivamente. Antes de

crecer al parásito en cualquiera de estas tres condiciones de glucosa, se cultivó por tres días en la condición de glucosa normal.

Para las condiciones de alto y bajo hierro, los parásitos se crecieron en medio TYM (Tryptona, extracto de levadura y maltosa) suplementado con SBA al 10% y enriquecido con sulfato ferroso amoniacal a una concentración final de 250 μM o en medio TYM agotado de hierro por adición de 2-2 dipiridilo a una concentración final de 150 μM , respectivamente. Para la condición de hierro normal los parásitos se crecieron en medio TYM suplementado con SBA al 10%.

En todos los casos, los parásitos se cosecharon en fase logarítmica por centrifugación a 1800 rpm durante 5 min a 4 °C para ensayos posteriores.

7.3. Fraccionamiento celular

A partir de parásitos (3×10^8) que se crecieron en las condiciones ya mencionadas se realizó el fraccionamiento celular de *T. vaginalis*. Los parásitos se cosecharon en fase logarítmica y se lavaron 3x con PBS pH 7.0 frío. La pastilla de parásitos se resuspendió en amortiguador EB (HEPES 10 mM pH 7.5, KCl 40 mM, MgCl_2 3 mM, glicerol 5% y NP40 0.5%) con los inhibidores de proteasas leupeptina (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y TLCK (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), se mezcló por vórtex por 10 s y se incubó por 20 min a 4 °C. Nuevamente se mezcló por vórtex por 10 s y se incubó por 20 min a 4 °C. La lisis de los parásitos se corroboró mediante un ensayo de viabilidad con azul de tripano. Del extracto total se tomó una alícuota y se guardó para ensayos posteriores y el resto se centrifugó a 5,000 rpm por 10 min a 4 °C, se separó el sobrenadante (S1) que contenía la fracción de membrana y citoplasma de la pastilla (P1) que contenía a los núcleos celulares. El sobrenadante S1 se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min a 4 °C y se separó el sobrenadante S2 (fracción citoplásmica) de la pastilla P2 (fracción membranal). La fracción citoplásmica se guardó en alícuotas a -70 °C mientras que la pastilla P2 se lavó 3x con amortiguador BR (HEPES 20 mM pH 7.5, KCl 100 mM, MgCl_2 2 mM, EDTA 1 mM y DTT 1 mM). Posteriormente, la pastilla P2 se resuspendió en amortiguador BR sin DTT y sin KCl y se añadieron los inhibidores

de proteasas leupeptina (10 µg/ml) y TLCK (50 µg/ml) y se almacenó en alícuotas a -70 °C. Los núcleos se lavaron 4x con amortiguador EB y se resuspendieron en amortiguador RN (HEPES 25 mM pH 7.5, KCl 400 mM, MgCl₂ 3 mM, EDTA 0.2 mM, DTT 5 mM y glicerol 25%) con los inhibidores de proteasas leupeptina (10 µg/ml) y TLCK (50 µg/ml), se mezcló por vórtex por 30 s a 4 °C y se centrifugó a 5,000 rpm, 5 min a 4 °C. El sobrenadante S3 se guardó en alícuotas a -70 °C.

7.4. Western blot

Las proteínas se separaron por electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10% utilizando 60 µg por carril y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (NC) de 0.45 µm. Las membranas de NC se bloquearon con leche al 10% en PBS pH 7.0-Tween 20 al 0.1% (PBS-T) toda la noche en agitación a 4 °C, se lavaron 5x con PBS-T, se incubaron a 4 °C toda la noche con los anticuerpos primarios de ratón anti-Tv-CatDr a una dilución 1:100 o 1:50 para la fracción nuclear; de conejo anti-EhHK (hexocinasa de *Entamoeba histolytica*) a una dilución 1:200, utilizado como control citoplásmico o anti-FB (fibrilarina) a una dilución 1:100, como control nuclear, se lavaron 5x con PBS-T y se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa a una dilución 1:3,000, 1 h a 37 °C, se lavaron 5x con PBS-T y se revelaron por quimioluminiscencia utilizando un kit de detección (Thermo Scientific-Pierce) o por color usando 4-cloro-1-naftol.

Para el WB del extracto nuclear en 2-DE, las proteínas separadas por 2-DE se transfirieron a una membrana de NC de 0.2 µm. La membrana de NC se bloqueó con leche (Difco) al 2.5% en TBS pH 7.6-Tween 20 al 0.1% (TBS-T) toda la noche en agitación a 4 °C, se lavó 8x con TBS-T, se incubó con el anticuerpo primario anti-Tv-CatDr a una dilución 1:100 en TBS-T-leche (Difco) al 2.5% toda la noche en agitación a 4 °C. Después, la membrana se lavó 8x con TBS-T, se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa a una dilución 1:3,000 en TBS-T leche (Difco) al 2.5%, se lavó 8x con TBS-T y finalmente se reveló por placa.

7.5. Ensayo de inmunofluorescencia indirecta

T. vaginalis del aislado CNCD 188 se cultivó en bajo, normal y alto hierro para realizar ensayos de inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo de ratón anti-Tv-CatDr con el propósito de analizar su localización celular, así como el efecto del hierro en su expresión. Para ello se cultivaron 2×10^6 parásitos en laminillas depositadas en una placa de cultivo de 6 pozos durante 20 h en un volumen de 3 ml de cultivo. Las laminillas con los parásitos adheridos se lavaron 3x con PBS pH 7.0 filtrado a temperatura ambiente (TA) y se fijaron con paraformaldehído al 2% en PBS por 30 min a TA. Los parásitos que se crecieron en bajo hierro, dado que no son adherentes, se crecieron en tubo, se cosecharon por centrifugación a 1800 rpm por 5 min a 4 °C y se lavaron 3x con PBS pH 7.0 filtrado. 1×10^6 parásitos se resuspendieron en 500 μ l de paraformaldehído al 2% en PBS, por laminilla y se adhirieron a la laminilla (pretratada con poli-L-lisina al 10%) por 15 min a TA.

Los parásitos fijados se lavaron 5x con PBS pH 7.0, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0.07% por 10 min a TA. Las laminillas se lavaron 5x con PBS-albúmina al 1%, se bloquearon con PBS-glicina 0.5 M por 1 h a TA, se lavaron 3x con PBS glicina 0.5 M, se bloquearon con PBS-suero fetal bovino al 1% por 20 min a TA, se lavaron 5x con PBS pH 7.0 filtrado y se incubaron con el anticuerpo primario de ratón anti-Tv-CatDr (dilución 1:40 en PBS) en cámara húmeda toda la noche a 4°C. Las laminillas se lavaron 5x con PBS pH 7.0 filtrado, se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a FITC (dilución 1:100 en PBS) por 2 h a TA en cámara húmeda y cubiertas de la luz, se lavaron 5x con PBS pH 7.0 filtrado y las laminillas se montaron en portaobjetos con Vectashield con DAPI y se sellaron los bordes con barniz transparente. Finalmente, las laminillas se analizaron por microscopía confocal (Zeiss, Germany).

7.6. Ensayos de actividad proteolítica de la Tv-CatD

La actividad proteolítica de la Tv-CatD en extractos de proteínas totales y nucleares se midió mediante el uso del sustrato fluorogénico específico para

catepsina D y E: MCA- GKPILFFRLK(Dnp)-D-R-NH₂ (D-AMC). Para el ensayo fluorométrico se colocaron 200 µg del extracto de proteínas en un pozo de una placa de 96 pozos, 2 µl del sustrato D-AMC 100 µM (concentración final: 20 µM) y se ajustó a un volumen de 100 µl con amortiguador de acetatos pH 4.5 o amortiguador de fosfatos pH 7.0 con β-mercaptoetanol al 0.0005%. Posteriormente, se realizaron lecturas cada 10 s por 5 min a longitudes de onda de excitación de 328 nm y de emisión de 393 nm. Como control se realizó un ensayo usando cobre a una concentración final de 10 mM.

7.7. Electroforesis bidimensional

Para confirmar la presencia de la Tv-CatD en el extracto nuclear mediante WB, se realizó una electroforesis bidimensional (2-DE) del extracto nuclear proveniente de un cultivo de *T. vaginalis* CNCD 188 en glucosa normal. Para esto, se realizó un fraccionamiento celular de parásitos cultivado en glucosa normal; la fracción nuclear resultante se precipitó con TCA al 10% toda la noche a 4 °C con la finalidad de eliminar las sales del extracto proteico. Las proteínas precipitadas se concentraron por centrifugación a 13,000 rpm por 5 min a 4 °C, se lavaron 5x con acetona fría y se resuspendieron en amortiguador de hidratación. Las tiras IPG pH lineal 3-10 (Bio-Rad) se hidrataron con 300 µg de proteínas nucleares durante 18 h a 50 V. El isoelectroenfoque se realizó en tres pasos: 250 V 20 min, 4000 V 3 h y un incremento gradual hasta llegar a los 10,000 V-h. Las tiras se redujeron y se alquilaron con amortiguadores de equilibrio I (urea 6 M, Tris-HCl pH 8.8 0.375 M, SDS 2%, glicerol 20%, DTT 2%) y equilibrio II (urea 6 M, Tris-HCl pH 8.8 0.375 M, SDS 2%, glicerol 20%, iodoacetamida 2.5%) 10 min a TA con cada uno. Para la segunda dimensión se realizó una electroforesis vertical desnaturizante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10%. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie G-250 o se transfirieron a una membrana de NC de 0.2 µm para ensayos de WB.

8. RESULTADOS

8.1. Análisis bioinformático

8.1.1. Análisis estructural entre Tv-CatD y SAF

Coles y col. (1999) reportaron que diversas proteínas incluyendo factores de transcripción, enzimas metabólicas, aspártico proteasas y ATPasas de la familia AAA, entre otras, comparten un dominio estructural psi-barril- β conformado por dos motivos simétricos $\beta\beta\alpha\beta$ como se muestra en la Figura 8.1.

T. vaginalis posee proteínas que pertenecen a algunos de estos grupos: la Tv-CatD que es una aspártico proteasa y el factor SAF que es miembro de la familia de ATPasas AAA. Al localizar estas proteínas dentro del árbol filogenético de la Figura 8.1 se observa que estas pueden ser representativas de los últimos clados. Sin embargo, se desconoce si existen otras proteínas en *T. vaginalis* que puedan agruparse en los clados restantes y que por tanto presenten el dominio estructural psi-barril- β .

La aspártico proteasa Tv-CatD presenta dos posibles dominios psi-barril- β conservados, uno en el extremo amino, entre el residuo T59 y el residuo G164, y el otro en el carboxilo terminal, entre el residuo Y233 y el residuo L338. SAF presenta solamente un dominio conservado que está localizado entre los residuos R21 y K99 situado en el extremo amino terminal (Figura 8.2).

Los dominios conservados encontrados en Tv-CatD y en SAF son muy similares al dominio psi-barril- β reportado por Coles y col. (1999). El dominio tipo psi-barril- β reportado está formado por dos motivos simétricos $\beta\beta\alpha\beta$ localizados en la región amino terminal (Figura 8.3); mientras que los dominios de Tv-CatD y de SAF tienen algunas variaciones. El dominio tipo psi-barril- β del amino terminal de Tv-CatD está formado por 7 hojas- β y tres α -hélices (Figura 8.4A) que podrían dividirse en dos motivos asimétricos $\beta\beta\beta\alpha\alpha\beta$ y $\beta\beta\alpha\beta$ (Figura 8.4B), mientras que el dominio localizado en el carboxilo terminal está formado por 7 hojas- β y 3 α -hélices (Figura 8.4C), pudiendo conformar los motivos asimétricos $\beta\beta\beta\alpha\alpha\beta$ y $\beta\alpha\beta$ (Figura

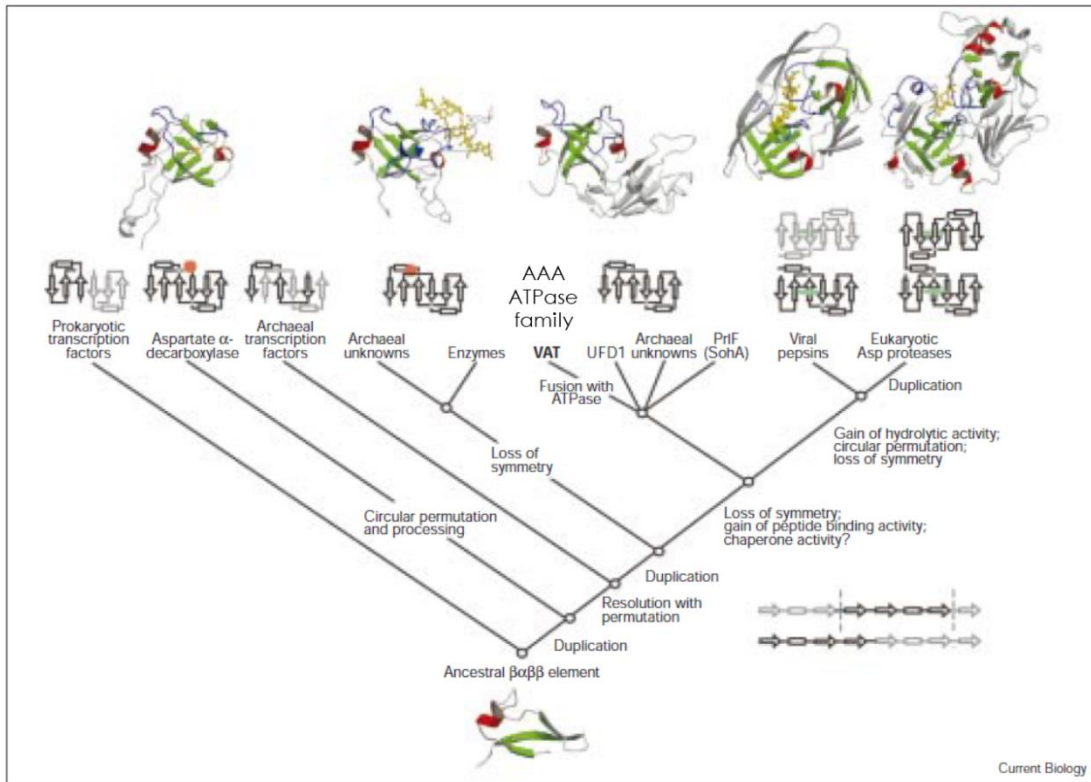
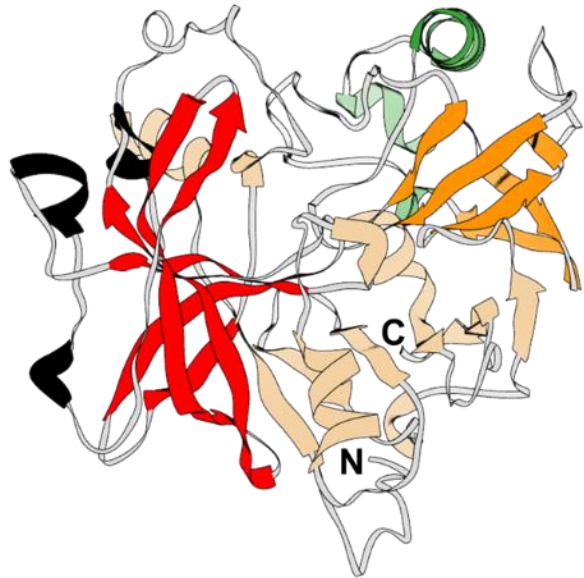


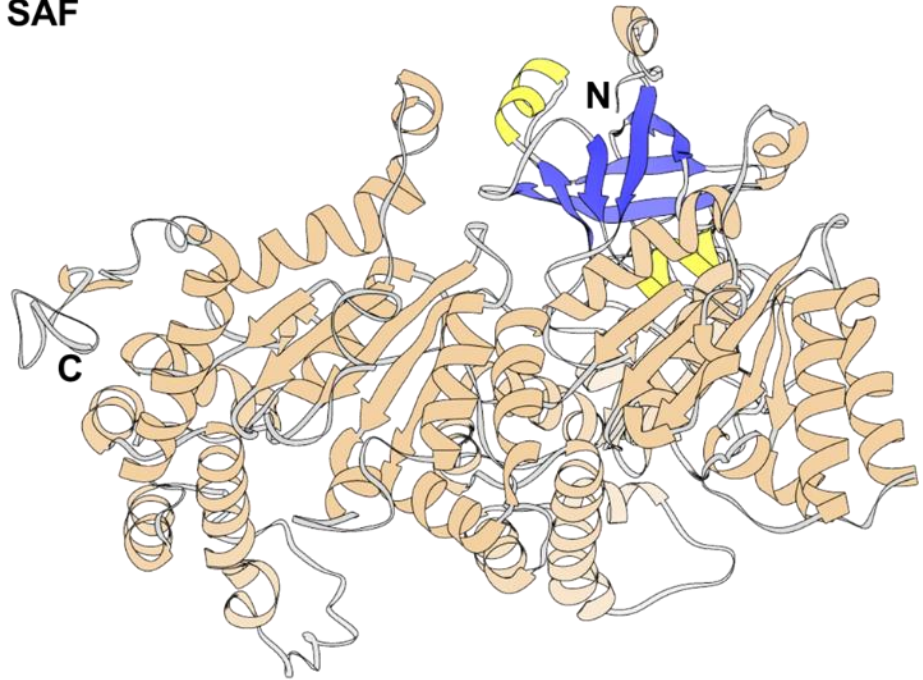
Figura 8.1. Evolución del dominio psi-barril-β. Dendrograma de proteínas relacionadas a VAT-N y sus topologías que comparten un elemento o motivo ancestral βαββ (Tomado de Coles *et al.*, 1999).

Figura 8.2. Modelos estructurales hipotéticos de las proteínas Tv-CatD y SAF de *T. vaginalis*. Los dominios psi-barril- β amino y carboxilo terminal se muestran coloreados de forma diferente al resto de la estructura: en rojo (hojas β) y negro (α -hélices) se muestra al dominio psi-barril- β localizado en el amino terminal, en naranja (hojas β) y verde (α -hélices) se representa al dominio psi-barril- β localizado en el carboxilo terminal, ambos de Tv-CatD y en azul (hojas β) y amarillo (α -hélices) al dominio psi-barril- β de la proteína SAF.

Tv-CatD



SAF



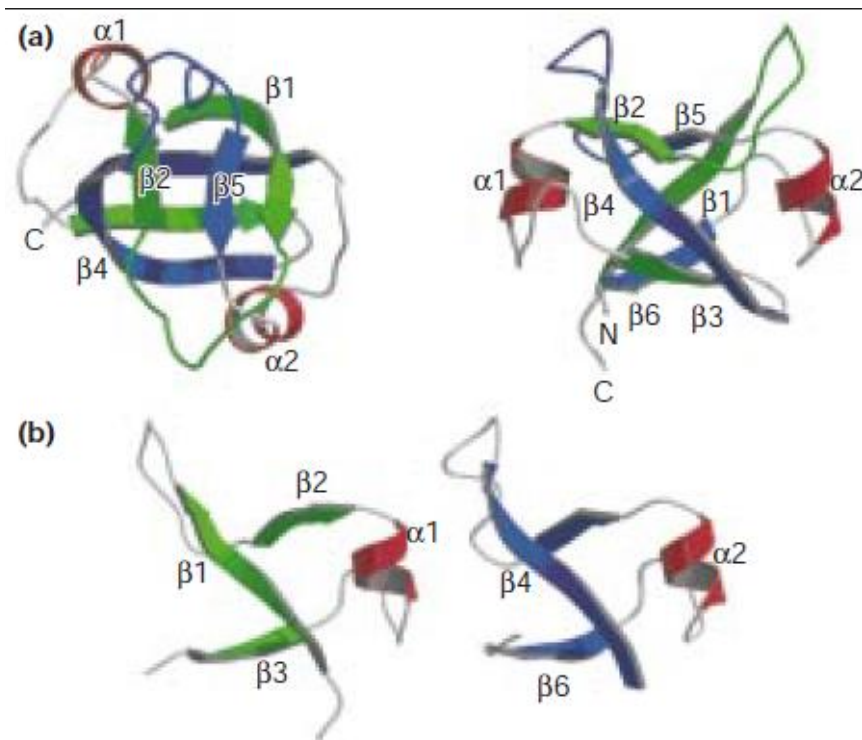


Figura 8.3. Estructura del dominio psi-barril- β de VAT-N. a) Dos vistas perpendiculares del subdominio amino terminal con las hojas- β coloreadas en verde y azul y las α -hélices en rojo. La estructura de la derecha se giró 90° para mostrar la posición espacial de las α -hélices. b) Comparación de los dos motivos simétricos $\beta\beta\alpha\beta$ que conforman el dominio psi-barril- β (Tomado de Coles *et al.*, 1999).

8.4D). Nótese que el primer motivo es igual para los dos dominios de Tv-CatD, esto pudiera deberse a duplicaciones a lo largo del proceso evolutivo de la aspártico proteasa. El dominio tipo psi-barril- β de SAF está conformado por 6 hojas- β y 2 α -hélices (Figura 8.5 A), formando los dos motivos simétricos $\beta\beta\alpha\beta$ (Figura 8.5B).

La localización espacial de las α -hélices es diferente entre Tv-CatD y SAF, las α -hélices de Tv-CatD se encuentran orientadas hacia un solo lado del dominio psi-barril- β mientras que, las α -hélices de SAF se encuentran de manera opuesta una con otra de forma similar al dominio reportado por Coles y col (Figura 8.4 y 8.5).

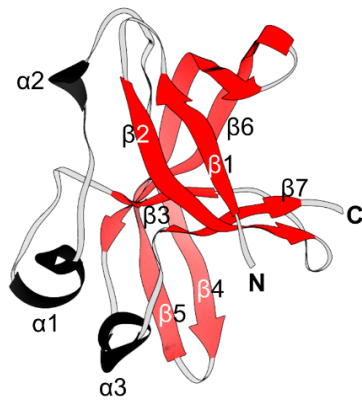
La sobreposición del dominio amino terminal psi-barril- β de Tv-CatD y SAF muestra que comparten similitud estructural principalmente en las hojas- β : $\beta 1$ - $\beta 3'$, $\beta 2$ - $\beta 4'$, $\beta 5$ - $\beta 6'$, $\beta 7$ - $\beta 2'$ (β se refiere al subdominio de Tv-CatD mientras que β' se refiere al subdominio de SAF). Sin embargo, las α -hélices no se traslapan quizás sea por el arreglo posicional de éstas (Figura 8.6).

Al traslapar los dominios carboxilo terminal de Tv-CatD con el dominio amino terminal de SAF se aprecia cierta similitud en algunas hojas- β y α -hélices como se muestra en la Figura 8.7, pero existe mayor similitud con el dominio amino terminal de Tv-CatD. Las regiones con similitud estructural son la hoja $\beta 2$ con la hoja $\beta 3'$ ($\beta 2$ se refiere a Tv-CatD y $\beta 3'$ al factor SAF).

Estos resultados apoyan las hipótesis de que tanto la proteasa Tv-CatD como SAF comparten un dominio estructural conservado tipo psi-barril- β formado por los motivos $\beta\beta\alpha\beta$, o similares, que podría explicar el reconocimiento cruzado de la banda de 80 kDa por el anticuerpo policlonal generado contra Tv-CatDr. Además, ambos dominios conservados se encuentran cercanos a la superficie de las proteínas lo que facilitaría el reconocimiento del anticuerpo.

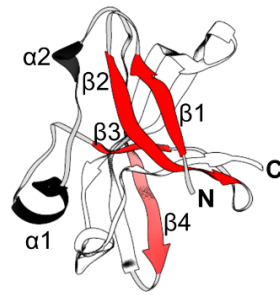
Figura 8.4. Estructura de los dominios psi-barril- β amino y carboxilo terminal de Tv-CatD. A) Dominio amino terminal, formado por siete hojas- β y tres α -hélices. B) Motivos asimétricos $\beta\beta\beta\alpha\beta$ y $\beta\beta\alpha\beta$ que conforman al dominio amino terminal. Las hojas- β se muestran en color rojo y las α -hélices en color negro. C) Dominio carboxilo terminal, formado por seis hojas- β y tres α -hélices. D) Motivos asimétricos $\beta\beta\beta\alpha\beta$ y $\beta\alpha\beta$ que conforman el dominio carboxilo terminal. En color naranja se muestran las hojas- β y en color verde las α -hélices.

A

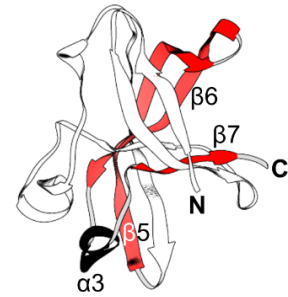


**Dominio psi-barril- β
N-terminal**

B

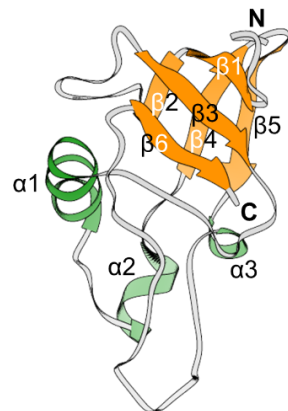


Motivo $\beta\beta\alpha\beta$



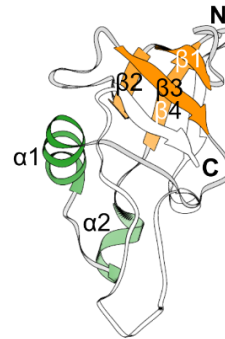
Motivo $\beta\beta\alpha$

C

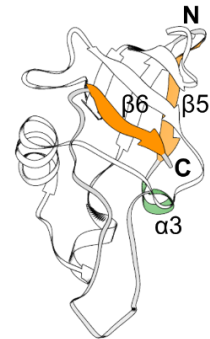


**Tv-CatD
Dominio psi-barril- β
C-terminal**

D



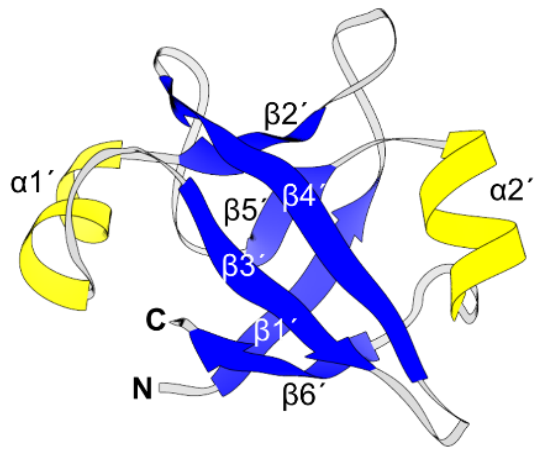
Motivo $\beta\beta\alpha\beta$



Motivo $\beta\alpha\beta$

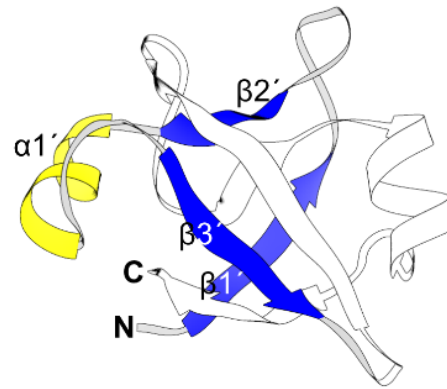
Figura 8.5. Estructura del dominio psi-barril- β amino terminal de SAF. A) Dominio psi-barril- β , formado por seis hojas- β y dos α -hélices. B) motivos simétricos $\beta\beta\alpha\beta$ que conforman el dominio amino terminal. En color azul se muestran las hojas- β y en color amarillo a las α -hélices.

A

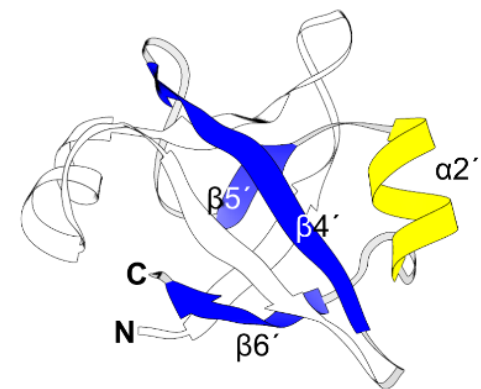


SAF
Dominio psi-barril- β
N-terminal

B



Motivo $\beta\beta\alpha$



Motivo $\beta\beta\alpha$

Figura 8.6. Comparación estructural de los dominios amino terminal psi-barril- β de Tv-CatD y SAF. Varias vistas de la sobreposición de los dominios conservados. Aunque el traslape de las estructuras no es total, hay varias regiones con similitud estructural.

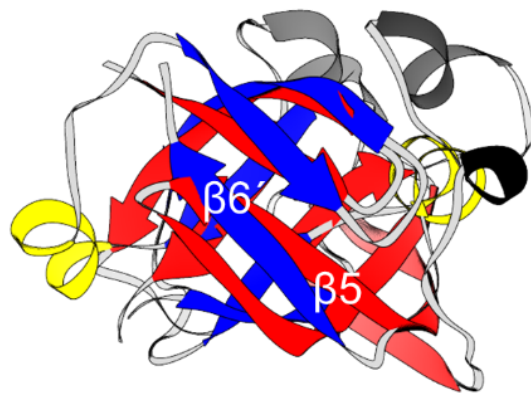
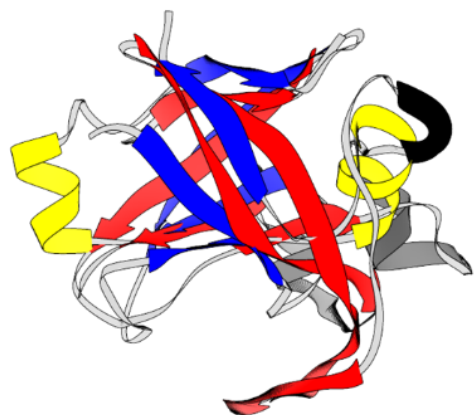
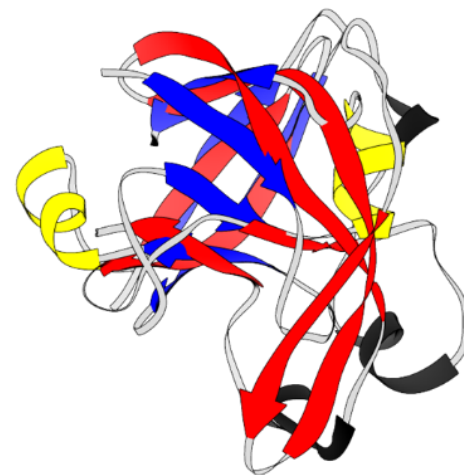
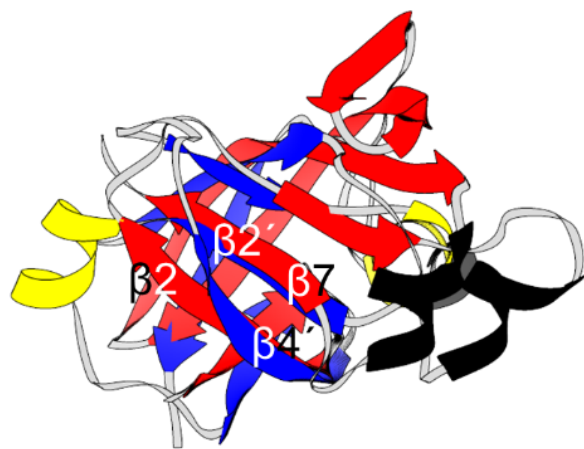
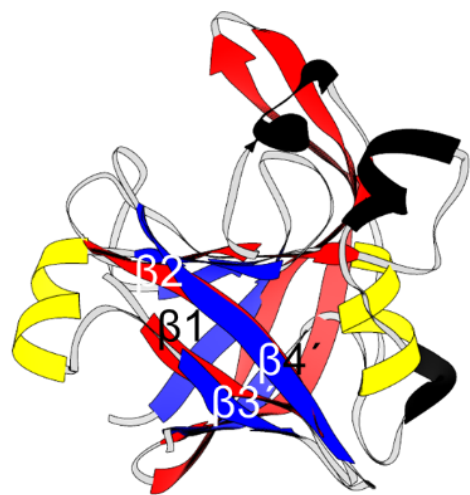
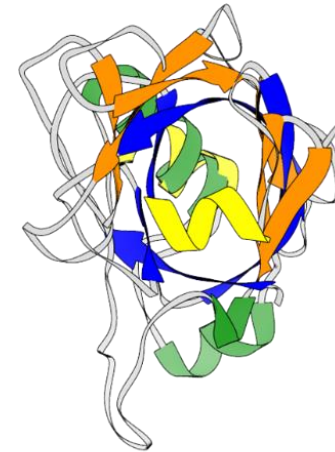
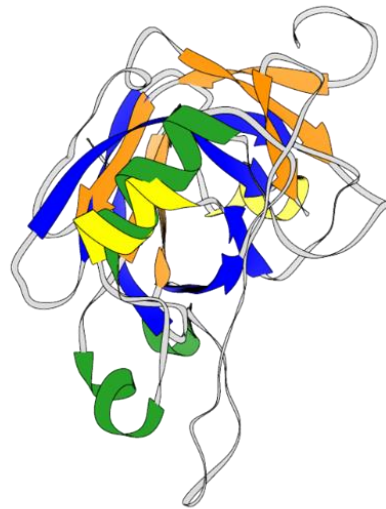
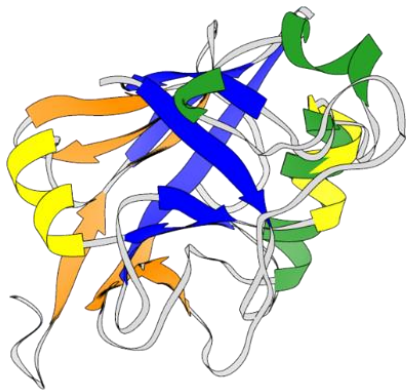
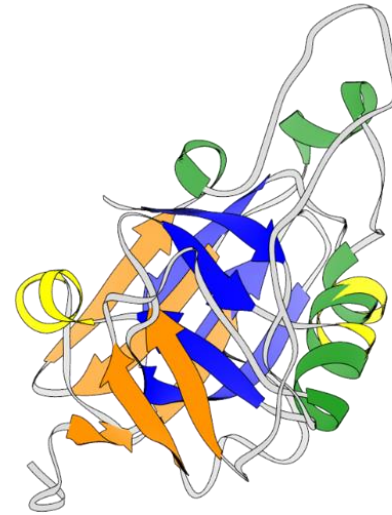
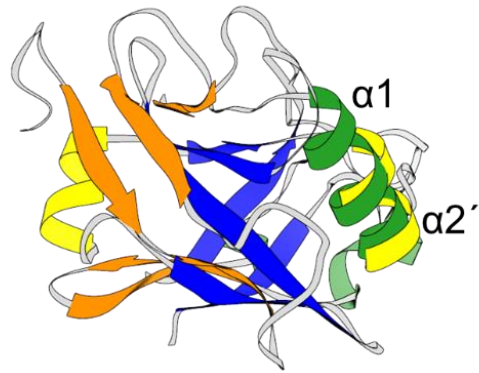
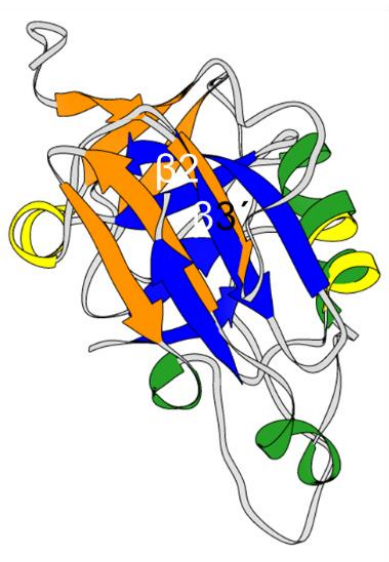


Figura 8.7. Comparación estructural de los dominios psi-barril- β carboxilo y amino terminal de Tv-CatD y SAF, respectivamente. Varias vistas de la sobreposición de los dominios conservados. Hay similitud estructural entre la hoja $\beta 3'$ de SAF con la hoja $\beta 2$ de Tv-CatD y entre la $\alpha 1$ y $\alpha 2'$ de Tv-CatD y SAF, respectivamente.



8.1.2 Análisis *in silico*

La secuencia de Tv-CatD se analizó en diferentes bases de datos y servidores con el propósito de identificar dominios funcionales que permitieran predecir su posible función nuclear. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 8.1. El dominio principal identificado corresponde al de una aspártico proteasa, específicamente al de catepsina D. También se identificaron dos dominios TAXI_N (inhibidor de xilanasas), en las regiones 57-109 y 87-172, los cuales presentan homología con las aspártico proteasas (Pollet *et al.*, 2009) (Sansen *et al.*, 2004) y un dominio NTF2 en la región 338-370. NTF2 (Nuclear Transport Factor 2) participa en el transporte nucleocitoplásmico de proteínas a través del complejo del poro nuclear, se une a las GTPasas de la familia RAN y a diversas nucleoporinas (Stewart *et al.*, 1998; Steggerda *et al.*, 2000). Esta similitud con NTF2 podría influir en el transporte de Tv-CatD hacia el núcleo de *T. vaginalis*.

No se encontraron dominios de unión a DNA ni de factores de transcripción. Estos resultados podrían sugerir que Tv-CatD tenga al menos una función enzimática en el núcleo del parásito.

Tv-CatD carece de una Secuencia de Localización Nuclear (SLN) (NLS, *nuclear localization signal or sequence*) o Secuencia de Exporte Nuclear (SEN) (NES, *nuclear export signal*) típicas buscadas en los servidores PSort y NetNES.

También se identificaron diversos sitios de modificaciones postraduccionales que pudieran contribuir al transporte de Tv-CatD. Estas modificaciones son la SUMOilación y la fosforilación. Tv-CatD presenta cuatro posibles sitios de SUMOilación, localizados en K147, K157, K195 y K302 (tomando en cuenta solo la secuencia de Tv-CatD madura) y 12 posibles sitios de fosforilación en treoninas, serinas y tirosinas: T42, T83, T87, T145, T252, S30, S46, S67, S73, S216, S293 y Y63 (Tabla 8.2).

Tabla 8.1. Dominios funcionales de Tv-CatD.

Dominio	Cantidad	Posición	Servidor
<i>Aspártico proteasa: Catepsina D</i>	1	39-366	ProDom
<i>Aspártico proteasa eucarionte</i>	1	56-368	
<i>Sitio activo de aspártico proteasa</i>	1	257-268	MyHits
<i>Dominio NTF2</i>	1	338-370	
<i>Aspártico peptidasa</i>	1	56-368	InterPro
<i>Aspártico peptidasa</i>	1	56-368	Pfam
<i>Aspártico proteasa eucarionte</i>	1	56-353	
<i>TAXi_N</i>	2	57-109 87-172	MotifFinder
<i>Dominio peptidasa de la familia A1</i>	1	57-366	
<i>Sitio activo (residuos)</i>	2	75 260	ScanProsite
<i>Hélice-vuelta-hélice</i>	0	-	prabi
<i>Cierre de leucina</i>	0	-	2ZIP-Server
<i>Proteína de unión a DNA</i>	0	-	DNAbinder
			GYM 2.0
<i>Factor de transcripción</i>	0	-	GenoBrowser P2RP
<i>Regulador de respuesta</i>	0	-	

Los dominios funcionales de Tv-CatD se obtuvieron a partir de un análisis *in silico* de la secuencia en diversos servidores.

Tabla 8.2. Posibles sitios de sumoilación y fosforilación de Tv-CatD.

<i>Modificación postraducciona</i>	<i>Sitio</i>
<i>Sumoilación</i>	K147
	K157
	K195
	K302
<i>Fosforilación</i>	T42
	T83
	T87
	T145
	T252
	S30
	S46
	S67
	S73
	S216
	S293
Y63	

8.1.3. Interactoma

Con el propósito de identificar a posibles proteínas capaces de interactuar con Tv-CatD que pudieran brindar más información acerca de la función y del mecanismo de localización nuclear se realizó un interactoma.

De acuerdo con los resultados obtenidos (Figura 8.8), la Tv-CatD puede interactuar con diversas peptidasas como serina peptidasas de tipo subtilisina, catepsinas B y L (como CP1 y CP2 y otras que no han sido caracterizadas) y con otras proteínas hipotéticas. Dentro del grupo de proteínas hipotéticas capaces de interactuar con Tv-CatD de encontraron varias que poseen el dominio PP2C_SIG (XP_001318745.1, XP_001317235.1, XP_001305797.1 y XP_001330312.1). En la Tabla 8.3 se muestra la lista de todas las proteínas capaces de interactuar con Tv-CatD.

8.2. Fraccionamiento celular en restricción y alta glucosa

Para demostrar la localización nuclear de Tv-CatD en las diferentes condiciones de glucosa reportada por Mancilla-Olea (Tesis de Doctorado) se realizó un fraccionamiento celular (Figura 8.9). La figura 8.9A muestra la membrana teñida con rojo de Ponceau, donde se observan los patrones de proteínas de los extractos totales (T), citoplásmicos (C) y nucleares (N) de las condiciones de restricción (RG) y alta glucosa (AG). En el panel 8.9B se muestran los resultados del WB con el anticuerpo anti-Tv-CatDr. En los extractos totales y citoplásmicos se observó reconocimiento en distintas regiones: una banda de ~80 kDa que corresponde al factor SAF y otras bandas de ~41, ~35 y ~30 kDa que corresponden al precursor, forma madura y forma procesada de Tv-CatD, respectivamente. La cantidad de Tv-CatD en su forma madura es mayor en la condición de alta glucosa, que es consistente con la regulación positiva por glucosa previamente reportada. Sin embargo, el precursor de ~41 kDa solo se encuentra presente en la condición de alta glucosa mientras que la forma procesada de ~30kDa parece permanecer sin cambios. En la fracción nuclear se observó un reconocimiento en ~80 (SAF) y ~25

Figura 8.8. Interactoma *in silico* de Tv-CatD. Interactoma generado en el servidor *String* nucleado con Tv-CatD que se muestra como la esfera de color rojo en el centro. La mayoría de las proteínas capaces de interactuar con Tv-CatD corresponden a peptidasas de diversos tipos.

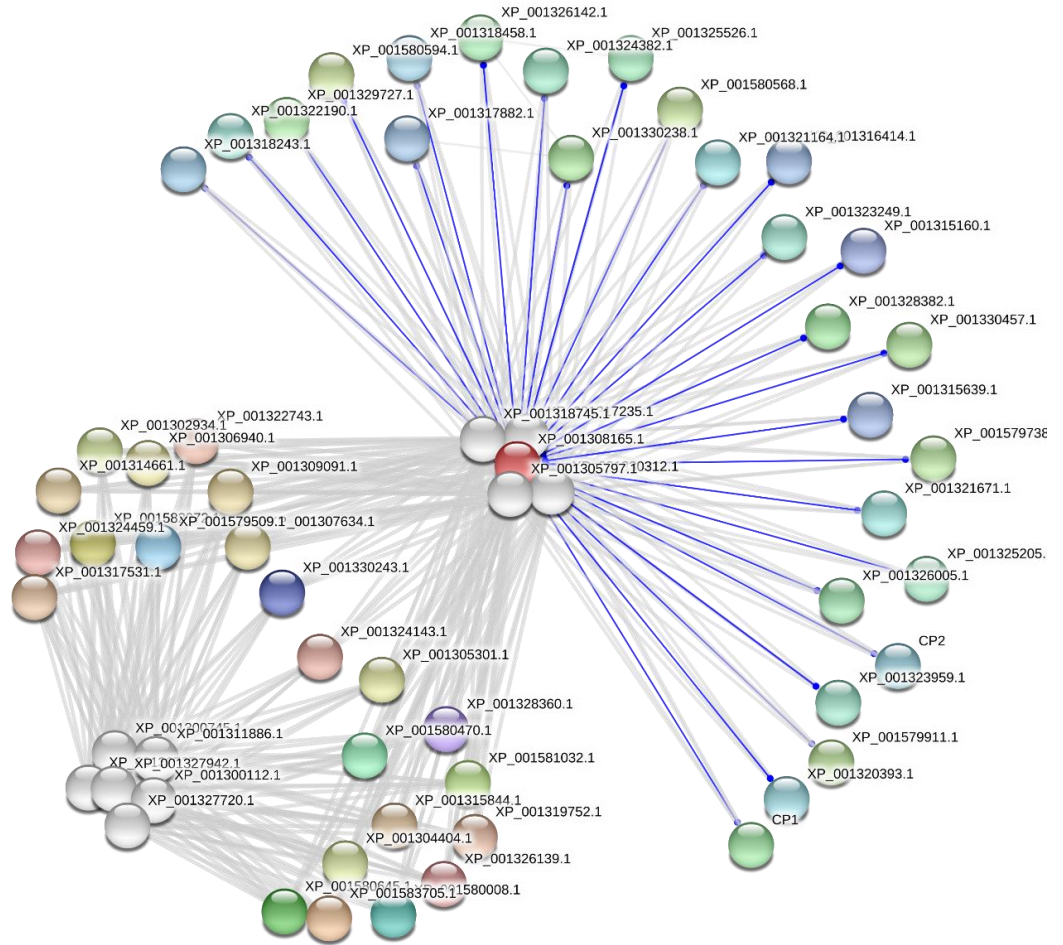


Tabla 8.3. Lista de las proteínas con posibilidad de interactuar con Tv-CatD.

NO. DE ACCESO	PROTEÍNA	SCORE
XP_001583705.1	Proteína hipotética (518 aa)	0.882
XP_001582072.1	Serina peptidasa tipo subtilisina, Clan SB, familia S8, (868 aa)	0.882
XP_001581032.1	Proteína hipotética (750 aa)	0.882
XP_001580645.1	Proteína hipotética (422 aa)	0.882
XP_001580470.1	Proteína hipotética (793 aa)	0.882
XP_001580008.1	Proteína hipotética (378 aa)	0.882
XP_001579509.1	Serina peptidasa tipo subtilisina, Clan SB, familia S8, (890 aa)	0.882
XP_001330243.1	Dominio P, proproteína convertasa (853 aa)	0.882
XP_001328360.1	Serina peptidasa tipo subtilisina, Clan SB, familia S8, (768 aa)	0.882
XP_001326139.1	Serina peptidasa tipo subtilisina, Clan SB, familia S8, (1060 aa)	0.882
XP_001324459.1	Proteína hipotética (320 aa)	0.882
XP_001324143.1	Proteína hipotética (479 aa)	0.882
XP_001322743.1	Serina peptidasa tipo subtilisina, Clan SB, familia S8 (618 aa)	0.882
XP_001319752.1	Proteína hipotética (558 aa)	0.882
XP_001317531.1	Proteína hipotética (425 aa)	0.882
XP_001315844.1	Serina peptidasa tipo subtilisina, Clan SB, familia S8 (773 aa)	0.882
XP_001314661.1	Proteína de matrix extracelular (392 aa)	0.882
XP_001309091.1	Serina peptidasa tipo subtilisina, Clan SB, familia S8 (811 aa)	0.882

XP_001307634.1	Serina peptidasa tipo subtilisina, Clan SB, familia S8 (805 aa)	0.882
XP_001306940.1	Proteína hipotética (474 aa)	0.882
XP_001305301.1	Proteína hipotética (352 aa)	0.882
XP_001304404.1	Serina peptidasa tipo subtilisina, Clan SB, familia S8 (592 aa)	0.882
XP_001302934.1	Proteína hipotética (815 aa)	0.882
XP_001580594.1	Cisteína peptidasa tipo catepsina L, Clan CA, familia C1, (293 aa)	0.796
XP_001580568.1	Cisteína peptidasa tipo catepsina L, Clan CA, familia C1 (305 aa)	0.796
XP_001579911.1	Cisteína peptidasa tipo catepsina L, Clan CA, familia C1 (317 aa)	0.796
XP_001579738.1	Cisteína peptidasa tipo catepsina L o K, Clan CA, familia C1 (320 aa)	0.796
XP_001330457.1	Cisteína peptidasa tipo catepsina L, Clan CA, familia C1 (300 aa)	0.796
XP_001330238.1	Cisteína peptidasa tipo catepsina L, Clan CA, familia C1 (291 aa)	0.796
XP_001329727.1	Cisteína peptidasa tipo catepsina B, Clan CA, familia C1 (253 aa)	0.796
XP_001328382.1	Cisteína peptidasa tipo catepsina L, Clan CA, familia C1 (305 aa)	0.796
CP1	Cisteína peptidasa tipo catepsina L, Clan CA, familia C1 (309 aa)	0.796
XP_001326142.1	Cisteína peptidasa tipo catepsina B, Clan CA, familia C1 (241 aa)	0.796
XP_001326005.1	Cisteína peptidasa tipo catepsina L, Clan CA, familia C1 (305 aa)	0.796
XP_001325526.1	Cisteína peptidasa tipo catepsina L, Clan CA, familia C1 (305 aa)	0.796
XP_001325205.1	Cisteína peptidasa tipo catepsina L, Clan CA, familia C1 (306 aa)	0.796
XP_001324382.1	Cisteína peptidasa tipo catepsina L, Clan CA, familia C1 (310 aa)	0.796
XP_001323959.1	Cisteína peptidasa tipo catepsina B, Clan CA, familia C1 (255 aa)	0.796
XP_001323249.1	Cisteína peptidasa tipo catepsina L, Clan CA, familia C1 (315 aa)	0.796

XP_001322190.1	Cisteína peptidasa tipo catepsina B, Clan CA, familia C1 (288 aa)	0.796
XP_001321671.1	Cisteína peptidasa tipo catepsina L o H, Clan CA, familia C1 (435 aa)	0.796
XP_001321164.1	Cisteína peptidasa tipo catepsina L, Clan CA, familia C1 (452 aa)	0.796
XP_001320393.1	Cisteína peptidasa tipo catepsina L, Clan CA, familia C1 (493 aa)	0.796
CP2	Cisteína peptidasa tipo catepsina L, Clan CA, familia C1 (314 aa)	0.796
XP_001318458.1	Cisteína peptidasa tipo catepsina L, Clan CA, familia C1 (317 aa)	0.796
XP_001318243.1	Cisteína peptidasa tipo catepsina L, Clan CA, familia C1 (294 aa)	0.796
XP_001317882.1	Cisteína peptidasa tipo catepsina B, Clan CA, familia C1 (241 aa)	0.796
XP_001316414.1	Cisteína peptidasa tipo catepsina L, Clan CA, familia C1 (305 aa)	0.796
XP_001315639.1	Cisteína peptidasa tipo catepsina L, Clan CA, familia C1 (305 aa)	0.796
XP_001315160.1	Cisteína peptidasa tipo catepsina L, Clan CA, familia C1 (462 aa)	0.796

kDa (forma procesada de Tv-CatD) por el anticuerpo anti Tv-CatDr. Estos resultados sugieren que Tv-CatD se localiza en el núcleo del parásito en su forma procesada de ~25 kDa, aunque también se encuentra SAF. La Figura 8.9C corresponde al WB con el anticuerpo comercial anti-Fibrilarina (1:100) usado como control nuclear y con anti-EhHK (1:1000), anticuerpo usado como control citoplásmico. La fibrilarina se encontró más enriquecida en las fracciones nucleares mientras que TvHK se observó en las fracciones citoplásmicas y en los extractos totales sugiriendo que el fraccionamiento celular se realizó adecuadamente. En el WB con el suero preinmune no hubo ningún reconocimiento, como era de esperarse (Figura 8.9D).

8.3. Efecto del hierro en la cantidad de proteína Tv-CatD

8.3.1. Ensayo de inmunofluorescencia indirecta

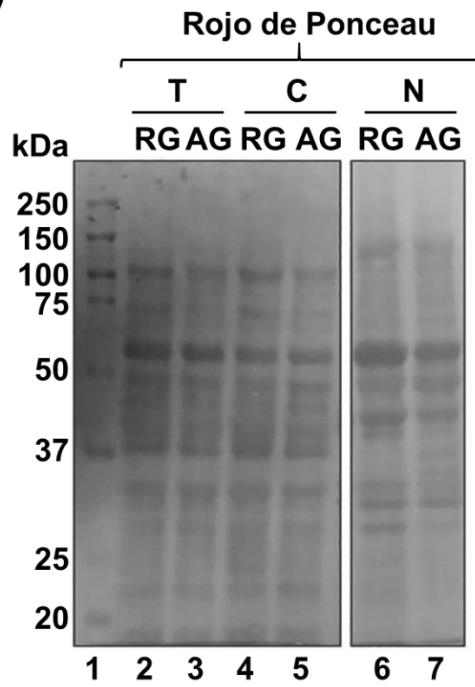
Tv-CatD es regulada positivamente por hierro de acuerdo con los resultados obtenidos por inmunofluorescencia indirecta (Figura 8.10). En parásitos cultivados en alto hierro se observó mayor intensidad de fluorescencia comparado con los parásitos cultivados en normal y restricción de hierro.

Tv-CatD se localizó en diferentes zonas dentro del parásito (Figura 8.11). En la condición de alto hierro Tv-CatD parece localizarse en la superficie del parásito, en pequeñas vesículas en el citoplasma, perinuclear (que pudiera corresponder al retículo endoplásmico) y en el núcleo, ya que hay una colocalización con DAPI (coeficiente de colocalización $r = 0.77$) (región en color cian). Sin embargo, para confirmar la localización en membrana será necesario marcar a la membrana del parásito con DIL y observar la colocalización de FITC con DIL en color amarillo.

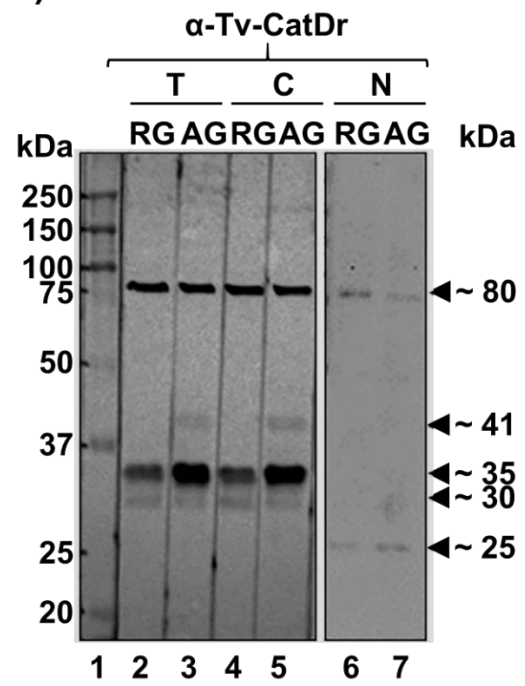
La localización de Tv-CatD en parásitos cultivados en hierro normal es muy similar a la observada en los parásitos cultivados en alto hierro. La Tv-CatD se observó localizada en vesículas citoplásmicas; perinuclear, posiblemente en RE; en el núcleo (coeficiente de colocalización $r = 0.7$), aunque en menor cantidad que en la condición de alto hierro, y posiblemente en la superficie del parásito (Figura 8.12). En cambio, en parásitos cultivados en restricción de hierro Tv-CatD se localizó en

Figura 8.9. Fraccionamiento celular de *T. vaginalis* en diferentes condiciones de glucosa. A) Membrana teñida con rojo de Ponceau; B) WB con el anticuerpo anti-Tv-CatDr (1:100 para T y C y 1:50 para N); C) WB con el anticuerpo comercial anti-fibrilarina (α -FB) (1:100) (Santa Cruz Biotechnology), usado como control nuclear y con el anticuerpo anti-hexocinasa de amiba (α -EhHK) (1:1000) que reconoce a la TvHK, como control citoplásmico. D) WB con el suero preinmune (SPI) usado como control negativo. El anticuerpo anti-Tv-CatDr fue revelado por color, solo para las fracciones totales y citoplásmicas, el resto de los anticuerpos fueron detectados por quimioluminiscencia. RG: restricción de glucosa, AG: alta glucosa, T: total, C: citoplasma, N: núcleo.

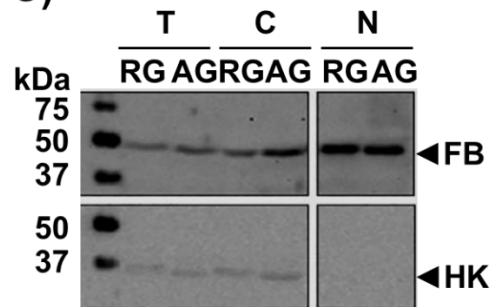
A)



B)



C)



D)

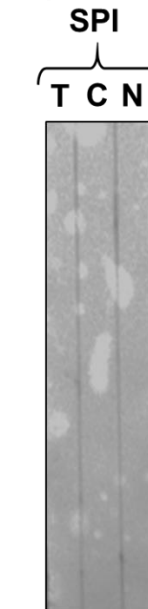


Figura 8.10. Efecto del hierro sobre Tv-CatD. Ensayo de inmunofluorescencia indirecta que muestra el efecto del hierro sobre la cantidad de Tv-CatD, así como su localización subcelular en las condiciones de restricción (RH), normal (NH) y alto hierro (AH). Se usó el suero preinmune (SPI) como control negativo. Las imágenes muestran a Tv-CatD marcada con FITC (en verde) y a los núcleos marcados con DAPI (en azul). Barra de escala: 20 μ m.

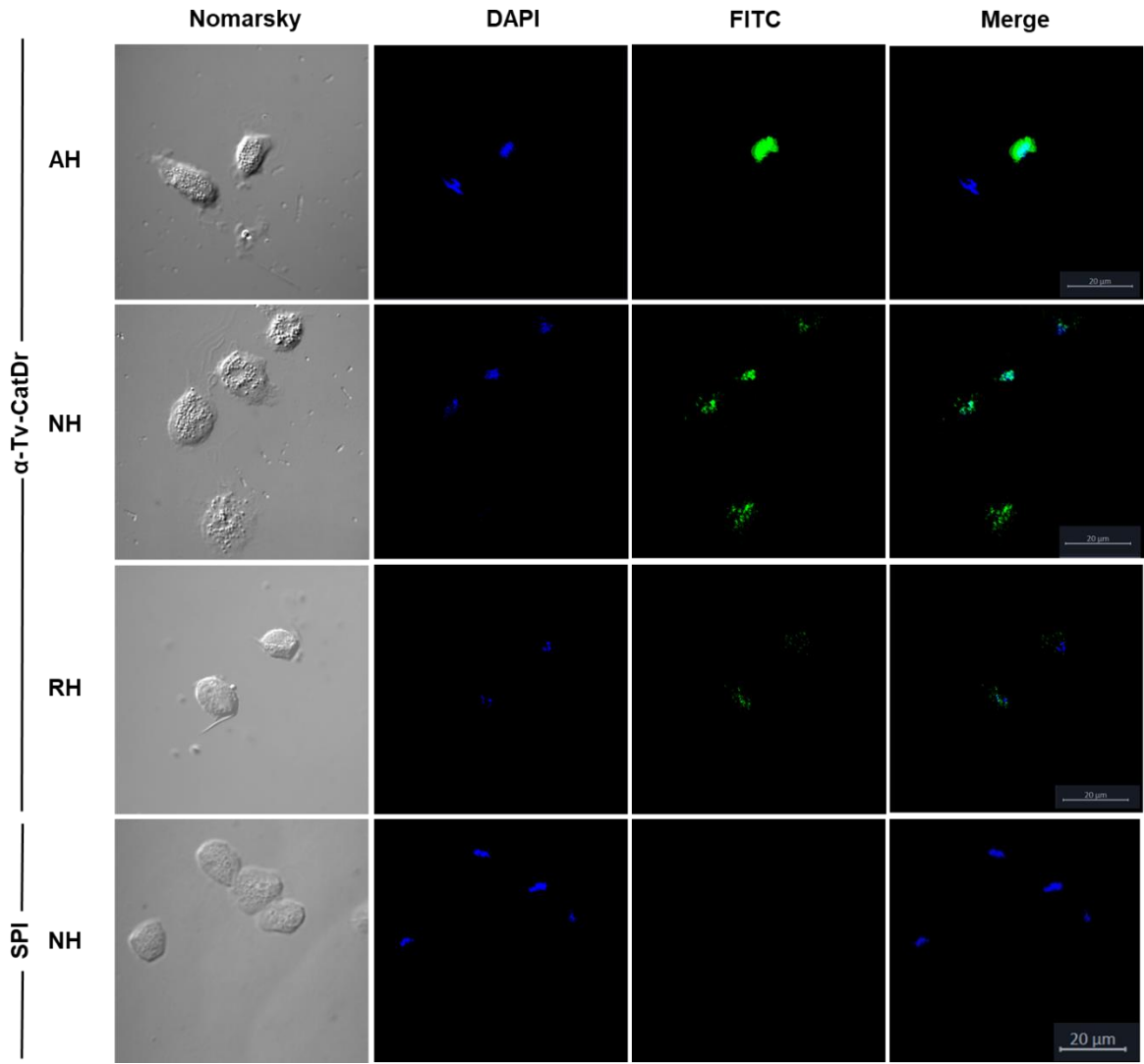


Figura 8.11. Efecto de alto hierro en la inmunolocalización de Tv-CatD en *T. vaginalis*. Ensayo de inmunofluorescencia indirecta que muestra la localización subcelular de Tv-CatD en parásitos cultivados en alto hierro. Las imágenes corresponden a diferentes cortes ópticos de un mismo campo. Las flechas blancas muestran la posible localización de Tv-CatD en la superficie del parásito; la punta de flecha en blanco señala la localización en citoplasma; el asterisco en blanco muestra la localización perinuclear y el punto en blanco indica la localización nuclear. Las imágenes muestran a Tv-CatD marcada con FITC (en verde) y a los núcleos marcados con DAPI (en azul). Barra de escala: 20 μm .

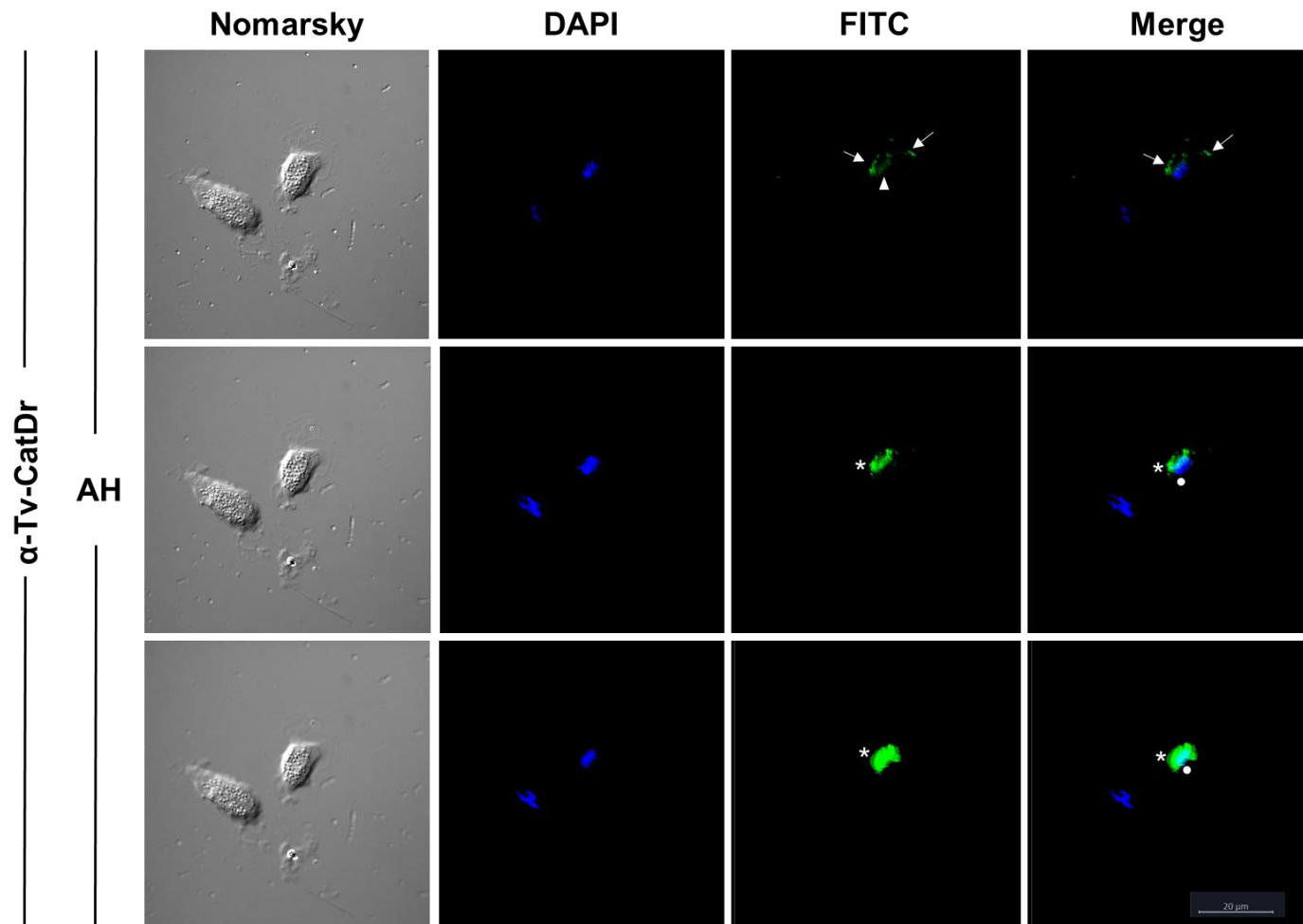
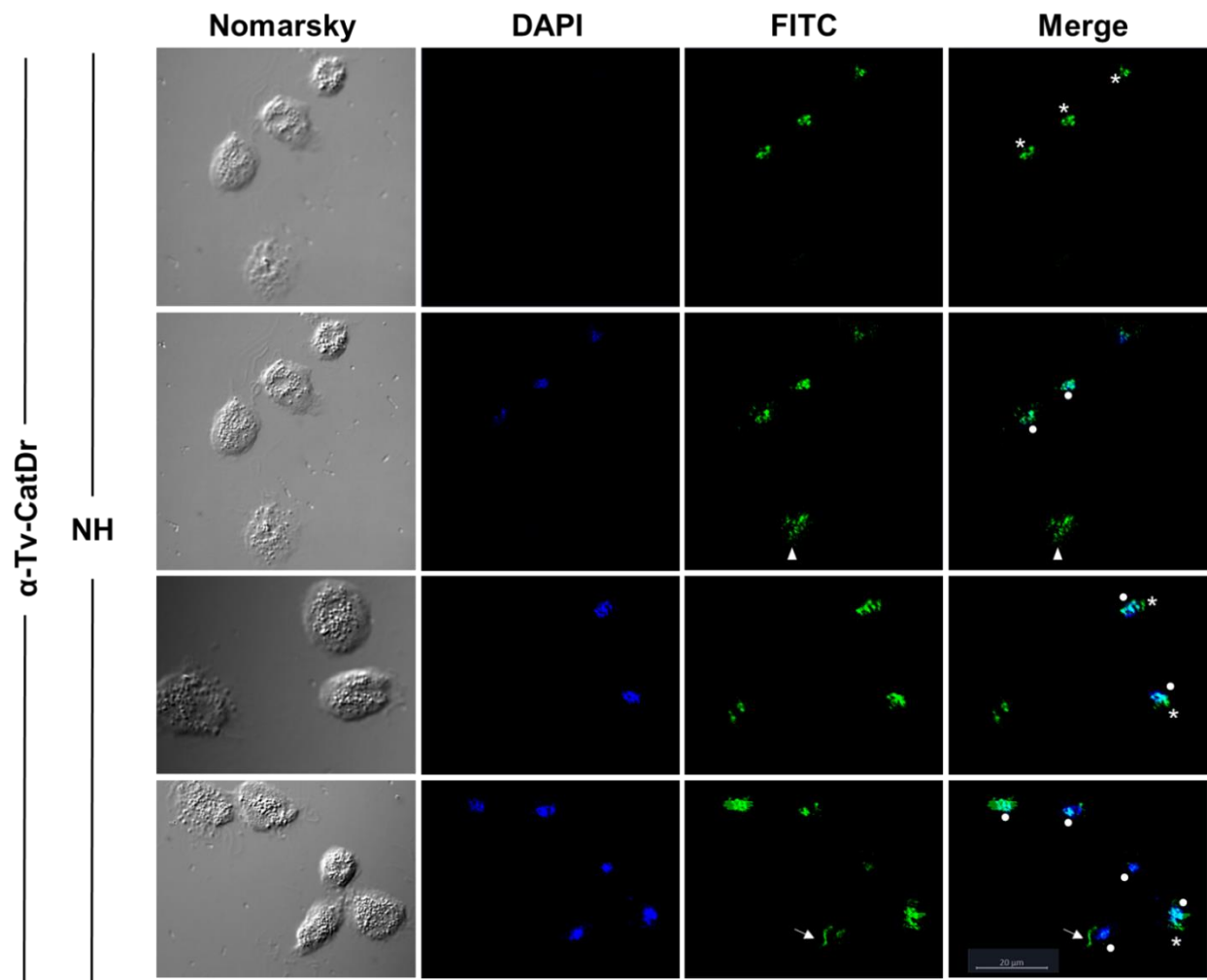


Figura 8.12. Efecto de las concentraciones normales de hierro en la inmunolocalización de Tv-CatD en *T. vaginalis*. Ensayo de inmunofluorescencia indirecta que muestra la localización subcelular de Tv-CatD en la condición de hierro normal en diferentes campos y cortes celulares. La flecha muestra la posible localización en la superficie del parásito; punta de flecha señala la localización en citoplasma; asterisco muestra la localización perinuclear y el punto indica la localización nuclear. Las imágenes muestran a Tv-CatD marcada con FITC (en verde) y a los núcleos marcados con DAPI (en azul).



pequeñas vesículas el citoplasma, de forma perinuclear y en menor medida en el núcleo (coeficiente de colocalización $r=0.68$) (Figura 8.13).

La localización de Tv-CatD en parásitos cultivados en hierro normal es muy similar a la observada en los parásitos cultivados en alto hierro. La Tv-CatD se observó localizada en vesículas citoplásmicas; perinuclear, posiblemente en RE; en el núcleo (coeficiente de colocalización $r= 0.7$), aunque en menor cantidad que en la condición de alto hierro, y posiblemente en la superficie del parásito (Figura 8.12). En cambio, en parásitos cultivados en restricción de hierro Tv-CatD se localizó en pequeñas vesículas el citoplasma, de forma perinuclear y en menor medida en el núcleo (coeficiente de colocalización $r=0.68$) (Figura 8.13).

En los parásitos cultivados en alto hierro, pero principalmente en hierro normal, la Tv-CatD que se localizó en el núcleo se encontró en regiones bien definidas, ya que se observó marca en diversos puntos (que podrían corresponder a los cromosomas de *T. vaginalis*; Gómez-Conde *et al.*, 2000) y no difusa en todo el núcleo como en AH (Figura 8.14). Este tipo de marcaje podría sugerir que Tv-CatD tenga como blanco enzimático a ciertas proteínas de la cromatina como las histonas (Khalkhali-Elli *et al.*, 2014) y/o que interaccione con proteínas específicas como factores de transcripción y así contribuir a la regulación génica del parásito (Bach *et al.*, 2015). A su vez, estas posibles funciones de Tv-CatD en el núcleo de *T. vaginalis* podrían actuar en conjunto para localizarla en regiones específicas.

Por lo anterior, se realizaron cinéticas enzimáticas para evaluar la actividad enzimática de Tv-CatD presente en extractos nucleares y se propone en un futuro realizar co-inmunoprecipitación con la fracción nuclear para identificar a las proteínas que interactúan con Tv-CatD e identificar a algunas de sus proteínas blanco.

8.3.2. Fraccionamiento celular

Para confirmar las diferentes localizaciones de Tv-CatD por efecto de hierro en el cultivo, principalmente la localización nuclear, se realizó fraccionamiento

Figura 8.13. Efecto de la restricción de hierro en la inmunolocalización de Tv-CatD en *T. vaginalis*. Ensayo de inmunofluorescencia indirecta que muestra la localización subcelular de Tv-CatD en parásitos cultivados en restricción de hierro en diferentes campos y cortes celulares. La flecha muestra la localización cercana a la superficie; punta de flecha señala la localización en citoplasma; asterisco muestra la localización perinuclear y el punto indica la localización nuclear. Las imágenes muestran a Tv-CatD marcada con FITC (en verde) y a los núcleos marcados con DAPI (en azul).

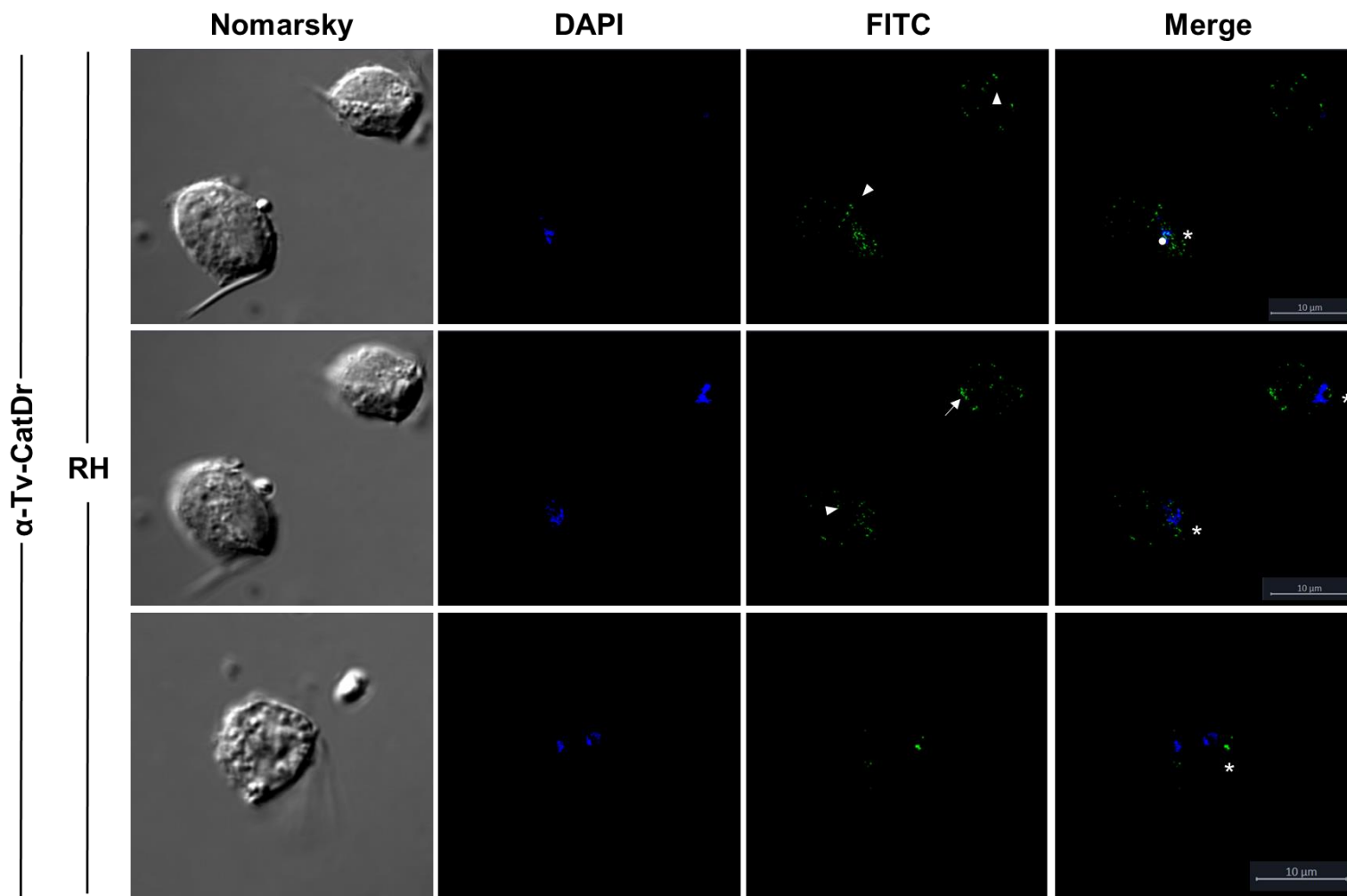
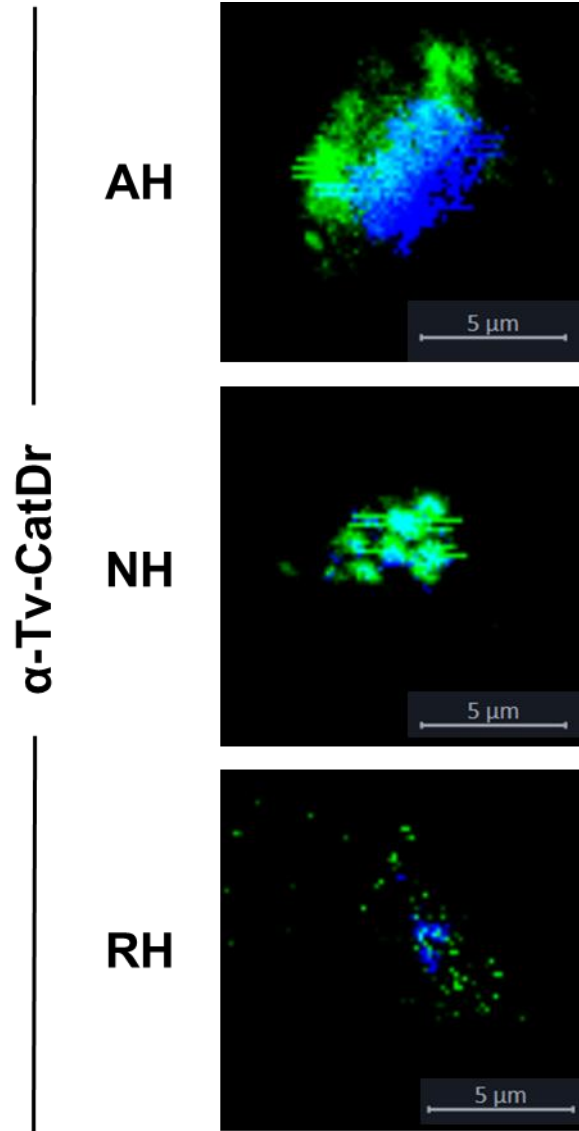


Figura 8.14. Análisis comparativo del efecto del hierro en la localización nuclear de Tv-CatD en *T. vaginalis*. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta que muestran la localización nuclear de Tv-CatD en parásitos cultivados en restricción (RH), normal (NH) y alto hierro (AH). Las imágenes muestran a Tv-CatD marcada con FITC (en verde) y a los núcleos marcados con DAPI (en azul). Barra de escala: 5 μ m.

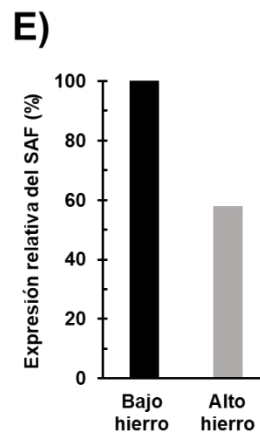
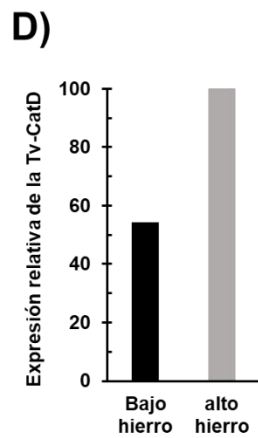
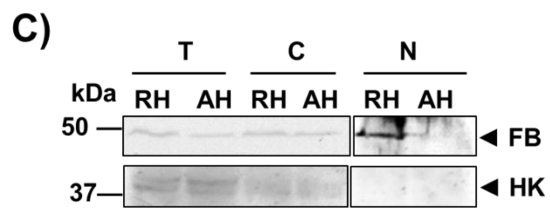
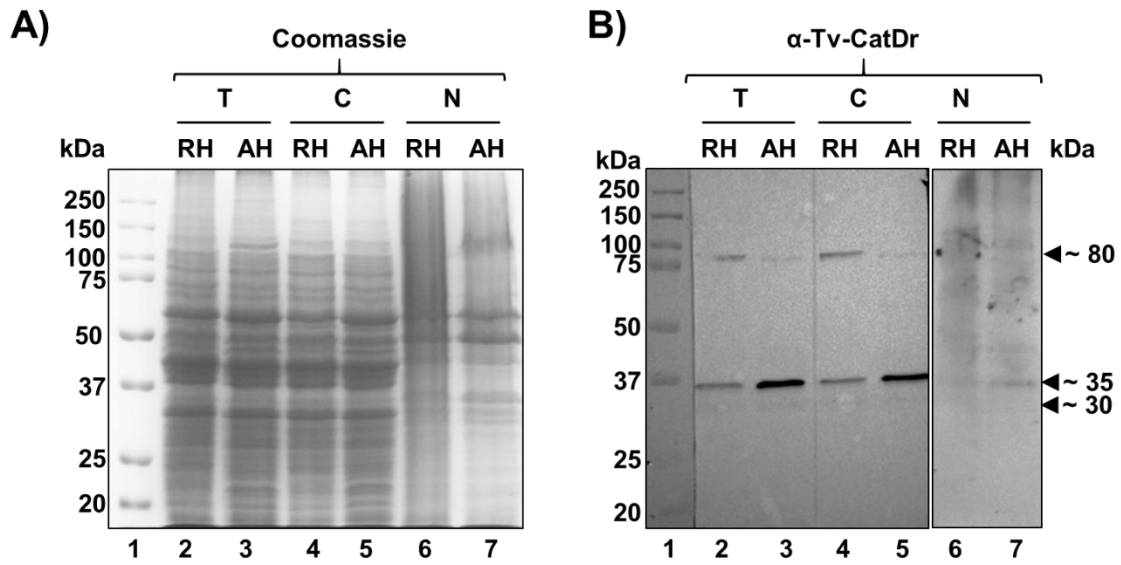


celular y ensayos de WB. En la Figura 8.15A se muestra el gel teñido con azul de Coomassie de las diferentes fracciones obtenidas, total (T), citoplásmica (C) y nuclear (N), donde se observan los patrones de proteínas de las condiciones de restricción (RH) y alto hierro (AH). En la Figura 8.15B se presentan los resultados del WB con el anticuerpo anti-Tv-CatDr, se puede apreciar el reconocimiento de varias bandas en el extracto total y citoplásmico: una en ~80 kDa que pudiera corresponder a SAF, otra en ~35 kDa que corresponde a Tv-CatD madura y una tercera en ~30 kDa que corresponde a una forma procesada de Tv-CatD. Sin embargo, en la fracción nuclear solo se detectó el reconocimiento de dos bandas: la primera en ~80 kDa que podría corresponder a SAF y la segunda en ~35 kDa que corresponde a la Tv-CatD madura. Este último resultado puede sugerir que Tv-CatD podría tener una función enzimática en el núcleo de *T. vaginalis* dado que se encontró a la forma madura. La Figura 8.15C corresponde al WB con el anticuerpo comercial anti-FB (1:100) usado como control nuclear y con el anticuerpo anti-EhHK (1:1000), usado como control citoplásmico.

Además, se observa que el extracto total, en extractos de parásitos cultivados en alto hierro hay mayor cantidad de Tv-CatD madura en comparación con los de restricción de hierro (Figura 8.15D). Este resultado sugiere que Tv-CatD se regula positivamente por hierro y es consistente con lo observado en los ensayos de inmunofluorescencia indirecta. Con respecto al extracto nuclear, también se observó que la banda de ~35 kDa del extracto de parásitos en alto hierro es más intensa que en restricción de hierro, lo cual también es consistente con lo observado por inmunofluorescencia indirecta. Por tanto, se puede confirmar que Tv-CatD se encuentra en el núcleo del parásito y esta localización es mayor en parásitos cultivados en alto hierro.

La proteína SAF también parece estar regulada negativamente por hierro, ya que en extractos de parásitos cultivados en restricción de hierro la cantidad de proteína es mayor en comparación con los de alto hierro (Figura 8.15E).

Figura 8.15. Fraccionamiento celular de *T. vaginalis* en diferentes condiciones de hierro. A) Gel teñido con azul de Coomassie del extracto total (T), citoplásmico (C) y nuclear (N) de las condiciones de restricción (RH) y alto hierro (AH). B) WB con el anticuerpo anti-Tv-CatDr (1:100 para T y C y 1:50 para N). C) WB con el anticuerpo comercial anti-fibrilarina (α -FB) (1:100) (Santa Cruz Biotechnology), usado como control nuclear y con el anticuerpo anti-hexocinasa (α -EhHK) (1:1000), como control citoplásmico. El anticuerpo anti-Tv-CatDr fue revelado por color, solo para las fracciones totales y citoplásmicas, el resto de los anticuerpos fueron detectados por quimioluminiscencia. D) y E) Análisis densitométrico, las gráficas de barras muestran la cantidad relativa de la Tv-CatD madura (D) o SAF (E) tomando como 100% a la condición de alto hierro (D) o a la condición de bajo hierro (E).



8.4. Actividad proteolítica de Tv-CatD

8.4.1. Efecto de la glucosa en la actividad proteolítica de Tv-CatD de *T. vaginalis*

Dado que por WB se identificó a la forma madura de Tv-CatD en el núcleo de *T. vaginalis*, se realizaron ensayos de actividad enzimática utilizando un sustrato fluorogénico sintético específico para catepsinas D y E denominado D-AMC (MCA-Gly-Lys-Pro-Ile-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Lys(DNP)-D-Arg-amida) a pH 4.5 y 7.0. Considerando que *T. vaginalis* no posee catepsinas E (Carlton *et al.*, 2007), el ensayo se hace específico para Tv-CatD.

En los ensayos de actividad utilizando el extracto total de *T. vaginalis* cultivados en restricción y alta glucosa y a pH 4.5, Tv-CatD presentó mayor actividad proteolítica en parásitos cultivados en alta glucosa ($m=25.23$) (ver apéndice) en comparación con los de restricción de glucosa ($m=19.67$) (ver apéndice) (Figura 8.16). Cuando se añadió cobre como inhibidor de APs al ensayo, la actividad de Tv-CatD se inhibió de forma similar a lo reportado por Mancilla-Olea y col. (2018). A pH 7.0 la actividad proteolítica de Tv-CatD también decayó a los niveles en presencia de cobre como inhibidor (Figura 8.16).

Tv-CatD nuclear presentó muy poca actividad proteolítica cuando se analizó a pH 4.5 (Figura 8.17A) y se comparó con la actividad del extracto total. La actividad proteolítica de la Tv-CatD nuclear representa ~5% en restricción de glucosa y ~6% en alta glucosa con respecto a la actividad enzimática en el extracto total de cada condición (Figura 8.18). En cambio, cuando se evaluó a pH 7.0 la actividad proteolítica de Tv-CatD en los extractos nucleares de parásitos cultivados en ambas concentraciones de glucosa aumentó (Figura 8.17 B) aproximadamente al doble, tanto en restricción como en alta glucosa (Figura 8.19).

8.4.2. Efecto del hierro en la actividad proteolítica de Tv-CatD de *T. vaginalis*

Al analizar la actividad total de Tv-CatD proveniente de parásitos cultivados en restricción y alto hierro, se observó mayor actividad proteolítica en la condición

Figura 8.16. Efecto de la glucosa en la actividad proteolítica de Tv-CatD de extractos totales de *T. vaginalis*. Los ensayos de actividad proteolítica de Tv-CatD se realizaron por 5 min a partir de extractos totales de parásitos cultivados en restricción de glucosa (cuadro con línea negra) y alta glucosa (círculo con línea gris) y en presencia de cobre como control de inhibición (rombo con línea negra para baja glucosa y rombo con línea gris para alta glucosa). Los ensayos anteriores se realizaron a pH 4.5. También se analizó la actividad proteolítica de Tv-CatD a pH 7.0 de extractos totales de parásitos cultivados en restricción de glucosa (cuadro negro) y en alta glucosa (círculo gris). La actividad se muestra en unidades relativas de fluorescencia (URF). RG: restricción de glucosa, AG: alta glucosa.

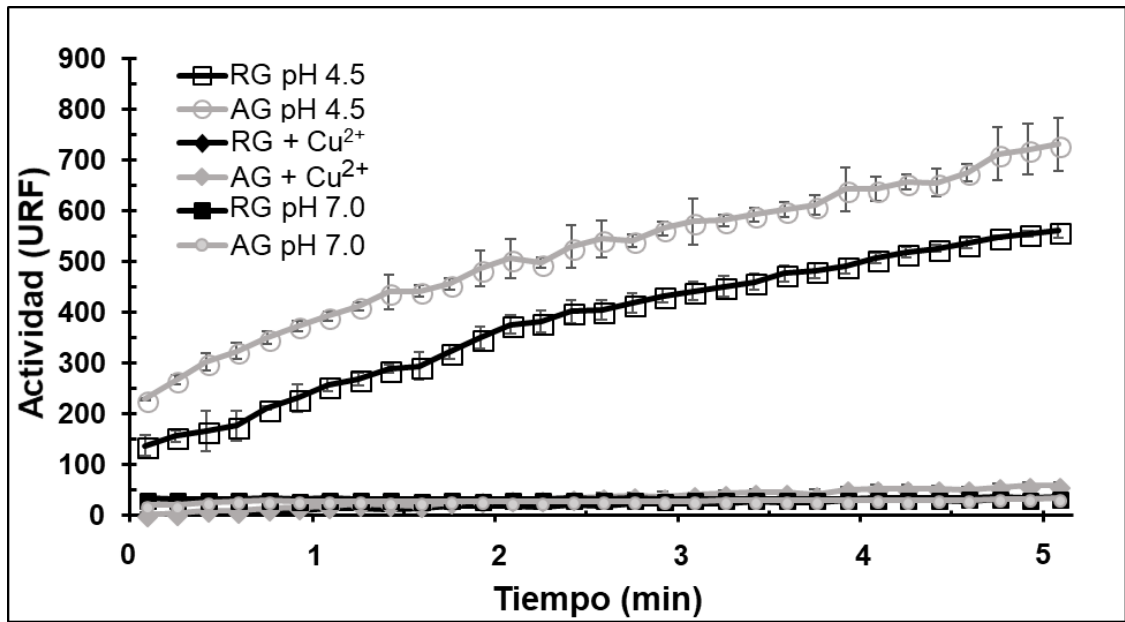
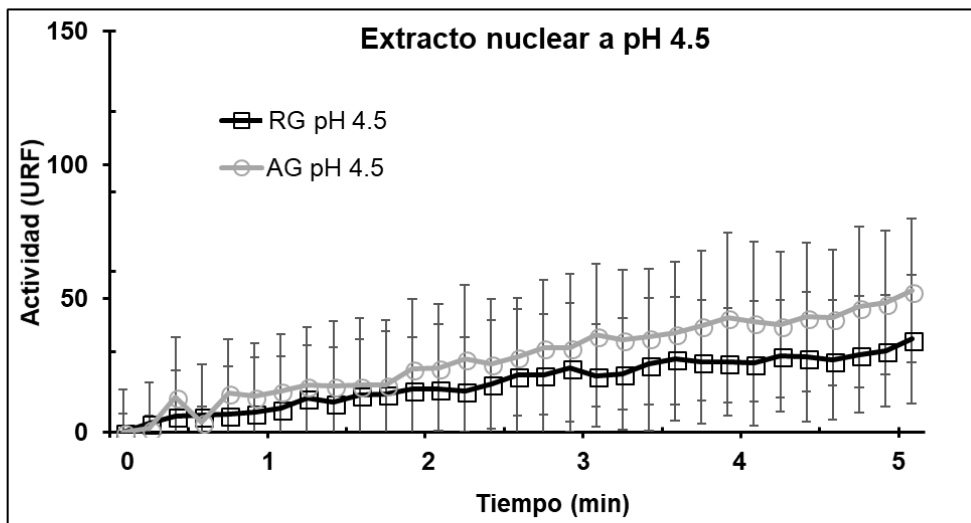


Figura 8.17. Efecto de la glucosa en la actividad proteolítica de Tv-CatD en extractos nucleares de *T. vaginalis*. Los ensayos de actividad proteolítica de Tv-CatD se realizaron por 5 min a partir de extractos nucleares de parásitos cultivados en restricción de glucosa (líneas negras) y en alta glucosa (líneas grises) a pH 4.5 (A) y a pH 7.0 en presencia o ausencia de cobre como inhibidor de APs (B). La actividad se muestra en unidades relativas de fluorescencia (URF). RG: restricción de glucosa, AG: alta glucosa.

A)



B)

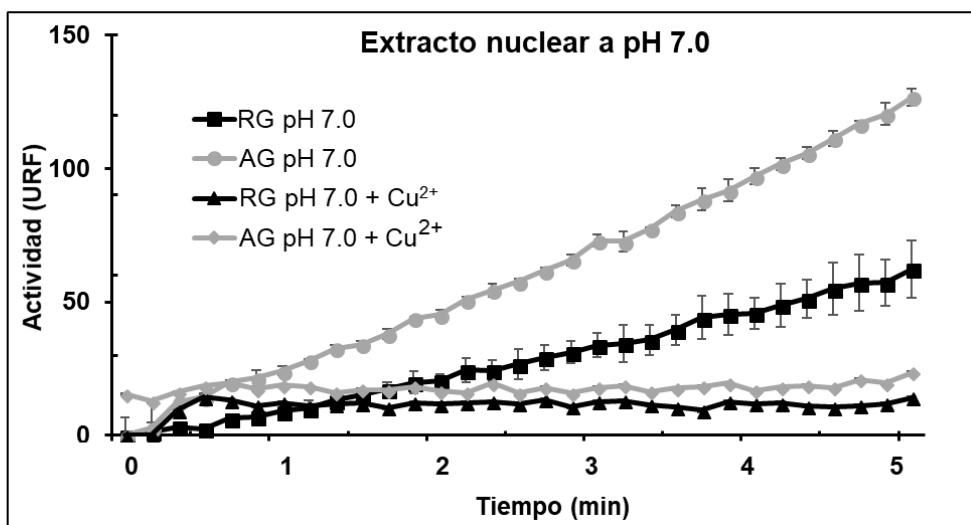
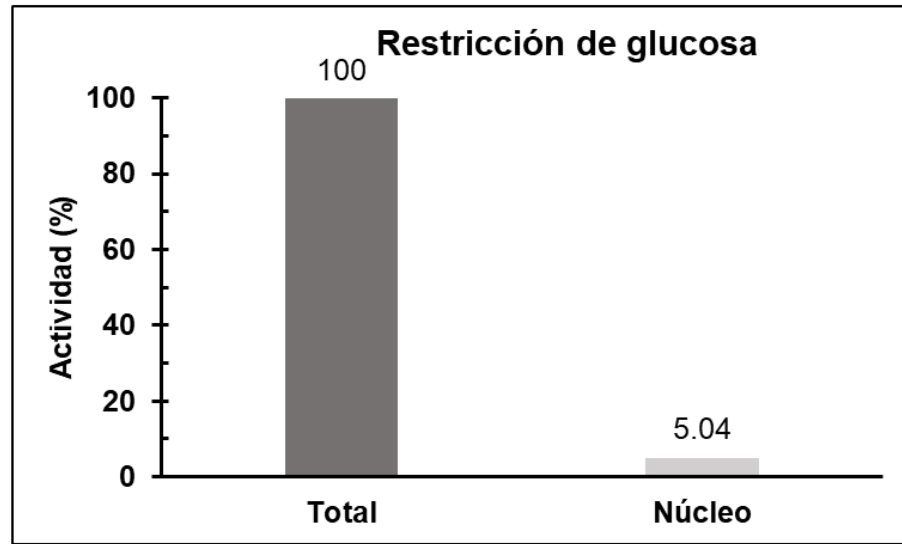


Figura 8.18. Relación de la actividad proteolítica de Tv-CatD nuclear con respecto a la actividad total de extractos de parásitos cultivados en restricción o alta glucosa a pH 4.5. A) Porcentaje de actividad proteolítica de Tv-CatD nuclear con respecto a la actividad total en restricción glucosa. B) Porcentaje de actividad proteolítica de Tv-CatD nuclear con respecto a la actividad total en alta glucosa.

A)



B)

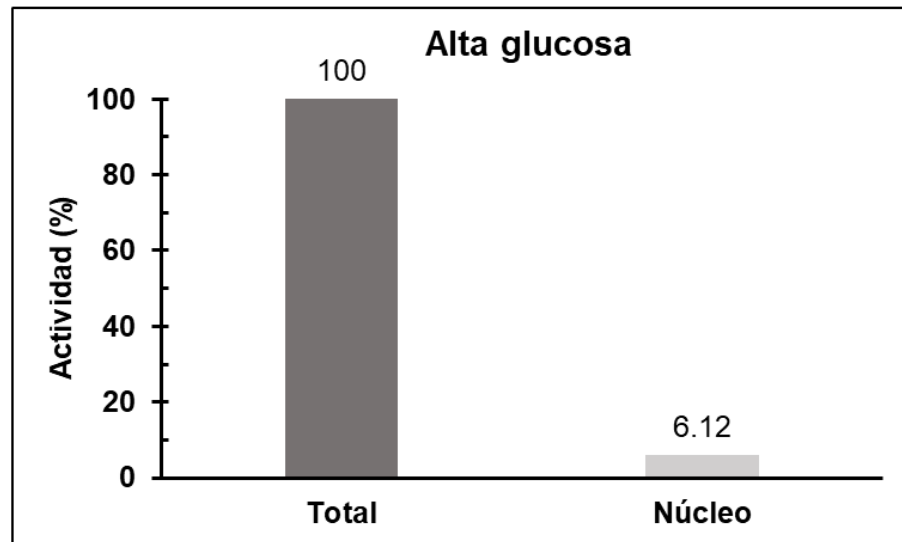
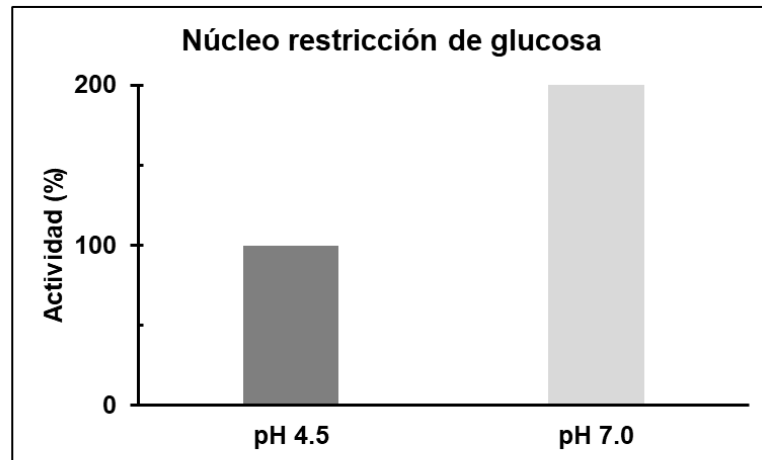
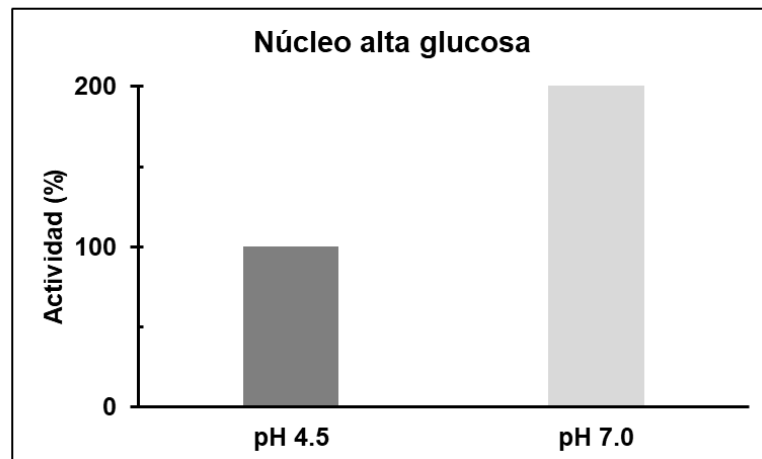


Figura 8.19. Incremento de la actividad de Tv-CatD nuclear a pH 7.0. A) Porcentaje de la actividad proteolítica de Tv-CatD nuclear a pH 7.0 comparada con la actividad proteolítica a pH 4.5. en restricción de glucosa y B) en alta glucosa.

A)



B)



de alto hierro (Figura 8.20) ($m=14.89$) en comparación con la condición de restricción de hierro ($m=11.84$) (ver apéndice) a pH 4.5 y se observó una relación directa entre la cantidad de proteína y la actividad enzimática (a mayor cantidad de proteína, mayor actividad enzimática). Sin embargo, la actividad proteolítica de Tv-CatD se redujo drásticamente a pH 7.0. Al añadir cobre la actividad de Tv-CatD se inhibió aún más como se esperaba (Figura 8.20).

Tv-CatD nuclear de parásitos cultivados en restricción y alto hierro presentó muy poca actividad proteolítica cuando se analizó a pH 4.5 (Figura 8.21A) comparada con la actividad del extracto total, representando ~20% para restricción de hierro y ~9% para alto hierro (Figura 8.22). En cambio, cuando se evaluó a pH 7.0 la actividad de Tv-CatD aumentó en restricción de hierro, pero disminuyó en alto hierro (Figura 8.21B), en comparación con la actividad proteolítica obtenida a pH 4.5. La actividad proteolítica de Tv-CatD aumentó aproximadamente dos veces a pH 7.0 en restricción de hierro (Figura 8.23A), mientras que disminuyó a la mitad en alto hierro (Figura 8.23B).

Si se compara la actividad proteolítica de Tv-CatD de los extractos totales de parásitos cultivados en las cuatro condiciones ambientales estudiadas (RG, AG, RH y AH) se puede apreciar que la actividad proteolítica máxima se obtuvo en los extractos de alta glucosa ($m= 25.23$), seguida de los de baja glucosa ($m= 19.67$) y de los de alto hierro ($m= 14.89$), mientras que la menor actividad proteolítica se observó en los extractos de restricción de hierro ($m= 11.84$). Con respecto a la actividad proteolítica de Tv-CatD nuclear a pH 7.0, ésta fue mayor en los extractos nucleares de parásitos cultivados en restricción de hierro ($m= 4.77$), seguida de los de alta glucosa ($m= 4.07$) y los de baja glucosa ($m= 2.07$), mientras que los de alto hierro fueron los que presentaron menor actividad proteolítica ($m= 0.58$) (Figura 8.24).

Figura 8.20. Efecto del hierro en la actividad proteolítica de Tv-CatD en extractos totales de *T. vaginalis*. Los ensayos de actividad proteolítica de Tv-CatD a pH 4.5 se realizaron por 5 min en extractos totales de parásitos cultivados en restricción de hierro (círculo blanco con línea negra) y alto hierro (cuadro blanco con línea gris) y en presencia de cobre como inhibidor control de especificidad (círculo negro con línea negra para la condición de bajo hierro y cuadro gris con línea gris para la condición de alto hierro). También se analizó la actividad de Tv-CatD a pH 7.0 en el mismo tipo de extractos totales en restricción de hierro (rombo negro y línea negra) y alto hierro (triángulo gris y línea gris). La actividad se muestra en unidades relativas de fluorescencia (URF). RH: restricción de hierro, AH: alto hierro.

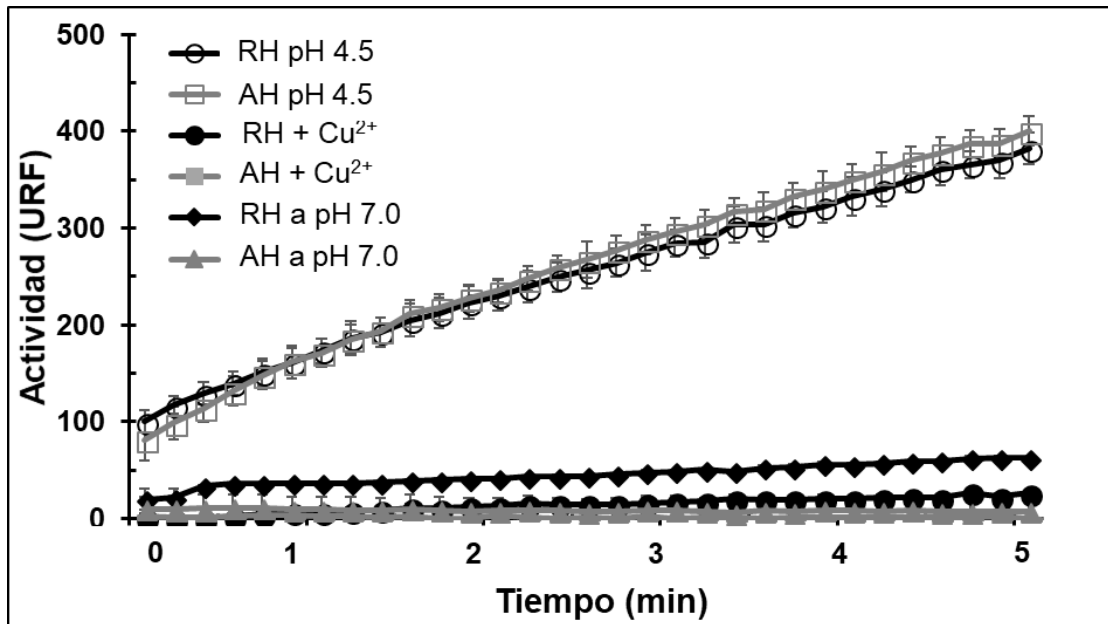
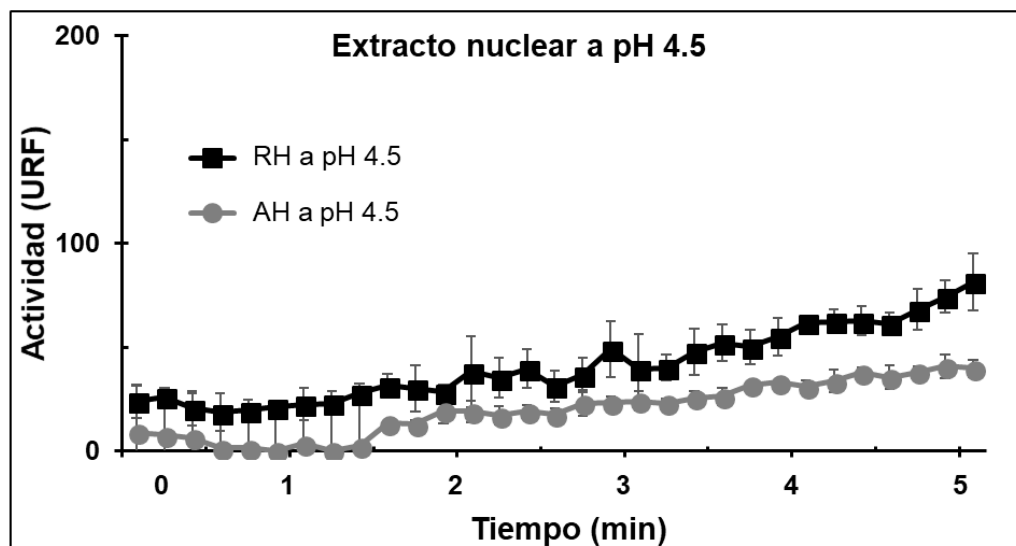


Figura 8.21. Efecto del hierro en la actividad proteolítica de Tv-CatD de extractos nucleares de *T. vaginalis*. Los ensayos de actividad proteolítica de Tv-CatD se realizaron por 5 min con extractos nucleares de parásitos cultivados en restricción de hierro (líneas negras) y alto hierro (líneas grises) a pH 4.5 (A) y pH 7.0 en presencia o ausencia de cobre como inhibidor (B). La actividad se muestra en unidades relativas de fluorescencia (URF). RH: restricción de hierro, AH: alto hierro.

A)



B)

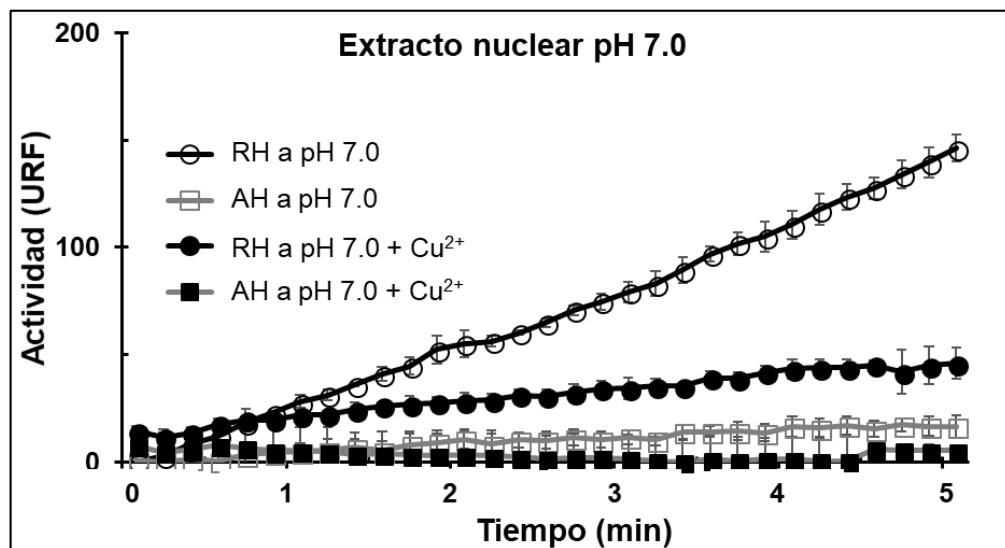
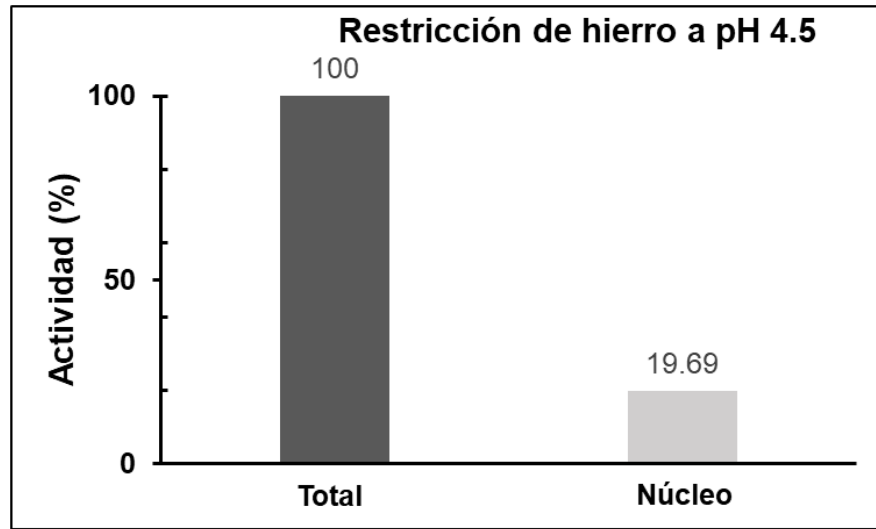


Figura 8.22. Relación de la actividad proteolítica de Tv-CatD nuclear con respecto a la total en diferentes condiciones de hierro a pH 4.5. A) Porcentaje de actividad proteolítica de Tv-CatD nuclear con respecto a la actividad total en restricción de hierro. B) Porcentaje de actividad proteolítica de Tv-CatD nuclear con respecto a la actividad total en alto hierro.

A)



B)

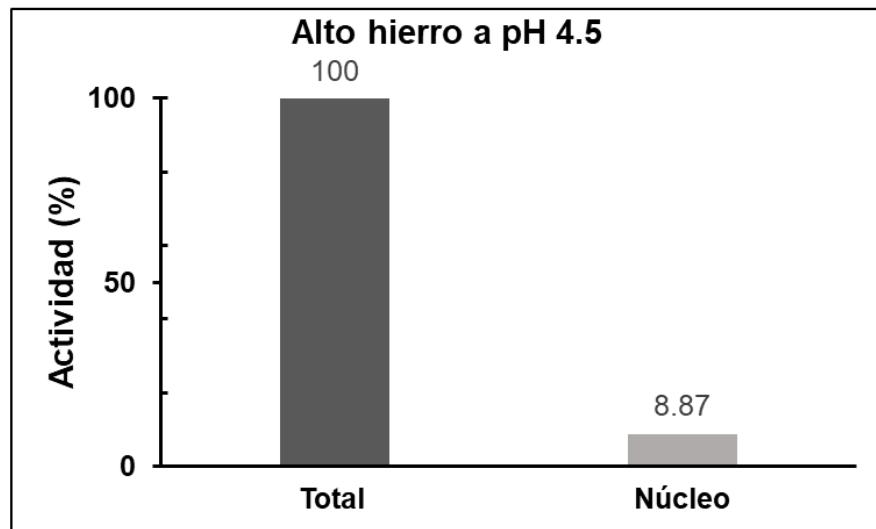
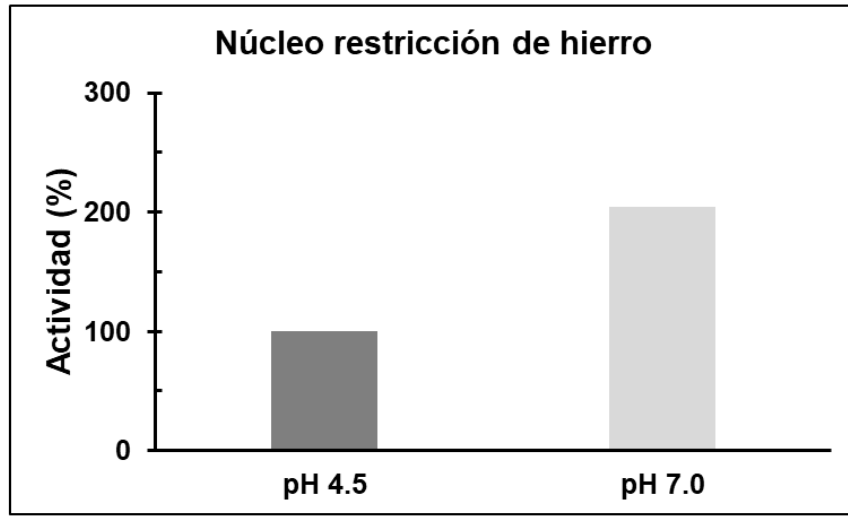


Figura 8.23. Incremento de la actividad proteolítica de Tv-CatD nuclear a pH 7.0. A) Porcentaje de la actividad proteolítica de Tv-CatD nuclear a pH 7.0 comparada con la actividad a pH 4.5. de extractos nucleares de parásitos cultivados en restricción de hierro y B) en alto hierro.

A)



B)

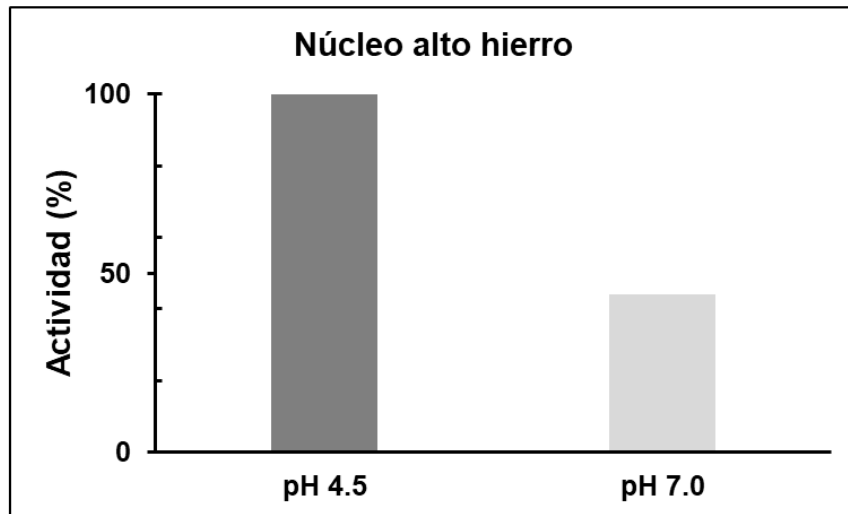
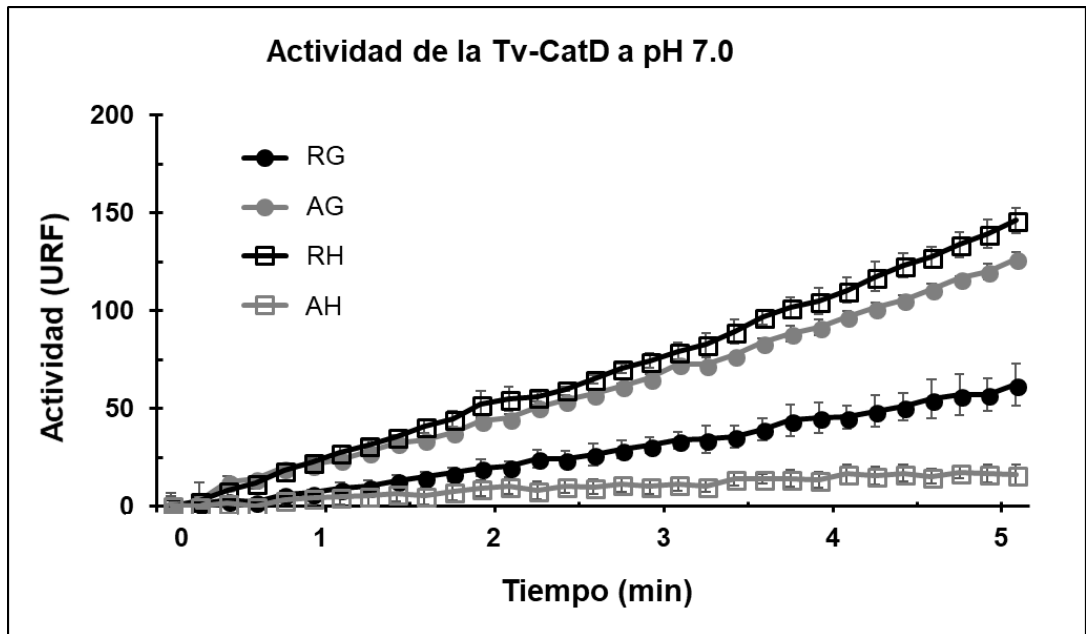


Figura 8.24. Actividad proteolítica de Tv-CatD de extractos nucleares a pH 7.0 de *T. vaginalis* cultivada en diferentes condiciones ambientales. Los ensayos de actividad proteolítica de Tv-CatD nuclear se realizaron por 5 min a pH 7.0 con extractos nucleares de parásitos cultivados en restricción de glucosa (círculo negro), alta glucosa (círculo gris), restricción de hierro (cuadro negro) y alto hierro (cuadro gris). La actividad se muestra en unidades relativas de fluorescencia (URF). RG: restricción de glucosa, AG: alta glucosa, RH: restricción de hierro, AH: alto hierro.



8.5. TC-2 como posible sustrato de Tv-CatD nuclear

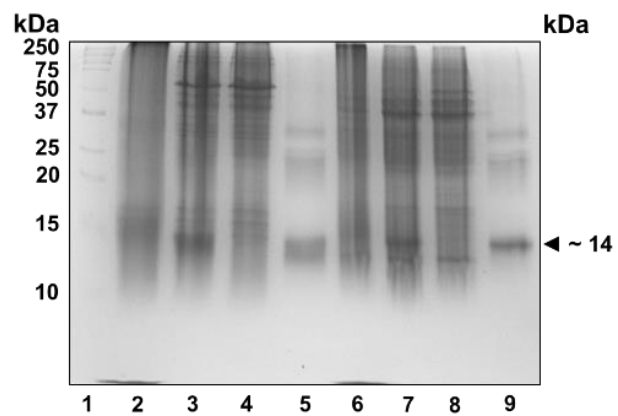
Dado que en tres de las cuatro condiciones en las que se evaluó la actividad enzimática de Tv-CatD nuclear hubo un aumento de la actividad proteolítica a pH 7.0 se realizó un ensayo para identificar al posible sustrato de Tv-CatD. Uno de los posibles sustratos planteados fue el inhibidor endógeno de cisteína proteinasas, tricocistatina 2 (TC-2) que también presenta una localización nuclear (Puentes-Rivera *et al.*, 2014), así como su proteasa blanco, TvCP39 en presencia de putrescina (Carvajal-Gamez *et al.*, 2014).

En la Figura 8.25 se muestran los resultados del ensayo de actividad usando la proteína recombinante TC-2r como posible sustrato de Tv-CatD nuclear. En la figura 8.25A se muestra el gel teñido con azul de Coomassie y se observa que cuando se incubó el extracto nuclear (N) o total (T) de parásitos cultivados en restricción de hierro con TC-2r en presencia de cobre (carriles 2 y 6) se aprecia degradación de todas las proteínas, incluyendo TC-2r, dado que no se observan bandas definidas. En cambio, cuando no se añadió cobre (carriles 3 y 7), la degradación de las proteínas fue menor y la banda de TC-2r se observa definida. Estos resultados sugieren que TC-2r no es un sustrato de Tv-CatD, al menos bajo las condiciones de los ensayos realizados en este estudio. Al incubar solo el extracto nuclear o total (carriles 4 y 8), también se observó degradación proteica, a pesar de que el fraccionamiento celular se realizó en presencia de inhibidores de proteasas (leupeptina y TLCK). En cambio, cuando solo se incubó TC-2r en el amortiguador de reacción, no se observó degradación como era de esperarse. En la figura 8.25B se muestra el WB con el anticuerpo anti-TC-2r (1:1,000). En las condiciones donde se incubó al TC-2r con el extracto nuclear o total de parásitos cultivados en restricción de hierro y en presencia de cobre (carriles 2 y 6), de manera inesperada, se observó degradación del TC-2r, ya que no se observa una banda definida en la región de ~14 kDa. En cambio, en la ausencia de cobre (carriles 3 y 7) la banda detectada por el anticuerpo anti-TC-2r es de menor grosor en comparación con el reconocimiento de la condición donde solo se incubó TC2r (carriles 5 y 9). Lo

Figura 8.25. Ensayo de actividad usando a TC-2r como posible sustrato de Tv-CatD. A) Gel de poliacrilamida al 15% teñido con azul de Coomassie. El patrón de degradación de proteínas nucleares (N) y totales (T) en presencia de TC-2r y cobre se muestran en los carriles 2 y 6; mientras que los patrones proteicos en ausencia de cobre se muestran en los carriles 3 y 7. El patrón de proteínas del extracto nuclear es mostrado en el carril 4 y el del extracto total en el carril 8. Los carriles 5 y 9 muestran a TC-2r incubado en los amortiguadores de reacción a pH 7.0 o a pH 4.5. B) WB de un gel duplicado del panel A con el anticuerpo anti-TC-2r (1:1,000). Los números de los carriles corresponden a las mismas condiciones ya descritas para el gel teñido con azul de Coomassie (panel A). El WB fue revelado por quimioluminiscencia.

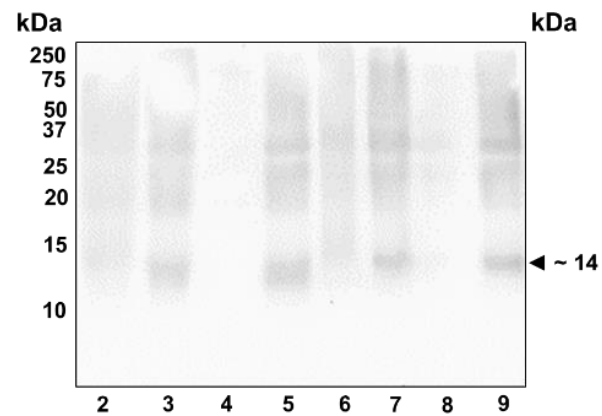
A)

	Coomassie							
	N				T			
Amortiguador fosfato de sodio pH 7.0	+	+	+	+	-	-	-	-
Amortiguador de acetatos pH 4.5	-	-	-	-	+	+	+	+
Proteína nuclear	+	+	+	-	-	-	-	-
Proteína total	-	-	-	-	+	+	+	-
TC2r	+	+	-	+	+	+	-	+
Cu ²⁺	+	-	-	-	+	-	-	-



B)

	α-TC2r							
	N				T			
	+	+	+	+	-	-	-	-
	-	-	-	-	+	+	+	+
	+	+	+	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	+	+	+	-
	+	+	-	+	+	+	-	+
	+	-	-	-	+	-	-	-



anterior pudiera estar sugiriendo que TC-2r es degradado por alguna de las proteasas nucleares de *T. vaginalis* y no precisamente por Tv-CatD, puesto que la condición control (con cobre, que es el inhibidor de Tv-CatD) la degradación fue mayor. Cuando se incubó únicamente al extracto nuclear o total (carriles 4 y 8) no se observó reconocimiento de TC-2 nativo, esto pudo deberse a que la cantidad de proteína que se utilizó como fuente de Tv-CatD nativa en extractos totales y nucleares fue muy poca y/o que TC-2 nativo se degradó por proteasas endógenas del parásito que permanecieron activas en los extractos utilizados.

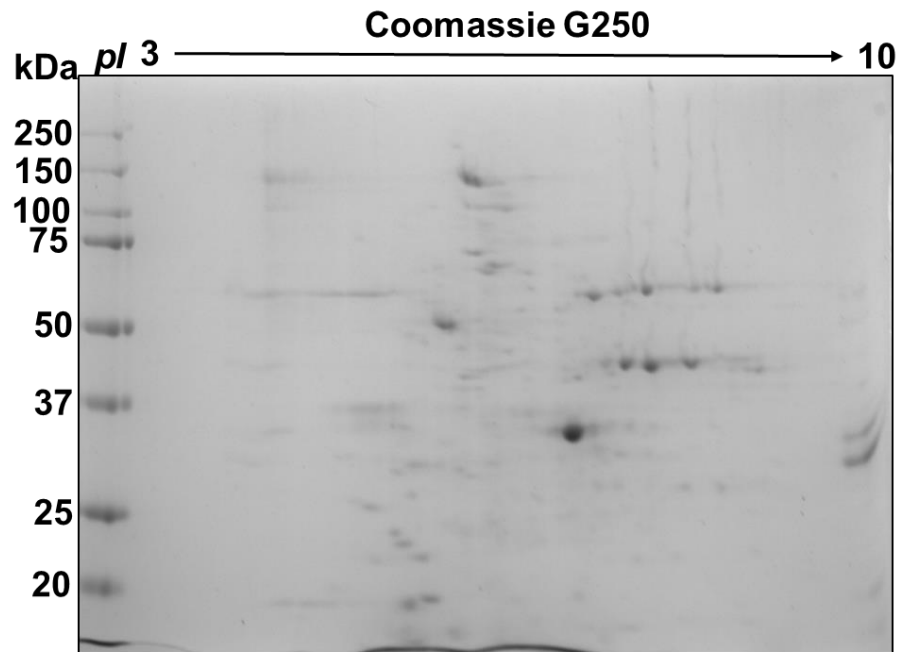
8.6. Electroforesis en doble dimensión del extracto nuclear

Con el objetivo de mejorar la identificación por WB de Tv-CatD del extracto nuclear de parásitos cultivados en glucosa normal se realizó una electroforesis en doble dimensión (Figura 8.26). En el gel teñido con azul de Coomassie G250 se observaron manchas bien definidas (Figura 8.26A), mientras que el WB con el anticuerpo anti-Tv-CatDr se identificaron tres manchas: una en ~120 kDa; la segunda en ~35 kDa, que podría corresponder a la Tv-CatD madura; y la tercera en ~20 kDa, que podría pertenecer a alguna forma procesada de la Tv-CatD (Figura 8.26B). Estas manchas se cortaron del gel y se enviaron a identificar por espectrometría masas. Sin embargo, los péptidos identificados no correspondieron a Tv-CatD (ver apéndice las proteínas identificadas). Esto pudo deberse a varias razones, una de ellas fue que quizás no se cortaron las manchas correctas en el gel, o bien que es tan pequeña la cantidad de Tv-CatD que no permitió su identificación. Por lo que se decidió realizar la identificación de todas las proteínas presentes en el extracto nuclear, pero tampoco se encontraron péptidos de Tv-CatD, posiblemente porque se encuentra en muy bajas cantidades.

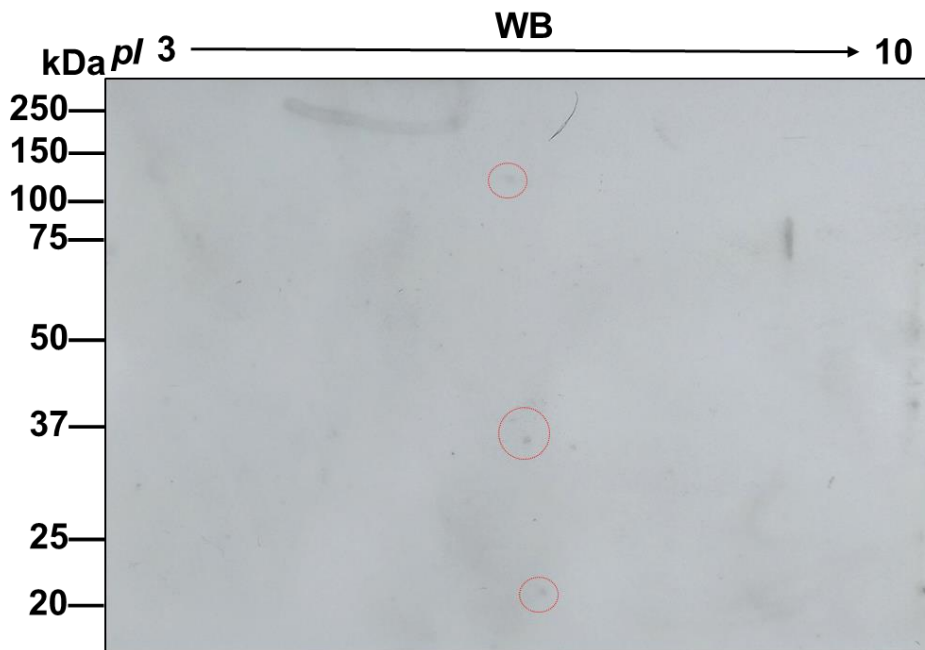
Figura 8.26. Electroforesis en doble dimensión del extracto nuclear en la condición de glucosa normal y WB en 2-DE con el anticuerpo anti-Tv-CatDr.

A) Gel teñido con azul de Coomassie G250 de la electroforesis 2-DE del extracto nuclear de parásitos cultivados en glucosa normal. B) WB de un duplicado del gel del panel (A) con el anticuerpo anti-Tv-CatDr (1:50), las manchas reconocidas por el anticuerpo se muestran señaladas dentro del círculo en color rojo.

A)



B)



8.7. Proteoma nuclear de *T. vaginalis* cultivado en glucosa normal

Mediante espectrometría de masas se identificaron 270 proteínas en el extracto nuclear de *T. vaginalis* cultivado en glucosa normal, de las cuales 105 correspondieron a proteínas asignadas, representando un 39% y 165 correspondieron a proteínas hipotéticas, representando 61% (Figura 8.27).

Las proteínas asignadas se clasificaron en 18 grupos de acuerdo con la función de cada proteína (Figura 8.28A). Por ejemplo, la distribución de las proteínas identificadas fue: 25 ribosomales, 12 que participan en procesos de señalización, 10 en transporte vesicular, 2 que participan en la estabilidad de cromosomas, 7 de remodelación de cromatina, 9 de citoesqueleto y asociadas a citoesqueleto, 8 metabólicas, 6 que participan en el proceso de endocitosis, 3 con unión a DNA, 5 que participan en el plegamiento de proteínas, 3 histonas, 2 que participan en el procesamiento del RNA, 2 de reparación del DNA, 2 de transcripción, 2 ATPasas, 2 adhesinas, 2 que participan en procesos de degradación de proteínas y 9 con otras funciones (ver apéndice).

Las proteínas hipotéticas también se clasificaron en 18 grupos de acuerdo con las regiones o dominios funcionales que presentan. La distribución de las proteínas identificadas fue: 53 proteínas que podrían participar en el proceso de segregación de cromosomas, 14 proteínas de señalización, 10 que participan en la transcripción, 6 de citoesqueleto y asociadas a citoesqueleto, 5 involucradas en el transporte nucleocitoplásmico, 5 ribosomales, 4 metabólicas, 4 de transporte a través de la membrana, 3 que podrían participar en la remodelación de la cromatina, 3 de tráfico vesicular, 2 que podrían participar en la replicación del DNA, 2 en el procesamiento del RNA, 2 ATPasas, 1 de reparación del DNA, 1 que podría participar en la degradación de proteínas, 1 proteasa, 7 proteínas con otras funciones, 2 ATPasas, 1 proteasa y 19 que no presentaron dominios funcionales similares a los reportados en otras proteínas (Figura 8.28 B) (en el apéndice se muestran las tablas de todas las proteínas clasificadas).

Figura 8.27. Proteoma nuclear en GN, porcentaje de proteínas nucleares asignadas e hipotéticas del total de proteínas identificadas por EM en un extracto nuclear. Gráfica de pastel que muestra el porcentaje de proteínas asignadas e hipotéticas.

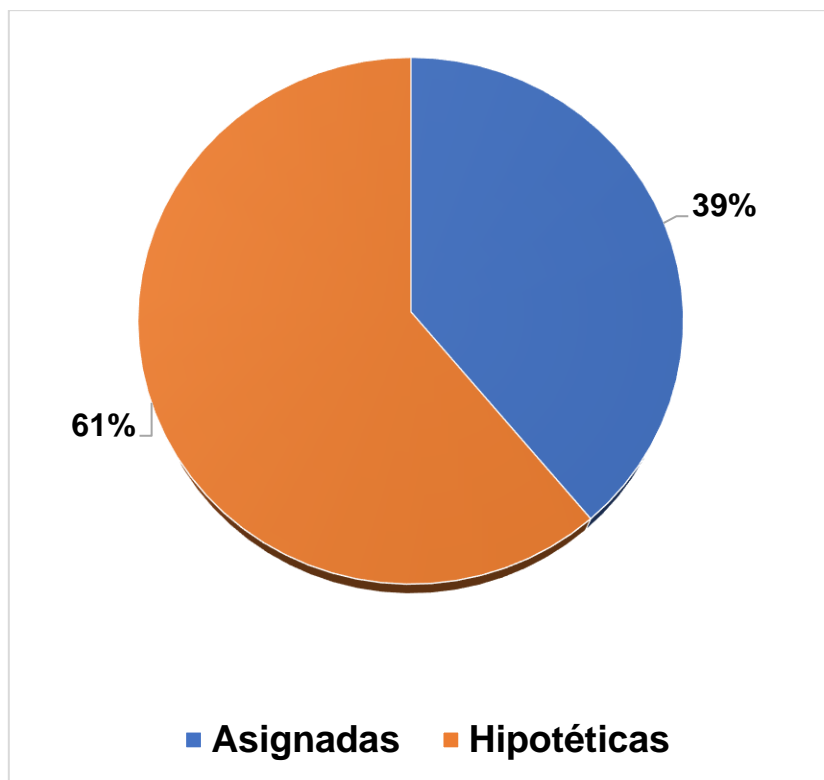
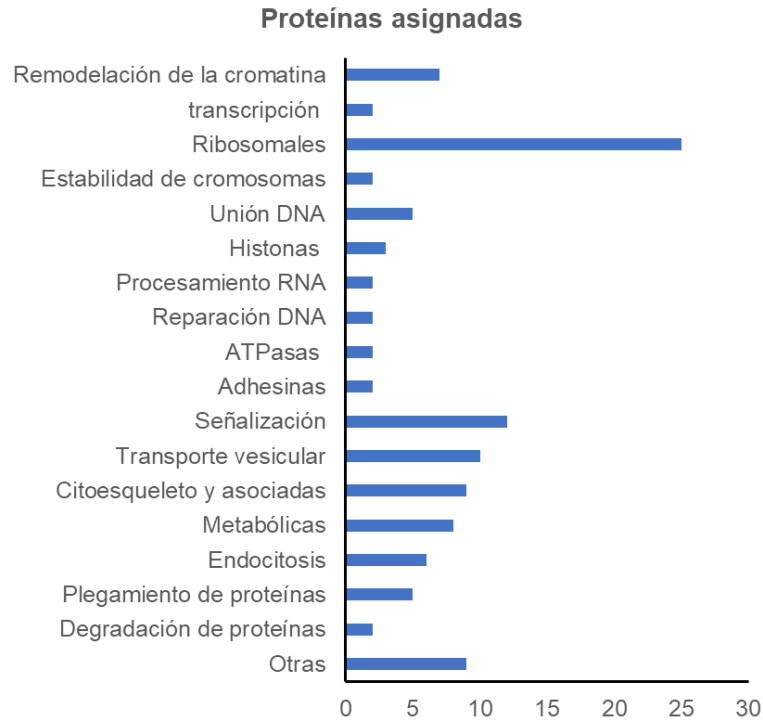
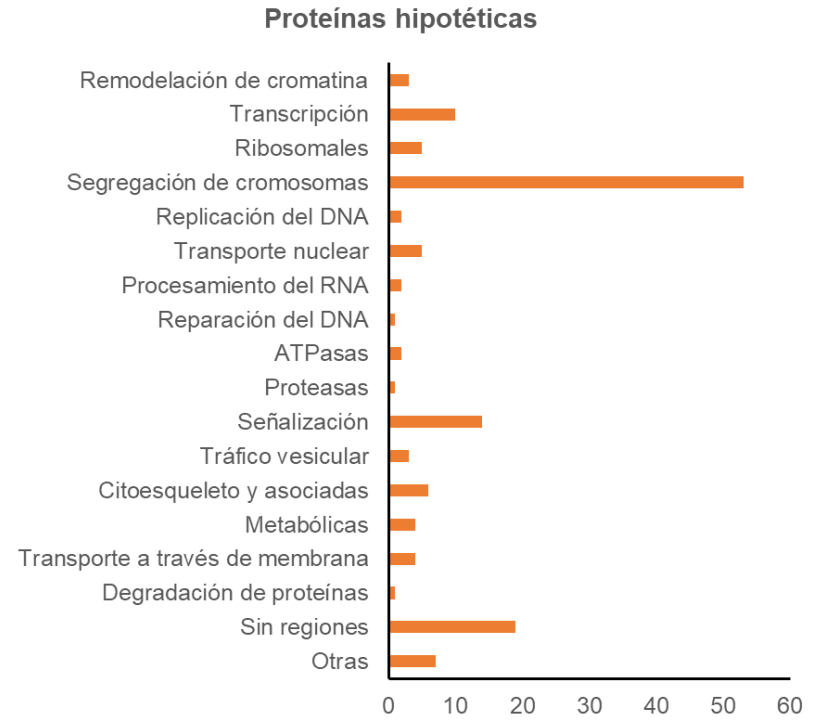


Figura 8.28. Clasificación funcional de las proteínas nucleares de parásitos cultivados en GN identificadas por EM en un extracto nuclear. A) Clasificación de las proteínas asignadas de acuerdo con su función. B) Clasificación de las proteínas hipotéticas de acuerdo con los dominios funcionales que presentan.

A)



B)



8.8. Proteoma nuclear de *T. vaginalis* cultivado en alto hierro

Debido a que en parásitos cultivados en alto hierro la cantidad de Tv-CatD nuclear fue mayor (Figura 8. 10 y 8.25), se procedió analizar al extracto nuclear mediante EM para identificar a la Tv-CatD así como otras proteínas nucleares. Mediante EM se identificaron 159 proteínas, de las cuales 109 correspondieron a proteínas asignadas, representando ~69% y 50 correspondieron a proteínas hipotéticas, representando ~31%. Pero, no se logró identificar a Tv-CatD.

Las proteínas asignadas se clasificaron en 12 grupos de acuerdo con la función de cada proteína (Figura 8.29A). La distribución de las proteínas identificadas fue la siguiente: 37 proteínas ribosomales, 17 metabólicas, 9 de citoesqueleto y asociadas a citoesqueleto, 8 que participan en el proceso de transcripción, 5 histonas y 1 *linker* de histonas, 5 adhesinas, 3 que participan en el procesamiento del RNA, 3 en el plegamiento de proteínas, 3 de transporte vesicular, 3 de señalización, 2 ATPasas y 13 con otras funciones (en el apéndice se muestran las tablas de las proteínas clasificadas).

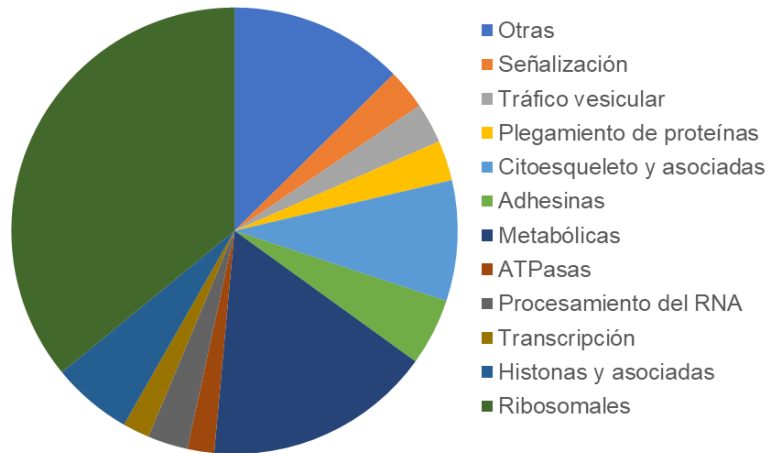
De igual forma que el proteoma nuclear de la condición de glucosa normal, las proteínas hipotéticas se clasificaron en 8 grupos de acuerdo con las regiones o dominios funcionales que presentan. La distribución de las proteínas identificadas fue: 11 proteínas que participan en el proceso de segregación de cromosomas, 6 ribosomales, 6 metabólicas, 2 que participan en el procesamiento del RNA, 2 de reparación del DNA, 2 de degradación de proteínas, 6 con otras funciones y 15 proteínas que no presentaron dominios funcionales similares a los reportados en otras proteínas (Figura 8.29B) (en el apéndice se muestran las tablas de las proteínas clasificadas).

Los proteomas nucleares de la condición de GN y AH se compararon (Figura 8.30). Ambas condiciones comparten 50 proteínas, 218 fueron exclusivas de la condición de GN y 105 de la condición de AH (Figura 8.30) (en el apéndice se muestran las listas de las proteínas).

Figura 8.29. Clasificación funcional de las proteínas nucleares de parásitos cultivados en AH identificadas por EM en un extracto nuclear. A) Clasificación de las proteínas asignadas de acuerdo con su función. B) Clasificación de las proteínas hipotéticas de acuerdo con los dominios funcionales que presentan.

A)

Proteínas asignadas



B)

Proteínas hipotéticas

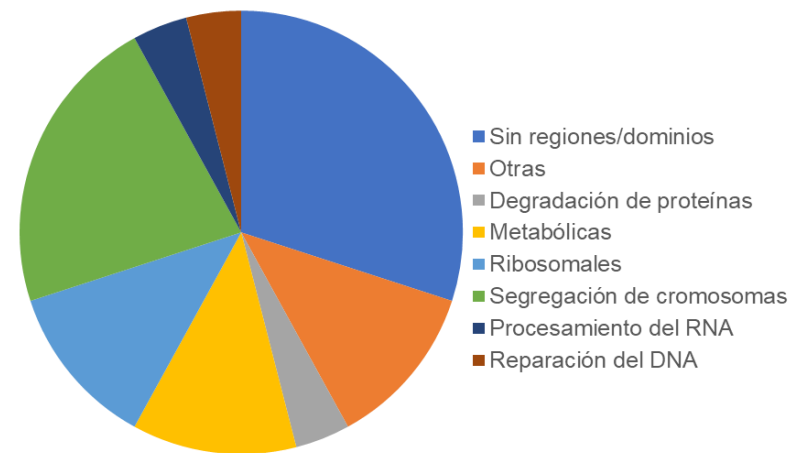
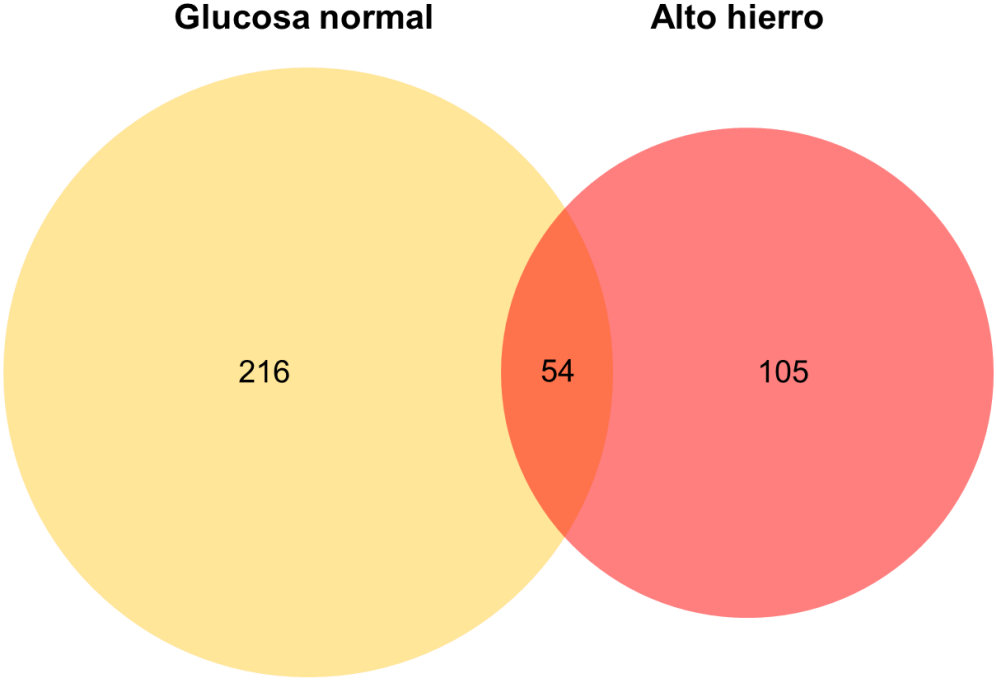


Figura 8. 30. Comparación de los proteomas nucleares de parásitos cultivados en GN y AH. La cantidad de proteínas nucleares compartidas en las dos condiciones de cultivo (GN y AH) se muestran en color café, las de GN en color amarillo y las de AH en rojo.



9.DISCUSIÓN

9.1. Análisis bioinformático

9.1.1. Análisis estructural entre Tv-CatD y SAF

Mediante el modelado *in silico* de la estructura tridimensional de Tv-CatD y SAF se pudo identificar que estas proteínas podrían estar compartiendo un dominio estructural denominado psi-barril- β conformado por dos motivos o psi-estructuras (Castillo *et al.*, 1999). Dado que este motivo estructural está presente en múltiples proteínas de eucariotes y arqueas (Coles *et al.*, 1999; Castillo *et al.*, 1999), e incluso podría estar presente en varias proteínas de *T. vaginalis* (Tv-CatD, SAF, retropepsina), se puede suponer que fue originado de un ancestro común que a través del proceso evolutivo tuvo duplicaciones para dar origen al dominio estructural psi-barril- β , así como duplicaciones del propio dominio. Esto puede explicar el hecho de que Tv-CatD presentó modificaciones en la topología del dominio psi-barril- β comparado con lo reportado, así como el hecho de presentar dos dominios similares, uno cercano al extremo N-terminal y el otro cercano al C-terminal. A su vez la duplicación estructural del dominio psi-barril- β también puede explicar las diferencias entre estos dos dominios y que uno de ellos, el localizado en el extremo N-terminal, sea más similar al dominio psi-barril- β de SAF. Este análisis fue generado a partir de estructuras hipotéticas, por lo que para asegurar la presencia y topología de los dominios psi-barril- β de Tv-CatD y SAF sería conveniente obtener las estructuras reales de las proteínas mediante cristalografía y difracción de rayos X o mediante resonancia magnética nuclear (RMN).

Con base en estos resultados del análisis *in silico*, se podría explicar la reactividad cruzada observada del anticuerpo policlonal generado contra Tv-CatDr que podría estar reconociendo a componentes estructurales del dominio psi-barril- β compartido entre Tv-CatD y SAF (Figura 8.6) permitiendo el reconocimiento de la banda de ~80 kDa entre los productos de secreción de *T. vaginalis* por ensayos de WB identificado previamente por EM como la proteína SAF (Mancilla-Olea *et al.*, 2018).

9.1.2. Análisis *in silico*

La función nuclear de Tv-CatD podría ser enzimática al degradar histonas (Khalkhali-Ellis *et al.*, 2014); o no enzimática, que pueda contribuir a la regulación génica, ya sea por interactuar con factores de transcripción (Bach *et al.*, 2015) o por unión a DNA (sin reportar).

Los diferentes servidores y bases de datos permitieron identificar dominios funcionales a partir de la secuencia de aa de Tv-CatD. El principal dominio identificado fue el característico de las APs, específicamente el de catepsina D, por lo que la función nuclear podría ser enzimática. Sin embargo, existe la posibilidad de una función no enzimática, ya que Tv-CatD podría interactuar con proteínas que poseen el dominio PP2C_SIG (Figura 8.8). El dominio PP2C_SIG se encuentra en fosfatasas que remueven grupos fosfatos de proteínas componentes de rutas de señalización en eucariotes y procariotes (Tatebe y Shiozaki, 2010; Rodriguez, 1998). Por ejemplo, *Bacillus subtilis* posee cinco fosfatasas de tipo PP2C, las cuales pueden regular a los factores transcripcionales σ (Tatebe y Shiozaki, 2010). Además, algunas PP2C tienen una SLN, putativa lo que podría sugerir una actividad nuclear (Stern *et al.*, 2007). Sin embargo, no se encontraron dominios de unión a DNA ni dominios con similitud a factores transcripcionales canónicos, por lo que la posibilidad de que Tv-CatD se una a DNA podría descartarse. Sin embargo, también podría tener secuencia atípicas no detectadas por los programas y que le ayudaran a realizar esta función.

Tv-CatD no posee una SLN o una SEN, lo cual sugiere que su transporte hacia el núcleo no es mediado por este tipo de secuencias. Sin embargo, durante la búsqueda de los dominios funcionales se encontró que una región de Tv-CatD comparte similitud con el Factor de Transporte Nuclear 2 (NTF2, *Nuclear Transport Factor 2*) (Tabla 8.1). NTF2 participa en el transporte núcleo-citoplásmico de proteínas a través del complejo del poro nuclear, se une a las GTPasas de la familia RAN y a diversas nucleoporinas (Stewart *et al.*, 1998). Esta similitud podría influir en el transporte de Tv-CatD del citoplasma hacia el núcleo. El cotransporte de Tv-CatD al núcleo es una posibilidad porque mediante el interactoma se encontró que

la AP puede interactuar con fosfatasa PP2C, las cuales podrían tener una SLN. Para confirmar estas posibles interacciones proteína-proteína es necesario realizar co-inmunoprecipitaciones con Tv-CatD utilizando el anticuerpo anti-Tv-CatD con el que ya se cuenta.

También, se encontró que Tv-CatD puede ser modificada postraduccionalmente, tiene cuatro sitios probables de SUMOilación y múltiples sitios probables de fosforilación en treoninas, serinas y tirosinas. Dos modificaciones postraduccionales que pueden intervenir en el transporte de proteínas hacia el núcleo son la SUMOilación y la fosforilación (Ptak y Wozniak, 2017). La SUMOilación regula el transporte nucleocitoplásmico de proteínas porque puede alterar la interacción de la proteína modificada con la maquinaria de transporte nuclear para favorecer o impedir su translocación hacia el núcleo (Ptak y Wozniak, 2017). La fosforilación también puede alterar el importe o el exporte de proteínas a través del complejo del poro nuclear ya que esta modificación cambia la capacidad de interacción con Factores de Transporte Nuclear (NTF), ya sea por bloquear la interacción de NTF a la SLN o a la SEN o por potenciar la unión de NTF con la SLN o la SEN (Ptak y Wozniak, 2017). Por lo tanto, estas modificaciones postraduccionales podrían influir en el transporte de Tv-CatD hacia el núcleo del parásito en ciertas condiciones ambientales como alto hierro y baja glucosa mostrado en las imágenes de inmunofluorescencia.

9.2. Localización nuclear de Tv-CatD

Los resultados previos (Mancilla-Olea *et al.*, 2018) y los encontrados en este trabajo mostraron que Tv-CatD se localiza de manera atípica en el núcleo de *T. vaginalis*, lo cual es consistente con lo reportado para otras catepsinas D con localización nuclear. Por ejemplo, Khalkhali-Ellis y col. (2014) reportaron que CatD murina (mCatD) es transportada al núcleo de células de la glándula mamaria donde tiene una función proteolítica sobre la histona H3. Además, estos autores muestran que el transporte hacia el núcleo está mediado por modificaciones postraduccionales como la nitración de Tirosina. Adicionalmente, Bach y col. (2015)

reportaron funciones no enzimáticas para la CatD que se localiza en el núcleo, actúa como un represor transcripcional y es transportada al núcleo mediante un mecanismo de cotransporte.

También, se encontró que Tv-CatD se regula positivamente por hierro a nivel de proteína y de localización nuclear. La señal de Tv-CatD observada por inmunofluorescencia indirecta está distribuida en regiones del núcleo muy puntuales que asemejan cuentas de collar, en especial en la condición de hierro normal (Figura 8.14), lo que sugiere que pudiera estar interaccionando con componentes de la cromatina del parásito. La organización del material y de Tv-CatD dentro del núcleo es muy similar a la estructura de los cromosomas de *T. vaginalis* reportado por Gómez Conde en su Tesis de Doctorado (2000) (Figura 9.1). Por lo anterior, se sugiere que Tv-CatD al localizarse en núcleo en ciertas condiciones ambientales podría interactuar con componentes de la cromatina y ejercer funciones enzimáticas o no enzimáticas y de esta manera contribuir a la regulación de la expresión génica en *T. vaginalis*.

Mediante los ensayos de inmunofluorescencia indirecta y WB se observó que la cantidad de proteína de Tv-CatD es mayor en parásitos cultivados en alto que en restricción de hierro, sugiriendo que Tv-CatD es regulada positivamente por hierro. Sin embargo, para corroborar esta regulación se necesitará en un futuro realizar ensayos de RT-PCR en tiempo real para ver si este efecto positivo del hierro se observa también a nivel de transcrito.

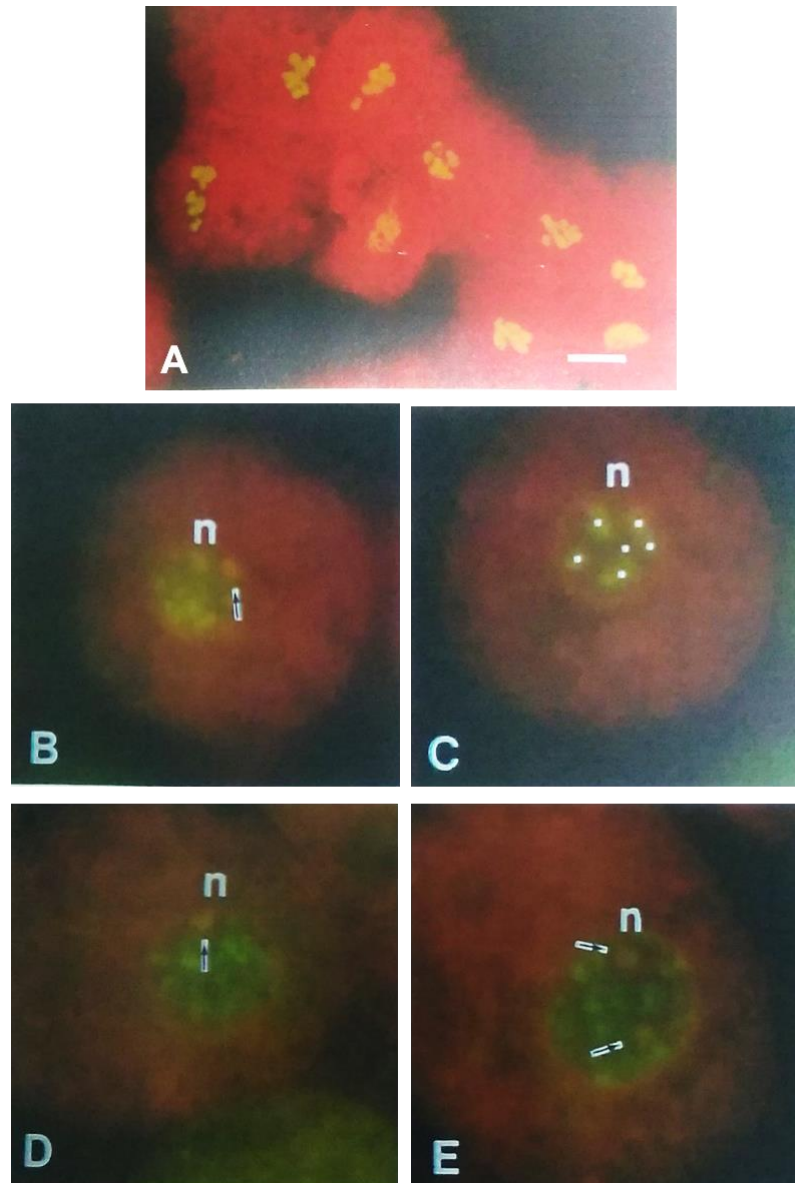


Figura 9.1. Cromosomas condensados y diferentes fases de la mitosis de *T. vaginalis*. A) Cromosomas condensados de *T. vaginalis* teñidos con naranja de acridina (NA) observados por microscopía de epifluorescencia. B-E) Tinción vital con NA de *T. vaginalis* en mitosis por microscopía de epifluorescencia. Los puntos blancos en C representan al DNA condensado en seis estructuras, las flechas del resto de las figuras indican la estructura esférica de RNA. B) Profase, C) Metafase, D) Anafase temprana, E) Anafase tardía. (Tomado de Gómez Conde Eduardo, Tesis de Doctorado, 2000).

9.3. Función nuclear de Tv-CatD

Tras confirmar la localización nuclear de Tv-CatD surgieron las siguientes interrogantes: 1) ¿Cuál es la función de Tv-CatD en el núcleo?, 2) ¿Podría tener una función proteolítica? o quizás 3) ¿tendría una función no enzimática? o 4) ¿ambas funciones, pero dependiente de las concentraciones de glucosa o de hierro? Para responder a la segunda cuestión se realizaron ensayos de actividad de Tv-CatD usando un sustrato específico. Las cinéticas enzimáticas de Tv-CatD presente en el extracto nuclear permitieron evaluar su actividad proteolítica en las cuatro condiciones de cultivo de *T. vaginalis* (RG, AG, RH y AH). En primera instancia se confirmó que Tv-CatD nuclear está activa a pH 7.0, lo que sugiere que tiene una función enzimática en el núcleo. No es de sorprenderse que una catepsina D esté activa a pH neutro. Kenessey y col. (1997) reportaron que la catepsina D procesa proteolíticamente a la proteína tau a pH 7.0, produciendo fragmentos de diferentes tamaños; aunque su capacidad proteolítica fue mayor a pH 3.5. En otro reporte, se mostró que catepsina D puede permanecer activa a un pH de 6.2, degradando a Bid (Heinrich *et al.*, 2004).

Nuestros resultados muestran que la actividad proteolítica de Tv-CatD nuclear aumentó a pH 7.0 en tres de las cuatro condiciones analizadas (RG, AG y RH). Este aumento en la actividad podría estar regulado por modificaciones postraduccionales. Una de las modificaciones postraduccionales que pueden regular la actividad enzimática de catepsina D es la nitración de tirosina (Khalkhali-Ellis y Hendrix, 2015). La nitración de catepsina D puede incrementar su actividad (Zaragozá *et al.*, 2009). Sin embargo, se desconoce si Tv-CatD puede ser nitrada en tirosinas. Por lo que sería conveniente realizar análisis bioinformáticos, así como ensayos de WB, de nitración y de actividad proteolítica que permitan mostrar si Tv-CatD puede sufrir esta modificación y en qué medida puede afectar su actividad enzimática.

La condición de cultivo de *T. vaginalis* que presentó menor actividad proteolítica de Tv-CatD nuclear fue la de alto hierro, a pesar de que en esta condición la cantidad de proteína fue mayor, en comparación con la condición de

bajo hierro. Esta relación inversa de cantidad de proteína respecto a la actividad proteolítica sugiere que la proteasa, además de la función enzimática en el núcleo en bajas concentraciones de hierro, podría presentar una función no enzimática en alto hierro, al interactuar con algunos factores de transcripción y de este modo participar en la regulación génica del parásito. Para esto se necesitará realizar ensayos de co-inmunoprecipitaciones y WB de Tv-CatD con diferentes anticuerpos para identificar por EM a algunas de las proteínas que interactúan con esta AP.

9.4. TC-2 como posibles sustrato de Tv-CatD

El ensayo realizado para identificar a uno de posibles sustratos de Tv-CatD nuclear fue inespecífico debido a que la condición control, con cobre como inhibidor de Tv-CatD, se observó degradación no solo de TC-2r sino también de las proteínas del extracto nuclear, a pesar de que el extracto fue tratado con los inhibidores de cisteína y serina proteasas, leupeptina y TLCK. Estos resultados sugieren que en los extractos nucleares estuvieron presentes proteasas que no fueron inhibidas por leupeptina ni por TLCK y que se activaron en presencia de cobre, posiblemente del tipo de las metaloproteasas. Una posibilidad, es que el cobre haya activado a metaloproteasas nucleares tomando en cuenta que, en el extracto nuclear de la condición de glucosa normal, se identificó por EM a una zinc proteasa. Ya que el cobre puede modular la actividad de las zinc metaloproteasas, aumentando o inhibiendo su actividad (Fukasawa *et al.*, 2011).

En la condición control de extracto en ausencia de cobre (Figura 8.24, carril 3) se observó una disminución en la cantidad de TC-2r. Sin embargo, la degradación de TC-2r no pudo deberse a Tv-CatD dado, que el ensayo no resultó específico para esta proteasa. Una opción para mejorar este ensayo podría ser la de purificar a la Tv-CatD nativa, e incubarla con TC-2r en presencia o ausencia de cobre. Otra alternativa podría ser activar a la Tv-CatD recombinante e incubarla directamente con TC-2r y seguir la posible degradación de TC-2r por SDS-PAGE y WB. Estas estrategias servirán para identificar a algunos de los sustratos naturales de Tv-CatD en citoplasma y en núcleo.

9.5. Proteoma del extracto nuclear

En el WB 2-DE el anticuerpo anti-Tv-CatD reconoció tres manchas, proteínas que se cortaron del gel y se enviaron a identificar por EM. Sin embargo no se encontraron péptidos de la Tv-CatD. Lo anterior se pudo deber a que la Tv-CatD se encuentra en baja proporción con respecto al total de proteínas nucleares, a que se cortaron las manchas incorrectas, a que hubo un reconocimiento cruzado del anticuerpo primario con otras proteínas o inclusive, a problemas durante el procesamiento de la muestra para EM, por no ser la cantidad adecuada de proteína para la sensibilidad del equipo utilizado.

Para descartar la posibilidad que no se hubieran cortado las manchas adecuadas, se enviaron a identificar las proteínas presentes en el extracto nuclear de parásitos cultivados en glucosa normal. Sin embargo, tampoco se identificaron péptidos que correspondieran a Tv-CatD. Para aumentar la probabilidad de identificar a la Tv-CatD en un extracto nuclear se cultivaron parásitos en alto hierro, debido a que fue la condición en la que la localización nuclear de la Tv-CatD fue más evidente, y las proteínas de EN se enviaron a identificar por EM. Sin embargo, tampoco se logró la identificación de la Tv-CatD. Esto pudo también deberse a las mismas razones antes mencionadas. Por lo que se necesitarán emplear técnicas de enriquecimiento de la Tv-CatD como inmunoprecipitación o cromatografía de afinidad con el anticuerpo anti-Tv-CatD, para lograr su identificación por EM.

Del extracto nuclear se identificaron a proteínas características del núcleo, en las dos condiciones de cultivo utilizadas (GN y AH), aunque también a algunas citoplásmicas que podrían ser contaminantes. Sin embargo, varias de las proteínas citoplásmicas identificadas ya han sido reportadas como proteínas multifuncionales con múltiples localizaciones, incluyendo el núcleo (algunas se proponen como *moonlighting proteins* también presentes en *T. vaginalis*) como: a) Enolasa que puede actuar como una proteína de unión a DNA y regular la transcripción. Incluso en parásitos como *Toxoplasma gondii* se ha observado la localización nuclear de la enolasa (Ferguson *et al.*, 2002; Coppens *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2005). También, en *Entamoeba histolytica* la enolasa tiene una localización nuclear y actúa como un

inhibidor de Dnmt2 (Tovy *et al.*, 2010). b) Tubulina, la cual se puede asociar a la histona H3 afectando la formación del complejo HPI (proteína de heterocromatina 1)-histona-LBR (receptor de lámina B) y así regular las interacciones de la envoltura nuclear con la cromatina durante el ciclo celular (Akoumianaki *et al.*, 2009); y c) 14-3-3, la cual participa en el transporte nucleocitoplásmico (Brunet *et al.*, 2002) y en plantas puede funcionar como un regulador transcripcional puesto que se une a factores de transcripción (Bihn, 1997).

De entre las proteínas citoplásmicas identificadas en el EN de parásitos cultivados en AH, diversas proteínas también presentan localización y funciones nucleares como lo es a) enolasa; b) tubulina (previamente descritas); c) gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Ventura *et al.*, 2010; Brown *et al.*, 2003), la cual participan el transporte del tRNA, en replicación y reparación del DNA (Sirover *et al.*, 1997; Sirover *et al.*, 1999) y en transcripción (Zheng *et al.*, 2003); d) fructosa 1,6-bifosfato aldolasa (Mamczur and Dzugaj, 2008), involucrada en la regulación de la proliferación celular (Mamczur *et al.*, 2013) y de la estabilidad del RNA mensajero (Cañete-Soler *et al.*, 2005) e interacciona con DNA (Ronai *et al.*, 1992); e) ciclofilina, que podría modular el splicing del pre-mRNA (Adams *et al.*, 2015) y f) HSP70 (Song *et al.*, 2015) que regula la eritropoyesis (Ribeil *et al.*, 2007).

Adicionalmente, en el proteoma nuclear de parásitos cultivados en AH se identificó a la histona H3 mientras que en GN no se identificó. Dado que se ha reportado que la histona H3 puede ser un blanco proteolítico de la catepsina D (Khalkhali-Ellis *et al.*, 2014) y que en AH la Tv-CatD nuclear presentó menor actividad proteolítica (Figura 8.24) surge la interrogante de que si la histona H3 pueda ser procesada por Tv-CatD y de esta forma contribuir a la regulación génica en *T. vaginalis*.

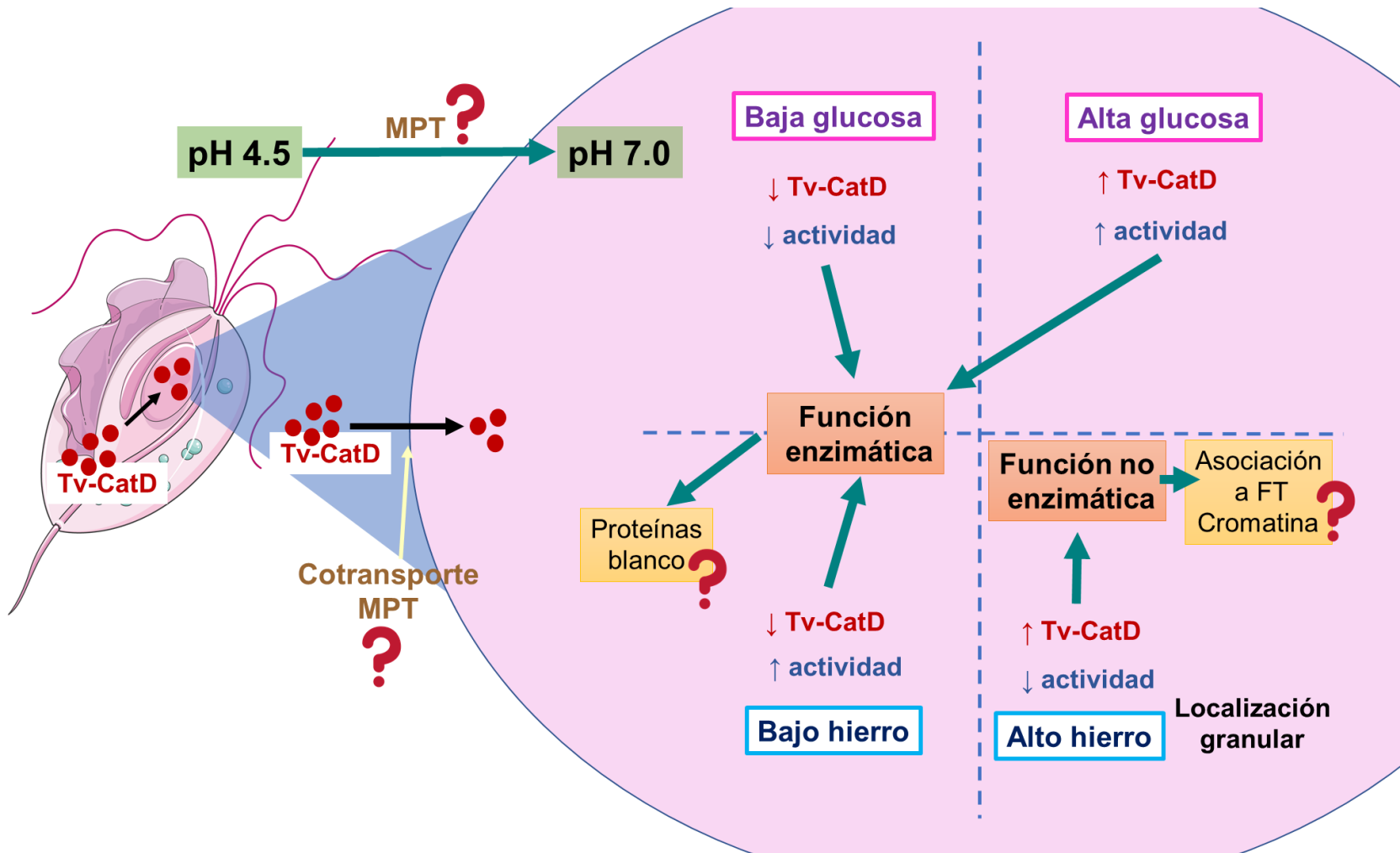
10. RESUMEN DE RESULTADOS

- 1) Tv-CatD y SAF comparten un dominio estructural psi-barril- β conservado, formado por los motivos $\beta\beta\alpha\beta$ (o similares) en la región N-terminal, lo que podría explicar el reconocimiento de la banda de ~80 kDa por el anticuerpo policlonal generado contra Tv-CatDr por WB.
- 2) Tv-CatD no posee una secuencia de localización nuclear (SLN) o una secuencia de exporte nuclear (SEN), por lo que se sugiere que podría ser transportada hacia el núcleo mediante un mecanismo de cotransporte lo cual podría regularse por modificaciones postraduccionales (MPT).
- 3) Las condiciones de cultivo tienen un papel importante en la regulación de la cantidad, localización y actividad proteolítica de Tv-CatD, ya que es regulada positivamente tanto por glucosa como por hierro.
- 4) Los análisis bioinformáticos sugirieron que esta AP podría tener una función enzimática dentro del núcleo de *T. vaginalis*, lo cual se confirmó mediante los ensayos de actividad proteolítica de Tv-CatD en extractos nucleares, demostrando que está activa a pH 7.0 (similar al pH nuclear). Aunque no se descarta la posibilidad de que también pueda tener una función no enzimática, porque en la condición de alto hierro la actividad proteolítica disminuyó a pH 7.0, a pesar de que es la condición en la que se observó mayor cantidad de proteína Tv-CatD en el núcleo (Figura 10.1).
- 5) La localización y la actividad proteolítica de Tv-CatD son dependientes de las condiciones de cultivo dado que en la condición de alto hierro se observó

mayor cantidad de proteína en el núcleo, pero la actividad proteolítica de la Tv-CatD fue mayor en parásitos cultivados en la condición de bajo que de alto hierro (Figura 10.1).

- 6) La actividad proteolítica de Tv-CatD nuclear aumenta a pH 7.0, quizás este comportamiento esté regulado por modificaciones postraduccionales, pero es solo una hipótesis que se podrá probar posteriormente.

Figura 10.1 Modelo propuesto de la/s función/es nuclear/es de Tv-CatD. Las funciones nucleares de Tv-CatD podrían estar regulada por las condiciones ambientales: podría haber una función enzimática inducida por glucosa o por la carencia de hierro y una función no enzimática inducida por hierro. Los blancos naturales de Tv-CatD aún se desconocen, así como las moléculas con las cuales podría interaccionar y el mecanismo y regulación de la translocación nuclear.



11. CONCLUSIÓN

La aspártico proteasa tipo catepsina D (Tv-CatD) se localiza en el núcleo de *T. vaginalis* de manera dependiente de las condiciones ambientales y tiene actividad enzimática nuclear, aunque no se descarta una función no enzimática.

12. PERSPECTIVAS

Con base a los resultados obtenidos, se propone lo siguiente:

- Estudiar la función no enzimática de Tv-CatD nuclear e identificar a las proteínas que interactúan con Tv-CatD nuclear mediante ensayos de inmunoprecipitación y/o pull-down y espectrometría de masas.
- Determinar si Tv-CatD interacciona con DNA e identificar las regiones regulatorias a las cuales se une.
- Identificar a los sustratos naturales de Tv-CatD nuclear en *T. vaginalis*.
- Identificar las modificaciones postraduccionales de Tv-CatD nuclear.
- Determinar el mecanismo de translocación nuclear de Tv-CatD.
- Analizar la expresión de los genes de Tv-CatD y SAF en las diferentes condiciones de hierro y glucosa (para el caso de SAF).
- Confirmar la localización de Tv-CatD en la membrana del parásito en diferentes condiciones de hierro.
- Estudiar la participación de Tv-CatD en la hemólisis, e identificarlo como otro factor de virulencia de *T. vaginalis*.

REFERENCIAS

- Abdolrasouli A., Croucher A., Roushan A. and Gaydos C. A. 2013. Bilateral conjunctivitis due to *Trichomonas vaginalis* without genital infection: An unusual presentation in an adult man. *Journal of Clinical Microbiology*. 51(9):3157–3159.
- Adams B. M., Coates M. N., Jackson S. R., Jurica M. S. and Davis T. L. 2015. Nuclear cyclophilins affect spliceosome assembly and function *in vitro*. *Biochemical Journal*. 469(2):223-233.
- Akoumianaki T., Kardassis D., Polioudaki H., Georgatos S. D. and Theodoropoulos P.A. 2008. Nucleocytoplasmic shuttling of soluble tubulin in mammalian cells. *Journal of Cell Science*. 122(8):1111–1118.
- Arroyo R., González-Robles A., Martínez-Palomo A. and Alderete J. F. 1993. Signalling of *Trichomonas vaginalis* for amoeboid transformation and adhesin synthesis follows cytoadherence. *Molecular Microbiology*. 7(2):299-309.
- Bach A-S., Derocq D., Laurent-Matha V., Montcourrier P., Sebti S., Orsetti B., Theillet C., Gongora C., Patingre S., Ibing E., Roger P., Linares L. K., reinheckel T., Meurice G., Kaiser F. J., Gespach C. and Liaudet-Coopman E. 2015. Nuclear cathepsin D enhances TRPS1 transcriptional repressor function to regulate cell cycle progression and transformation in human breast cancer cells. *Oncotarget*. 6(29):28084–28103.
- Bachmann L. H., Hobbs M. M., Seña A.C., Sobel J. D., Schwebke J. R., Krieger J.N., McClelland R. S. and Workowski K. A. 2011. *Trichomonas vaginalis* genital infections: progress and challenges. *Clinical Infectious Diseases*. 53(S3):160–172.
- Baechle D., Flad T., Cansier A., Steffen H., Schitteck B., Tolson J., Herrmann T., Dihazi H., Beck A., Mueller G. A., Mueller M., Stevanovic S., Garbe C., Mueller C. A. and Kalbacher H. 2006. Cathepsin D is present in human eccrine sweat and involved in the postsecretory processing of the antimicrobial peptide DCD-1L. *Journal of Biological Chemistry*. 281(9):5406–5415.

- Barrett A. J. 1994. Classification of peptidases. *Methods in Enzymology*. 244:1–15.
- Barrett A. J., Tolle D. P. and Rawlings N. D. 2003. Managing peptidases in the genomic era. *Biological Chemistry*. 384:873–882.
- Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF. Cathepsin D. In: *Handbook of Proteolytic Enzymes*. UK; 2013. p. 54–63
- Benes P., Vetvicka V. and Fusek M. 2008. Cathepsin D-Many functions of one aspartic protease. *Critical Reviews in Oncology Hematology*. 68(1):12–28.
- Bihn E. A., Paul A-L., Wang S. W., Erdos G. W. and Feri R. J. 1997. Localization of 14-3-3 proteins in the nuclei of arabidopsis and maize. *Plant Journal*. 12(6):1439-1445.
- Bjelic S. and Åqvist J. 2006. Catalysis and linear free energy relationships in aspartic proteases. *Biochemistry*. 45(25):7709–7723.
- Brown V. M., Krynetski E. Y., Krynetskaia N. F., Grieger D., Mukatira S. T., Murti K. G., Slaughter C. A., Park H-W. and Evans W. E. 2003. A novel CRM1-mediated nuclear export signal governs nuclear accumulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase following genotoxic stress. *The Journal of Biological Chemistry*. 279(7):5984-5992.
- Brunet A., Kanai F., Stehn J., Xu J., Sarbassova D., Frangioni J. V., Dalal S. N. DeCaprio J. A., Greenberg M. E. and Yaffe M. B. 2002. 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *Journal of Cell Biology*. 156(5):817–828.
- Cañete-Soler R., Reddy K. S., Tolan D. R. and Zhai J. 2005. Aldolases A and C are ribonucleolytic components of a neuronal complex that regulates the stability of the light-neurofilament mRNA. *The Journal of Neuroscience*. 25(17):4353-4364.
- Carlton J. M., Hirt R. P., Silva J. C., Delcher A. L., Schatz M., Zhao Q., Wortman J. R., Bidwell S. L., Alsmark U. C. M., Besteiro S., Sicheritz-Ponten T., Noel C. J., Dacks J. B., Foster P. G., Simillion C., Van de Peer Y., Miranda-Saavedra D., Barton G. J., Westrop G. D., Müller S., Dessi D., Fiori P. L., Ren

- Q., Paulsen I., Zhang H., Bastida-Corcuera F. D., Simoes-Barbosa A., Brown M. T., Hayes R. D., Mukherjee M., Okumura C. Y., Schneider R., Smith A. J., Vanacova S., Villalvazo M., Haas B. J., Perteua M., Feldblyum T. V., Utterback T. R., Shu C-L., Osoegawa K., de Jong P. J., Hrdy I., Horvathova L., Zubacova Z., Dolezal P., Malik S-B., Logsdon Jr. J. M., Henze K., Gupta A., Wang C. C., Dunne R. L., Upcroft J. A., Upcroft P., White O., Salzberg S. L., Tang P., Chiu C-H., Lee Y-S., Embley T. M., Coombs G. H., Mottram J. C., Tachezy J., Fraser-Liggett C .M. and Johnson P. J . 2007. Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science*. 315(5809):207–212.
- Carter J. E. and Whithaus K.C. 2008. Neonatal respiratory tract involvement by *Trichomonas vaginalis*: a case report and review of the literature. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 78(1):17–19.
 - Carvajal-Gamez B. I., Quintas-Granados L. I., Arroyo R., Vázquez-Carrillo L. I., Ramón-Luing L. A., Carrillo-Tapia E. and Alvarez-Sánchez M. E. 2014. Putrescine-dependent re-localization of TvCP39, a cysteine proteinase involved in *Trichomonas vaginalis* cytotoxicity. *PLoS ONE*. 9(9):1-10.
 - Castillo R. M., Mizuguchi K., Dhanaraj V., Albert A., Blundell T. L. and Murzin A.G. 1999. A six-stranded double-psi β barrel is shared by several protein superfamilies. *Structure*. 7:227–236.
 - Cataldo A. M., Barnett J. L., Berman S. A., Li J., Quarless S., Bursztajn S., Lippa C. and Nixon R. A. 1995. Gene expression and cellular content of cathepsin D in Alzheimer's disease brain: Evidence for early up-regulation of the endosomal-lysosomal system. *Neuron*. 14:671–680.
 - Cho J. H., Park I. Y., Kim H. S., Lee W. T., Kim M. S. and Kim S. C. 2002. Cathepsin D produces antimicrobial peptide parasin I from histone H2A in the skin mucosa of fish. *The FASEB Journal*. 16(3):429-431.
 - Coles M., Diercks T., Liermann J., Gröger A., Rockel B., Baumeister W., Koretke K. K., Lupas A., Peters J. and Kessler H. 1999. The solution structure of VAT-N reveals a 'missing link' in the evolution of complex enzymes from a simple $\beta\alpha\beta$ element. *Current Biology*. 9(20):1158–1168.

- Conus S., Pop C., Snipas S. J., Salvesen G. S. and Simon H.U. 2012. Cathepsin D primes caspase-8 activation by multiple intra-chain proteolysis. *Journal of Biological Chemistry*. 287(25):21142–21151.
- Coombs G. H., Goldberg D. E., Klemba M., Berry C., Kay J. and Mottram J. C. 2001. Aspartic proteases of *Plasmodium falciparum* and other parasitic protozoa as drug targets. *Trends in Parasitology*. 17(11):532-537.
- Coppens I., Asai T. and Tomavo S. 2014. Biochemistry and metabolism of *Toxoplasma gondii*: Carbohydrates, lipids and nucleotides, in *Toxoplasma Gondii: The model apicomplexan - perspectives and methods*. Second Edition. 257-295.
- Dias-Lopes G., Saboia-Vahia L., Margotti E. T., Fernandes N. de S., Castro C. L. de F., Oliveira-Junior F. O., Peixoto J. F., Britto C., e Silva-Filho F. C., Cuervo P. and Batista de Jesus J. 2017. Morphologic study of the effect of iron on pseudocyst formation in *Trichomonas vaginalis* and its interaction with human epithelial cells. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 112(10):664–673.
- Duboucher C., Noël C., Durand-Joly I., Gerbod D., Delgado-Viscogliosi P., Jouveshomme S., Lecrec C., Cartolano G. L., Dei-Cas E., Capron M. and Viscogliosi E. 2003. Pulmonary coinfection by *Trichomonas vaginalis* and *Pneumocystis sp.* as a novel manifestation of AIDS. *Human Pathology*. 34(5):508–511.
- Dunn B. M. 2002. Structure and mechanism of the pepsin-like family of aspartic peptidases. *Chemical Reviews*. 102(12):4431–4458.
- Ferguson D. J. P., Parmley S. F. and Tomavo S. 2002. Evidence for nuclear localisation of two stage-specific isoenzymes of enolase in *Toxoplasma gondii* correlates with active parasite replication. *International Journal for Parasitology*. 32(11):1399–1410.
- Figueroa-Angulo E. E., Rendón-Gandarilla F. J., Puente-Rivera J., Calla-Choque J. S., Cárdenas-Guerra R. E., Ortega-López J., Quintas-Granados L. I., Alvarez-Sánchez M. E. and Arroyo R. 2012. The effects of environmental

factors on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. *Microbes and Infection*. 14(15):1411–1427.

- Fortenberry S. C., Schorey J. S. and Chirgwin J. M. 1995. Role of glycosylation in the expression of human procathepsin D. *Journal of Cell Science*. 108:2001–2006.
- Fukasawa K. M., Hata T., Ono Y. and Hirose J. 2011. Metal preferences of zinc-binding motif on metalloproteases. *Journal of Amino Acids*. 2011:1–7.
- Gómez-Conde E. 2000. Estudio de la mitosis de *Trichomonas vaginalis*. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.
- Gómez-Conde E., Mena-López R., Hernández-Jaúregui P., González-Camacho M. and Arroyo R. 2000. *Trichomonas vaginalis*: Chromatin and mitotic spindle during mitosis. *Experimental Parasitology*. 96:130-138.
- Gram I. T., Macaluso M., Churchill J. and Stalsberg H. 1992. *Trichomonas vaginalis* (TV) and human papillomavirus (HPV) infection and the incidence of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) grade III. *Cancer Causes and Control*. 3(3):231–236.
- Hasilik A. and Neufeldg E. F. 1980. Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts synthesis as precursors of higher molecular weight. *Journal of Biological Chemistry*. 255(10):4937–4945.
- Hasui K., Wang J., Jia X., Tanaka M., Nagai T., Matsuyama T. and Eizuru Y. 2011. Enhanced autophagy and reduced expression of cathepsin D are related to autophagic cell death in Epstein-Barr virus-associated nasal natural killer/T-cell lymphomas: An immunohistochemical analysis of beclin-1, LC3, mitochondria (AE-1), and cathepsin D in nasopharyngeal lymphomas. *Acta Histochemica et Cytochemica*. 44(3):119–131.
- Heinrich M., Neumeyer J., Jakob M., Hallas C., Tchikov V., Winoto-Morbach S., Wickel M., Schneider-Brachert W., Trauzold A., Hethke A. and Schütze S. 2004. Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation. *Cell Death and Differentiation*. 11(5):550–563.

- Hernández H. M., Marcet R. and Sarracent J. 2014. Biological roles of cysteine proteinases in the pathogenesis of *Trichomonas vaginalis*. *Parasite*. 21(54):1–10.
- Hirt R.P. and Sherrard J. 2015. *Trichomonas vaginalis* origins, molecular pathobiology and clinical considerations. *Current Opinion Infectious Diseases*. 28(1):72–79.
- Kay J., Meijer H. J. G., Have A. and van Kan J. A. L. 2011. The aspartic proteinase family of three *Phytophthora* species. *BMC Genomics*. 12(1):254-269.
- Kenessey A., Nacharaju P., Ko L. and Yen S-H. 1997. Degradation of tau by lysosomal enzyme cathepsin D: implication for alzheimer neurofibrillary degeneration. *Journal of Neurochemistry*. 69(5):2026–2038.
- Khalkhali-Ellis Z. and Hendrix M. J. C. 2015. Two faces of cathepsin D: Physiological guardian angel and pathological demon. *Biology and Medicine*. 6(2):1–17.
- Khalkhali-Ellis Z., Goossens W., Margaryan N. V. and Hendrix M. J. C. 2014. Cleavage of histone 3 by cathepsin D in the involuting mammary gland. *PLoS One*. 9(7):1–9.
- Kharsany A. B. M., Hoosen A. A., Moodley J., Bagaratee J. and Gouws E. 1993. The association between sexually transmitted pathogens and cervical intra-epithelial neoplasia in a developing community. *Genitourin Med*. 69:357–360.
- Kissinger P. 2015. *Trichomonas vaginalis*: a review of epidemiologic, clinical and treatment issues. *BMC Infectious Diseases*. 15(1):307-315.
- Kusdian G. and Gould S. B. 2014. The biology of *Trichomonas vaginalis* in the light of urogenital tract infection. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 198(2014):92-99.
- Leitsch D. 2016. Recent advances in the *Trichomonas vaginalis* field [versión 1; referees: 2 approved]. *F1000 Research*. 5(162):1–7.

- Leto G., Tumminello F. M., Crescimanno M., Flandina C. and Gebbia N. 2004. Cathepsin D expression levels in nongynecological solid tumors: Clinical and therapeutic implications. *Clinical and Experimental Metastasis*. 21(2):91–106.
- López-Otín C. and Bond J. S. 2008. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *Journal of Biological Chemistry*. 283(45): 30433–30437.
- Mamczur P. and Dzugaj A. 2008. Aldolase A is present in smooth muscle cell nuclei. *Acta Biochimica Polonica*. 55(4):799-805.
- Mamczur P., Gamian A., Kolodziej J., Dziegiel P. and Rakus D. 2013. Nuclear localization of aldolase A correlates with cell proliferation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1833:2812-2822.
- Mancilla-Olea M. I. 2018. Caracterización molecular de la Aspártico Proteasa de tipo catepsina D en *Trichomonas vaginalis* (Tv-CatD). Tesis de Doctorado. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.
- Mancilla-Olea M. I., Ortega-López J., Figueroa-Angulo E. E., Avila-González L., Cárdenas-Guerra R. E., Miranda-Ozuna J. F. T., González-Robles A., Hernández-García M. S., Sánchez-Ayala L. and 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*. 97:1-15.
- McClelland R. S., Sangaré L., Hassan W. M., Lavreys L., Mandaliya K., Kiarie J., Ndinya-Achola J., Jaoko W. and Baeten J. M. 2007. Infection with *Trichomonas vaginalis* increases the risk of HIV-1 acquisition. *Journal of Infectious Diseases*. 195(5):698–702.
- Menezes C.B, Piccoli Frasson A. and Tasca T. 2016. Trichomoniasis – are we giving the deserved attention to the most common non-viral sexually transmitted disease worldwide? *Microbial Cell*. 3(9):404–418.
- Pereira-Neves A., Ribeiro K. C., and Benchimol M. 2003. Pseudocysts in trichomonads - new insights. *Protist*. 154:313–329.
- Petrin D., Delgaty K., Bhatt R. and Garber G. 1998. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Reviews*. 11(2):300–317.

- Pollet A., Sansen S., Raedschelders G., Gebruers K., Rabijns A., Delcour J. A. and Courtin C. M. 2009. Identification of structural determinants for inhibition strength and specificity of wheat xylanase inhibitors TAXI-IA and TAXI-IIA. *FEBS Journal*. 276(2009):3926-3927.
- Pranjol M. Z. I., Gutowski N., Hannemann M. and Whatmore J. 2015. The potential role of the proteases cathepsin D and cathepsin L in the progression and metastasis of epithelial ovarian cancer. *Biomolecules*. 5(4):3260–3279.
- Ptak C. and Wozniak R.W. 2017. SUMO and Nucleocytoplasmic Transport. In: Wilson V. (eds) *SUMO Regulation of Cellular Processes. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 963. Springer, Cham
- Puente-Rivera J., Ramón-Luing L. A., Figueroa-Angulo E. E., Ortega-López J. and Arroyo R. 2014. Trichocystatin-2 (TC-2): An endogenous inhibitor of cysteine proteinases in *Trichomonas vaginalis* is associated with TvCP39. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 54:255-265.
- Radisky E. S. 2010. Cathepsin D: Regulation in mammary gland remodeling, misregulation in breast cancer. *Cancer Biology and Therapy*. 10(5):467–470.
- Rao M. B., Tanksale A. M., Ghatge M. S. and Deshpande V. V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62(3):597–635.
- Ribeil J-A., Zermati Y., Vandekerckhove J., Cathelin S., Kersual J., Dussiot M., Coulon S., Moura I. C., Zeuner A., Kirkegaard-Sørensen T., Varet B., Solary E., Garrido C. and Hermine O. 2007. HSP70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated Cleavage of GATA-1. *Nature*. 445:102-105.
- Rodriguez P. L. 1998. Protein phosphatase 2C (PP2C) function in higher plants. *Plant Molecular Biology*. 38(6):919–927.
- Ronai Z., Robinson R., Rutberg S., Lazarus P. and Sardana M. 1992. Aldolase-DNA interactions in a SEWA cell system. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1130:20-28.
- Sansen S., De Ranter C. J., Gebruers K., Brijs K., Courtin C. M., Delcour J. A. and Babijns A. 2004. Structural basis for inhibition of *Aspergillus niger*

xylanase by *Triticum aestivum* xylanase inhibitor-I. *Journal of Biological Chemistry*. 279(34):36022–36028.

- Santos L. O., Garcia-Gomes A. S., Catanho M., Sodr e C. L., Santos A. L. S., Branquinha M. H. and d' Avila-Levy C. M. 2013. Aspartic peptidases of human pathogenic trypanosomatids: perspectives and trends for chemotherapy. *Current Medicinal Chemistry*. 20(25):3116–3133.
- Sim oes I. and Faro C. 2004. Structure and function of plant aspartic proteinases. *European Journal of Biochemistry*. 271(2004):2067–2075.
- Sirover M. A. 1997. Role of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in normal cell function and in cell pathology. *Journal of Cell Biochemistry*. 66:133-140.
- Sirover M. A. 1999. New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1432:159-184.
- Sojka D., Hartmann D., Bartořova-Sojkova P. and Dvořak J. 2016. Parasite cathepsin D-like peptidases and their relevance as therapeutic targets. *Trends in Parasitology*. 32(9):708–723.
- Song J., Hong H., Ko J., Park E-J., Park S. M., Son S-Y. and Lee S. J. 2015. Structure and nuclear transport mechanism of HSP70 nuclear transporter, Hikeshi. *Biodesign*. 3(3):117-122.
- Steggerda S. M., Black B. E. and Paschal B. M. 2000. Monoclonal antibodies to NTF2 inhibit nuclear protein import by preventing nuclear translocation of the GTPase Ran. *Molecular Biology of the Cell*. 11(2):703–719.
- Stern A., Privman E., Rasis M., Lavi S. and Pupko T. 2007. Evolution of the metazoan protein phosphatase 2C superfamily. *Journal of Molecular Evolution*. 64(1):61–70.
- Stewart M., Kent H. M. and McCoy A. J. 1998. Structural basis for molecular recognition between nuclear transport factor 2 (NTF2) and the GDP-bound form of the Ras-family GTPase Ran. *Journal of Molecular Biology*. 277(3):635–646.

- Tang J. and Wong R. N. S. 1987. Evolution in the structure and function of aspartic proteases. *Journal of Cellular Biochemistry*. 33:53-63.
- Tatebe H. and Shiozaki K. 2010. Protein serine/threonine-phosphatase 2C (PP2C). *Handbook of Cell Signaling*. Second Edition. Vol. 2. Elsevier Inc. 711-716.
- Temesvári P., Kerekes A., Tege A. and Szarka K. 2002. Demonstration of *Trichomonas vaginalis* in tracheal aspirates in infants with early respiratory failure. *Journal of Maternal-fetal and Neonatal Medicine*. 11(5):347–349.
- Tovy A., Tov R. S., Gaentzsch R., Helm M. and Ankri S. 2010. A new nuclear function of the *Entamoeba histolytica* glycolytic enzyme enolase: The metabolic regulation of cytosine-5 methyltransferase 2 (Dnmt2) activity. *PLoS Pathogens*. 6(2):1-13.
- Van Der Pol B., Kwok C., Pierre-Louis B., Rinaldi A., Salata R. A., Chen P-L., van de Wijgert J., Mmiro F., Mugerwa R., Chipato T. and Morrison C. S. 2008. *Trichomonas vaginalis* infection and human immunodeficiency virus acquisition in african women. *Journal of Infectious Diseases*. 197:548–54.
- Ventura M., Mateo F., Serratosa J., Salaet I., Carujo S., Bachs O. and Pujol M. J. 2010. Nuclear translocation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is regulated by acetylation. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 42:1672-1680.
- Wang W., Wang L., Endoh A., Hummelke G., Hawks C. L. and Hornsby P. J. 2005. Identification of α -enolase as a nuclear DNA-binding protein in the zona fasciculata but not the zona reticularis of the human adrenal cortex. *Journal of Endocrinology*. 184(1):85–94.
- WHO. 2012. Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections - 2008. Geneva, Switzerland: World Health Organization. 1-20.
- Xia Y., Suzuki H., Borevitz J., Blount J., Guo Z., Patel K., Dixon R. A. and Lamb C. 2004. An extracellular aspartic protease functions in *Arabidopsis* disease resistance signaling. *EMBO Journal*. 23(4):980–988.

- Zaragoza R., Torres L., García C., Eroles P., Corrales F., Bosch A., Lluch A., García-Trevijano E. R and Viña J. R. 2009. Nitration of cathepsin D enhances its proteolytic activity during mammary gland remodelling after lactation. *Biochemical Journal*. 419(2):279–288.
- Zhang Z-F. and Begg C. B. 1994. Is *Trichomonas vaginalis* a cause of cervical neoplasia? Results from a combined analysis of 24 studies. *International Journal Epidemiology*. 23(4):682–690.
- Zheng L., Roeder R. G. and Luo Y. 2003. S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component. *Cell*. 114(2):255-266.

Apéndices

1. Modelos lineales de las cinéticas de actividad proteolítica de Tv-CatD

1.1. Modelos lineales de las cinéticas de actividad proteolítica a pH 4.5 de Tv-CatD en las condiciones de restricción y alta glucosa de los extractos totales.

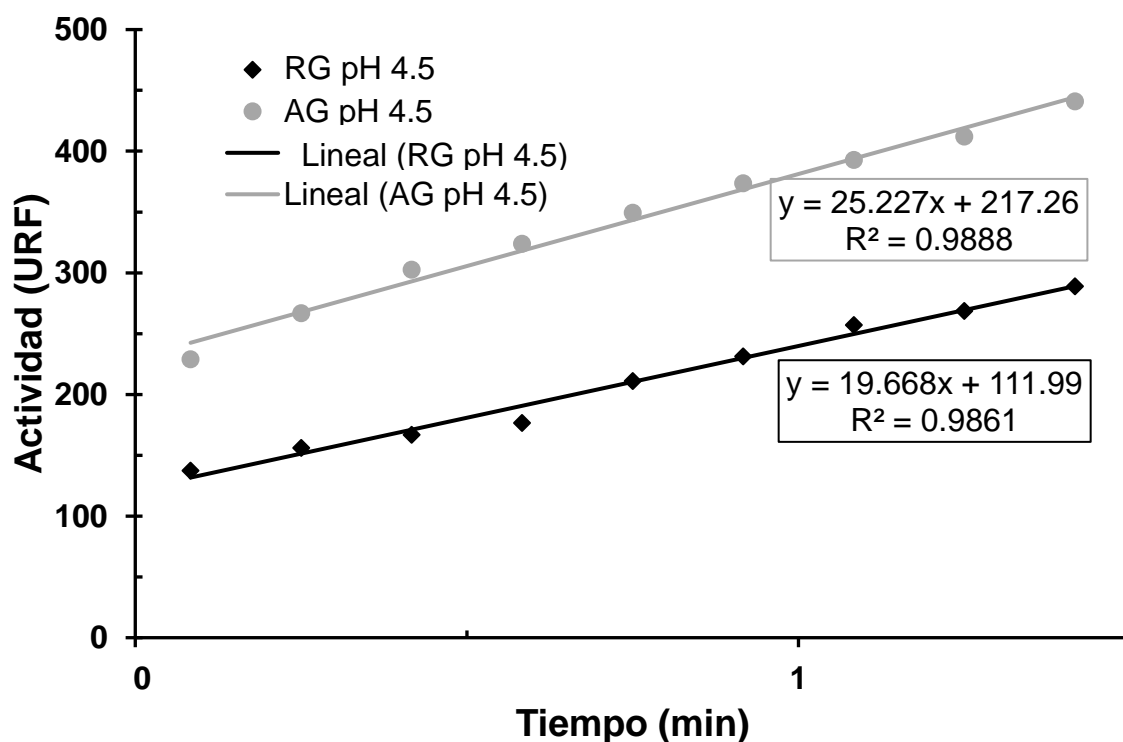


Figura A1. Modelo lineal de la actividad proteolítica de la Tv-CatD a pH 4.5 de las condiciones de restricción (línea negra) y alta glucosa (línea gris) de los extractos totales utilizados para calcular las pendientes de las cinéticas enzimáticas.

1.2. Modelos lineales de las cinéticas de actividad proteolítica a pH 4.5 de Tv-CatD en las condiciones de restricción y alta glucosa de los extractos nucleares.

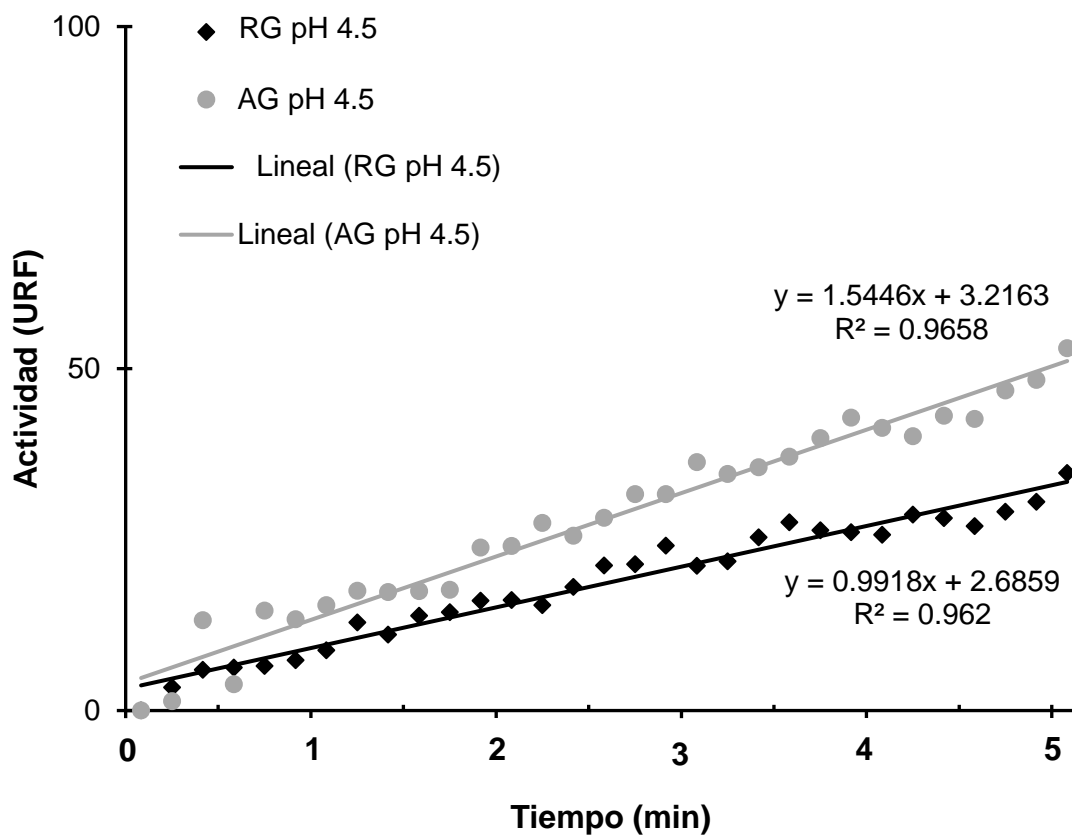


Figura A2. Modelo lineal de la actividad proteolítica de Tv-CatD a pH 4.5 de las condiciones de restricción (línea negra) y alta glucosa (línea gris) de los extractos nucleares utilizados para calcular las pendientes de las cinéticas enzimáticas.

1.3. Modelos lineales de las cinéticas de actividad proteolítica a pH 7.0 de Tv-CatD en las condiciones de restricción y alta glucosa de los extractos nucleares.

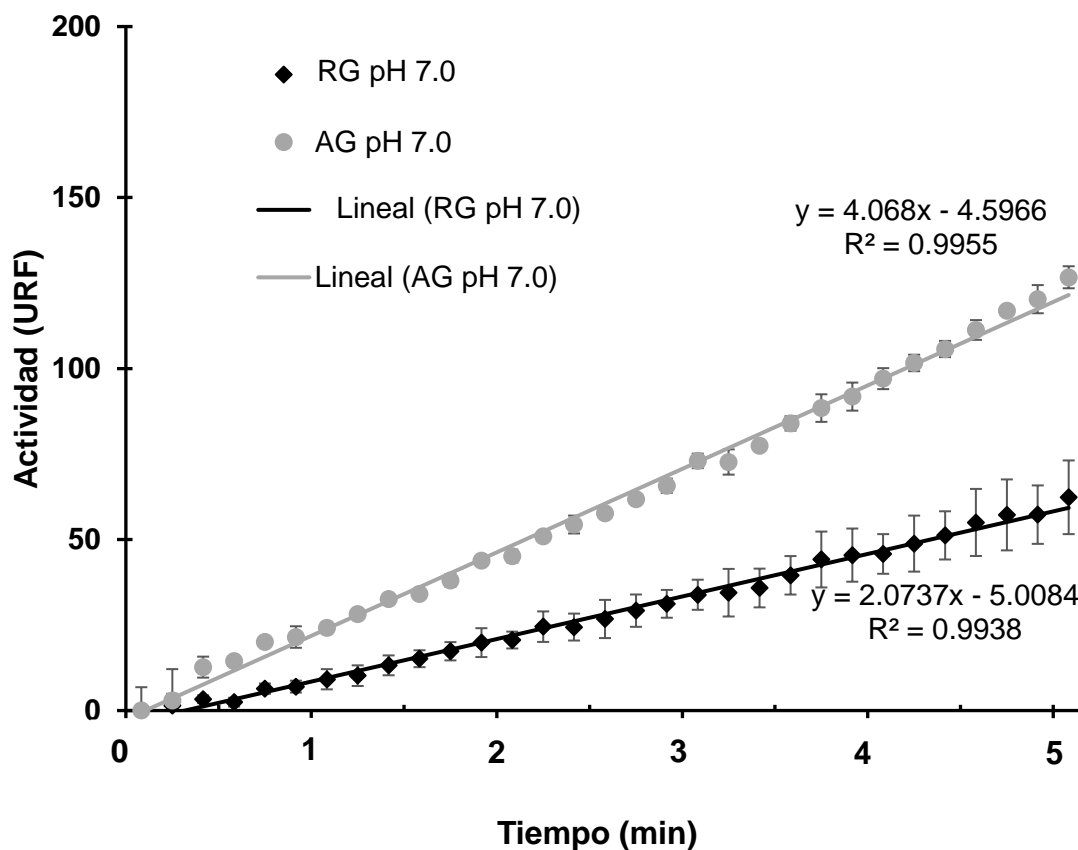


Figura A3. Modelo lineal de la actividad proteolítica de Tv-CatD a pH 7.0 de las condiciones de restricción (línea negra) y alta glucosa (línea gris) de los extractos nucleares utilizados para calcular las pendientes de las cinéticas enzimáticas.

1.4. Modelos lineales de las cinéticas de actividad proteolítica de Tv-CatD a pH 4.5 en las condiciones de bajo y alto hierro de los extractos totales.

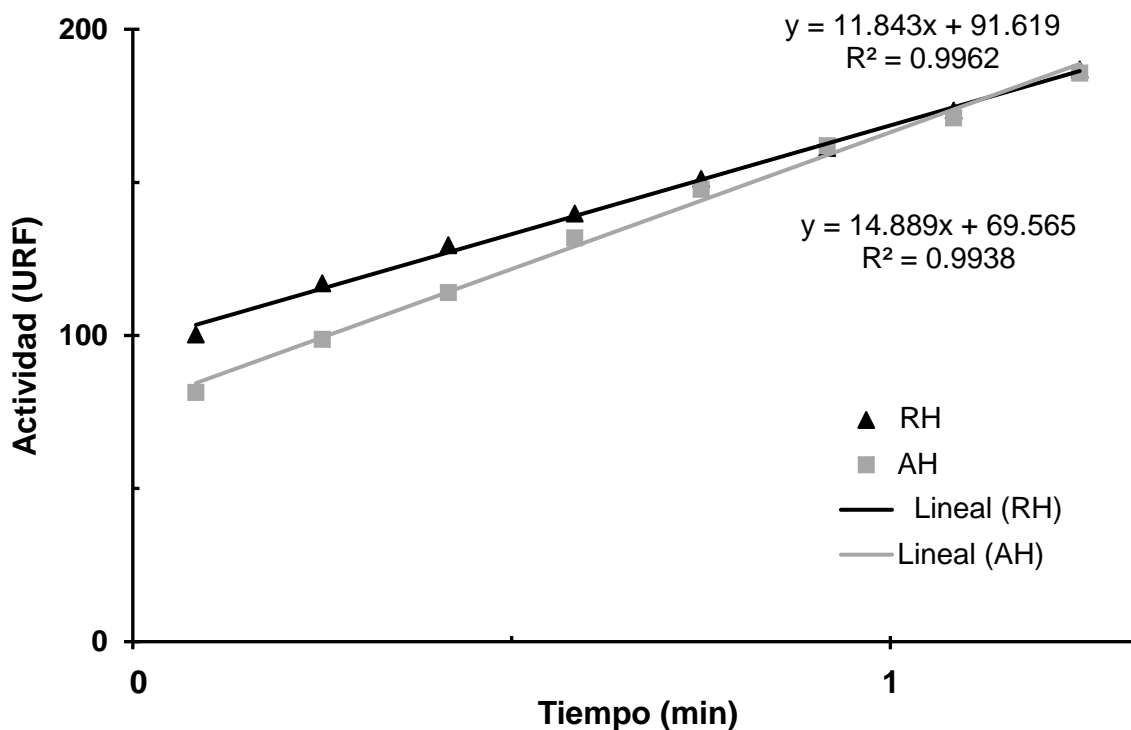


Figura A4. Modelo lineal de la actividad proteolítica de Tv-CatD a pH 4.5 de las condiciones de restricción (línea negra) y alto hierro (línea gris) de los extractos totales utilizados para calcular las pendientes de las cinéticas enzimáticas.

1.5. Modelos lineales de las cinéticas de actividad proteolítica de Tv-CatD a pH 4.5 en las condiciones de restricción y alto hierro de los extractos nucleares.

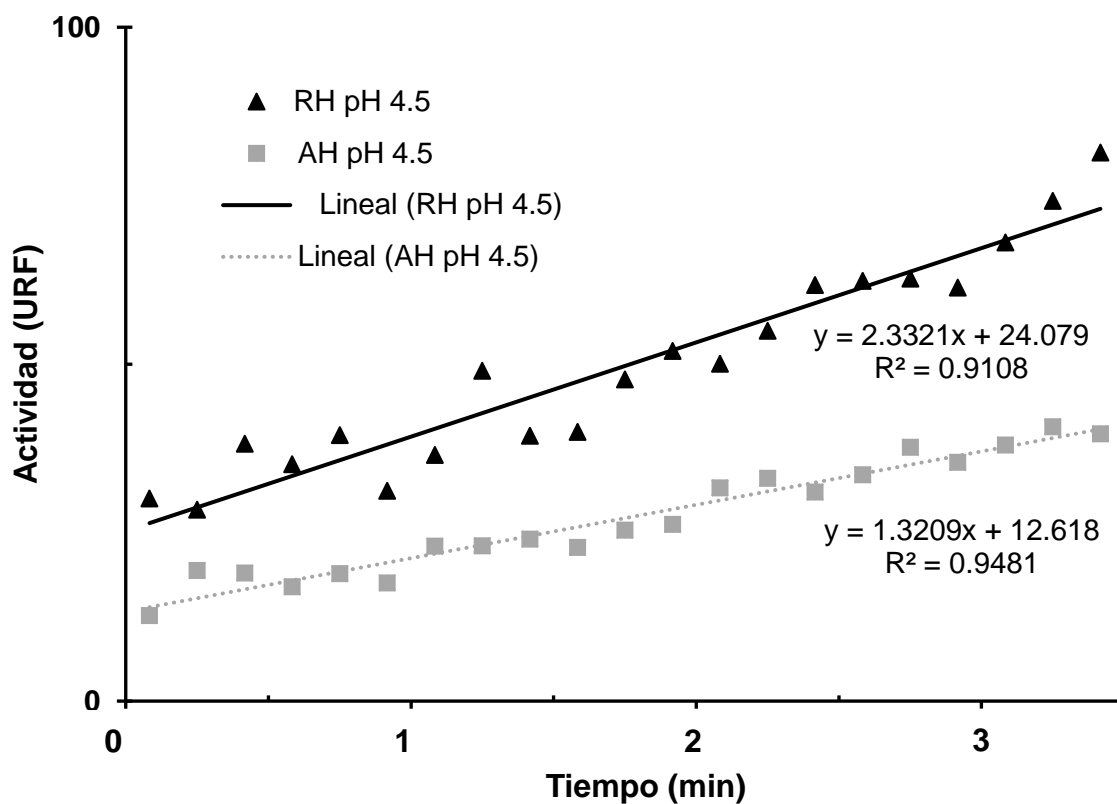


Figura A5. Modelo lineal de la actividad proteolítica de la Tv-CatD a pH 4.5 de las condiciones de restricción (línea negra) y alto hierro (línea gris) de los extractos nucleares utilizados para calcular las pendientes de las cinéticas enzimáticas.

1.6. Modelos lineales de las cinéticas de actividad proteolítica de Tv-CatD a pH 7.0 en las condiciones de restricción y alto hierro de los extractos nucleares.

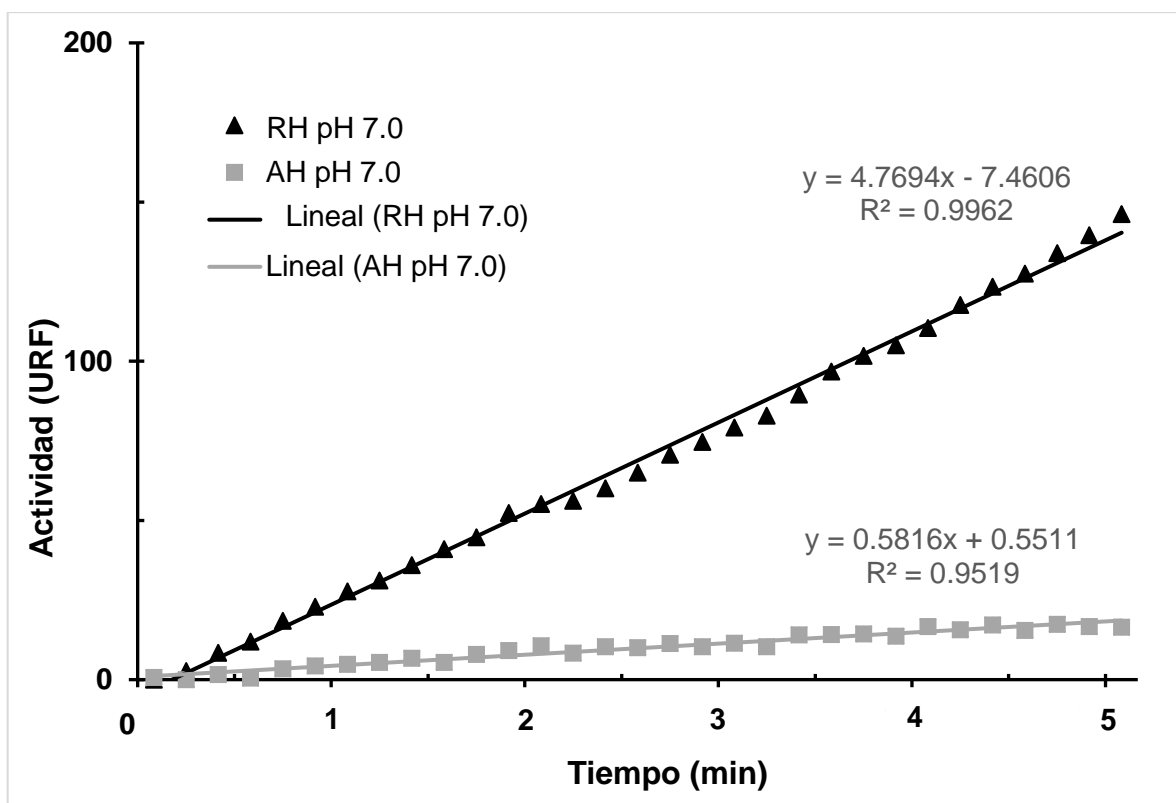


Figura A6. Modelo lineal de la actividad proteolítica de Tv-CatD a pH 7.0 de las condiciones de restricción (línea negra) y alto hierro (línea gris) de los extractos nucleares utilizados para calcular las pendientes de las cinéticas enzimáticas.

2. Tabla A1. Proteínas del extracto nuclear de la mancha de ~120 kDa identificadas por espectrometría de masas.

TVAG	No. Acceso	Descripción ¹	Score	Cobertura	# Proteínas	# Péptidos únicos	# Péptidos	# PSMs ²	aa	MW [kDa]	pI
TVAG_4	XP_0013 74360	Proteína hipotética	431.26	33.97	1	33	33	93	1042	119.0	5.17
TVAG_3	XP_0013 39450	Proteína hipotética	88.80	13.10	1	9	9	20	977	110.9	5.25

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

²Número total de espectros que hicieron match con péptidos de la proteína (Peptide Spectrum Matches)

3. Tabla A2. Proteínas del extracto nuclear de la mancha de ~35 kDa identificadas por espectrometría de masas.

TVAG	No. Acceso	Descripción ¹	Score	Cobertura	# Proteínas	# Péptidos únicos	# Péptidos	# PSMs ²	aa	MW [kDa]	pI
TVAG_4 98960	XP_00131 0290.1	Proteína ribosomal	23.57	15.29	4	2	2	5	255	28.4	5.17
TVAG_3 81870	XP_00131 3886.1	Proteína de interacción con huntingtina	15.60	8.04	1	2	2	3	373	42.5	5.11
TVAG_4 74360	XP_00131 6453.1	Proteína hipotética	14.66	4.51	1	3	3	3	1042	119.0	5.17
TVAG_2 55760	XP_00132 6607.1	Proteína hipotética	12.77	15.36	1	3	3	3	319	36.6	5.19

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

²Número total de espectros que hicieron match con péptidos de la proteína (Peptide Spectrum Matches)

4. Tablas de las proteínas del extracto nuclear de parásitos cultivados en glucosa normal identificadas por espectrometría de masas

a) Proteínas asignadas clasificadas con base a su función

Proteínas ribosomales					
TVAG	No. Acceso	Descripción¹	aa	MW [kDa]	pI
TVAG_163450	XP_001581635.1	Proteína ribosomal S5, 40S	193	21.7	9.14
TVAG_067980	XP_001318361.1	Proteína ribosomal L7-2, 60S	239	26.9	9.80
TVAG_416010	XP_001303151.1	Proteína ribosomal L18ae	176	19.8	9.83
TVAG_107720	XP_001330285.1	Proteína ribosomal L10a	215	24.3	10.13
TVAG_265950	XP_001313821.1	Proteína ribosomal L32	132	15.2	10.78
TVAG_151480	XP_001300087.1	Proteína ribosomal L38e	74	8.4	9.70
TVAG_117480	XP_001324949.1	Proteína ribosomal S14	159	16.6	10.30
TVAG_114810	XP_001308900.1	Proteína ribosomal L35Ae	102	11.7	10.20
TVAG_213810	XP_001330584.1	Proteína ribosomal L30, 60S	112	12.3	8.79
TVAG_083260	XP_001579459.1	Proteína ribosomal L22	164	18.5	9.92
TVAG_470330	XP_001301006.1	Proteína ribosomal L32	133	15.3	10.68
TVAG_128790	XP_001324688.1	Proteína ribosomal	370	40.2	9.98
TVAG_341090	XP_001328438.1	Proteína ribosomal S13p/S18e	155	17.5	11.28
TVAG_207570	XP_001313783.1	Proteína ribosomal S19e	148	16.5	10.18
TVAG_178710	XP_001580813.1	Proteína ribosomal S3	216	24.4	9.99
TVAG_027320	XP_001330149.1	Proteína ribosomal L36e	91	10.9	10.15
TVAG_158830	XP_001323879.1	Proteína ribosomal L29	124	14.3	10.39
TVAG_353710	XP_001309971.1	Proteína ribosomal L14	128	14.6	9.50
TVAG_262730	XP_001305211.1	Proteína ribosomal L14	128	14.6	9.58

TVAG_190130	XP_001580105.1	Proteína ribosomal L22-1, 60S	105	12.2	9.60
TVAG_466650	XP_001307237.1	Proteína ribosomal L5	308	34.8	9.92
TVAG_498960	XP_001310290.1	Proteína ribosomal	255	28.4	5.17
TVAG_464050	XP_001325494.1	Proteína ribosomal L7Ae	127	13.7	8.69
TVAG_110530	XP_001581427.1	Proteína ribosomal S10p/S20e	122	13.8	9.58
TVAG_371700	XP_001325919.1	Bistina	398	45.2	5.41

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

Histonas

TVAG	No- Acceso	Descripción ¹	aa	MW [kDa]	pI
TVAG_228640	XP_001580587.1	Histona H2B	129	14.1	9.85
TVAG_105970	XP_001301679.1	Histona H2A-IV	139	15.2	10.36
TVAG_100580	XP_001317958.1	Histona H4-3	101	11.4	11.33

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

Metabólicas

TVAG	No. Acceso	Descripción ¹	aa	MW [kDa]	pI
TVAG_238830	XP_001581497.1	Malato deshidrogenasa	567	63.2	6.92
TVAG_412220	XP_001314029.1	Malato deshidrogenasa: sub A	566	62.9	7.96
TVAG_487600	XP_001320756.1	Proteína de la familia de enolasa	487	53.5	5.17
TVAG_263740	XP_001317828.1	Proteína de la familia de enolasa	483	53.2	5.63
TVAG_391760	XP_001581778.1	Proteína de la familia fosfofructocinasa	323	34.7	8.41

TVAG_358110	XP_001318744.1	Proteína de la familia de enolasa	483	52.5	5.91
TVAG_464170	XP_001325506.1	Enolasa 4	493	53.3	6.73
TVAG_479680	XP_001307133.1	Oxidorreductasa, familia de 2-nitropropano dioxigenasa	318	33.9	9.32

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

ATPasas

TVAG	No. Acceso	Descripción ¹	aa	MW [kDa]	pl
TVAG_038640	XP_001326979.1	Proteína de la familia de ATPasa tipo V, sub D	246	27.9	8.03
TVAG_081670	XP_001323818.1	ATPasa, familia AAA	325	35.9	5.83

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

Citoesqueleto y asociadas

TVAG	No. acceso	Descripción ¹	aa	MW [kDa]	pl
TVAG_456920	XP_001583043.1	Beta-tubulina	447	49.9	4.92
TVAG_206890	XP_001330666.1	Alfa-tubulina 1	452	50.1	5.03
TVAG_134920	XP_001307515.1	Dineína, cadena ligera 1, citoplásmica	90	10.4	7.37
TVAG_120180	XP_001276929.1	Proteína que contiene el dominio plectina/S10	141	16.2	9.67
TVAG_015940	XP_001329899.1	RIB72	182	20.8	7.24
TVAG_059360	XP_001316961.1	Proteína de la familia con repetidos tipo armadillo/beta-catenina	505	54.9	7.06
TVAG_136270	XP_001580482.1	Proteína de la familia con repetidos tipo armadillo/beta-catenina	505	54.2	6.96
TVAG_228400	XP_001580563.1	EB1	298	33.1	5.54
TVAG_266680	XP_001329528.1	EB1	318	35.1	6.65

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

Plegamiento de proteínas

TVAG	No. Acceso	Descripción ¹	aa	MW [kDa]	pI
TVAG_287530	XP_001307548.1	Proteína de la familia Hsp20/alfa cristalina	109	12.0	8.85
TVAG_197980	XP_001319407.1	Proteína de la familia Hsp20/alfa cristalina	110	12.0	8.06
TVAG_317210	XP_001305593.1	Proteína que contiene dominio DnaJ	325	35.6	8.27
TVAG_167250	XP_001582336.1	Chaperonina	559	60.0	6.64
TVAG_088050	XP_001312753.1	Chaperonina 60	556	59.1	6.93

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

Tráfico vesicular

TVAG	No. Acceso	Descripción ¹	aa	MW [kDa]	pI
TVAG_344080	XP_001323537.1	Proteína de la familia de adaptina, región N terminal	739	81.4	6.39
TVAG_176230	XP_001299883.1	Proteína de unión a NSF alfa-soluble	291	32.8	5.10
TVAG_182190	XP_001583969.1	Proteína de la familia de coatomero, sub épsilon	276	30.8	4.77
TVAG_044240	XP_001326085.1	Proteína de la familia de adaptina, región N terminal	1006	111.6	5.40
TVAG_081600	XP_001323811.1	Proteína de la familia con motivos WH2	422	45.8	5.86
TVAG_120180	XP_001276929.1	Proteína que contiene el dominio Plectina/S10	141	16.2	9.67
TVAG_459530	XP_001308534.1	Proteína de la familia SNF7	204	22.9	4.67
TVAG_072120	XP_001584535.1	Proteína que contiene el dominio C2	290	33.3	6.43
TVAG_459000	XP_001324051.1	Proteína de la familia de repetidos HEAT	584	64.6	5.94

TVAG_494010	XP_001329594.1	Proteína de la familia de repetidos HEAT	623	69.4	7.30
-------------	----------------	--	-----	------	------

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

Endocitosis/exocitosis

TVAG	No. Acceso	Descripción ¹	aa	MW [kDa]	pI
TVAG_436840	XP_001581846.1	Proteína de la familia de dinamina, región central	597	66.1	6.28
TVAG_028010	XP_001324471.1	Proteína de la familia de dinamina, región central	639	71.8	6.24
TVAG_298300	XP_001316433.1	Proteína de la familia de dinamina, región central	594	67.3	6.21
TVAG_350040	XP_001305587.1	Proteína de la familia de dinamina, región central	611	68.1	7.01
TVAG_074990	XP_001324893.1	Proteína de la familia de dinamina, región central	636	71.4	6.74
TVAG_249080	XP_001582834.1	Proteína de la familia de sinaptobrevina	221	25.7	9.25

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

Unión a DNA

TVAG	No. Acceso	Descripción ¹	aa	MW [kDa]	pI
TVAG_002270	XP_001303884.1	Proteína que contiene dominios de unión a DNA tipo Myb	390	44.8	5.27
TVAG_435990	XP_001310782.1	Proteína que contiene dominios NAC	138	15.1	8.05
TVAG_323830	XP_001313193.1	Proteína que contiene dominios de unión a DNA tipo Myb	357	40.5	8.28

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

Señalización

TVAG	No. Acceso	Descripción ¹	aa	MW [kDa]	pI
TVAG_274750	XP_001322334.1	Proteína G, sub alfa	363	40.3	5.26
TVAG_269860	XP_001301845.1	Proteína pequeña de unión a GTP	179	19.9	8.05
TVAG_497930	XP_001304082.1	Proteína de la familia EF hand	153	17.9	4.83
TVAG_091180	XP_001312581.1	Proteína de la familia EF hand	187	21.6	5.24
TVAG_261950	XP_001328168.1	Proteína de la familia de lectina con repetidos QXW	131	15.0	6.35
TVAG_225690	XP_001578929.1	14-3-3	225	25.2	8.72
TVAG_251260	XP_001304212.1	14-3-3	238	27.2	4.84
TVAG_292620	XP_001330361.1	Proteína de la familia EF hand	165	19.2	5.50
TVAG_301860	XP_001309075.1	Proteína de la familia EF hand	190	21.5	4.98
TVAG_256840	XP_001309474.1	14-3-3	224	25.2	4.96
TVAG_462940	XP_001579594.1	14-3-3 <i>Trichomonas vaginalis</i> G3]	237	27.1	5.19
TVAG_473170	XP_001316853.1	Proteína de la familia EF hand	167	19.4	5.43

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

Procesamiento del RNA

TVAG	No- Acceso	Descripción ¹	aa	MW [kDa]	pI
TVAG_440180	XP_001309932.1	snoRNP	177	18.1	10.37
TVAG_120180	XP_001276929.1	Proteína que contiene el dominio plectina/S10	141	16.2	9.67

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

Reparación del DNA

TVAG	No. Acceso	Descripción ¹	aa	MW [kDa]	pI
TVAG_033000	XP_001310857.1	Proteína de la familia con motivos UvrB/uvrC	745	82.5	4.87
TVAG_109300	XP_001322569.1	Proteína de la familia de caseína cinasa II, sub regulatoria	208	24.6	5.12

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

Adhesinas

TVAG	No. Acceso	Descripción ¹	aa	MW [kDa]	pI
TVAG_340290	XP_001319074.1	Adhesina AP65-1, precursor	567	63.2	7.53
TVAG_183500	XP_001584099.1	Adhesina AP51-3	409	43.8	7.78

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

Degradación de proteínas

TVAG	No. Acceso	Descripción ¹	aa	MW [kDa]	pI
TVAG_110540	XP_001581428.1	Poliubiquitina	147	16.7	5.95
TVAG_388670	XP_001326757.1	Proteína que contiene el dominio PCI	435	48.9	5.03

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

Estabilidad a cromosomas

TVAG	No. Acceso	Descripción¹	aa	MW [kDa]	pI
TVAG_228400	XP_001580563.1	EB1	298	33.1	5.54
TVAG_266680	XP_001329528.1	EB1	318	35.1	6.65

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

Transcripción

TVAG	No. acceso	Descripción¹	aa	MW [kDa]	pI
TVAG_059360	XP_001316961.1	Proteína de la familia con repetidos tipo armadillo/beta-catenina	505	54.9	7.06
TVAG_136270	XP_001580482.1	Proteína de la familia con repetidos tipo armadillo/beta-catenina	505	54.2	6.96

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

Remodelación de cromatina

TVAG	No. Acceso	Descripción¹	aa	MW [kDa]	pI
TVAG_476640	XP_001583721.1	Proteína que contiene bromodominio	231	26.3	7.97
TVAG_267890	XP_001579742.1	Proteína que contiene bromodominio	228	26.3	6.57
TVAG_377950	XP_001583302.1	Proteína que contiene bromodominio	322	36.9	7.14
TVAG_256060	XP_001326637.1	Proteína que contiene bromodominio	228	26.7	8.51
TVAG_051110	XP_001321099.1	Proteína que contiene bromodominio	151	17.8	6.68
TVAG_304300	XP_001308830.1	Proteína que contiene bromodominio	192	22.4	7.93
TVAG_436380	XP_001581800.1	Proteína que contiene bromodominio	164	19.6	9.38

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

Otras

TVAG	No. Acceso	Descripción¹	aa	MW [kDa]	pI
TVAG_459000	XP_001324051.1	Proteína de la familia con repetidos HEAT	584	64.6	5.94
TVAG_494010	XP_001329594.1	Proteína de la familia con repetidos HEAT	623	69.4	7.30
TVAG_381870	XP_001313886.1	Proteína de unión a huntingtina	373	42.5	5.11
TVAG_311330	XP_001303435.1	Centrina	160	18.4	4.70
TVAG_243080	XP_001299580.1	Proteína de la familia de tioredoxina	357	40.6	8.70
TVAG_212110	XP_001319795.1	Proteína de la familia Tctex-1	109	12.4	6.52
TVAG_455950	XP_001302879.1	Proteína flagelar	512	57.7	4.54
TVAG_300550	XP_001317796.1	Proteína rica en prolina	367	41.7	8.40
TVAG_226360	XP_001317046.1	Proteína con dominio IF2B/IF5	405	46.2	4.96
TVAG_137880	XP_001322019.1	Ciclofilina citosólica	172	18.6	8.24
TVAG_216960	XP_001312904.1	Proteína de inclusión viral tipo A	3748	440.8	4.75

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

b) Proteínas hipotéticas clasificadas con base a las regiones/dominios que presentan

Segregación de cromosomas					
TVAG	No. Acceso	Regiones/dominios¹	aa	MW [kDa]	pI
TVAG_474360	XP_001316453.1	Proteína de segregación de cromosomas SMC	1042	119.0	5.17
TVAG_474360	XP_001316453.1	Proteína de segregación de cromosomas SMC	1042	119.0	5.17
TVAG_465850	XP_001314948.1	Proteína de segregación de cromosomas SMC	874	99.2	5.49
TVAG_340420	XP_001319087.1	Proteína de segregación de cromosomas SMC	501	57.7	6.25
TVAG_012080	XP_001301231.1	Proteína de segregación de cromosomas SMC	1037	117.8	5.78
TVAG_197420	XP_001317664.1	Proteína de segregación de cromosomas SMC	1033	117.9	5.39
TVAG_136170	XP_001580472.1	Proteína de segregación de cromosomas SMC	906	103.1	5.39
TVAG_182880	XP_001584038.1	Proteína de segregación de cromosomas SMC	1148	131.5	5.60
TVAG_567400	XP_001297701.1	Proteína de segregación de cromosomas SMC	512	58.5	4.94
TVAG_461810	XP_001308338.1	Proteína de segregación de cromosomas SMC	863	98.1	5.48
TVAG_122010	XP_001323020.1	Proteína de segregación de cromosomas SMC	535	61.1	4.87
TVAG_406070	XP_001327916.1	Proteína de segregación de cromosomas SMC	1003	115.4	5.50
TVAG_325000	XP_001330234.1	Proteína de segregación de cromosomas SMC	1011	117.1	5.77
TVAG_256860	XP_001309476.1	Proteína de segregación de cromosomas SMC	390	46.1	5.21
TVAG_441340	XP_001309350.1	Proteína de segregación de cromosomas SMC	1001	115.6	5.71
TVAG_140050	XP_001312436.1	Proteína de segregación de cromosomas SMC	528	60.7	9.20
TVAG_092780	XP_001304622.1	Proteína de segregación de cromosomas SMC	379	43.5	8.46
TVAG_262380	XP_001328211.1	Proteína de segregación de cromosomas SMC	482	55.3	7.62
TVAG_395640	XP_001303448.1	Proteína de segregación de cromosomas SMC	481	55.7	5.15
TVAG_098230	XP_001321910.1	Proteína de segregación de cromosomas SMC	426	49.7	5.99
TVAG_317690	XP_001313413.1	Proteína de segregación de cromosomas SMC	681	78.8	5.24

TVAG_113570	XP_001578999.1	Proteína de segregación de cromosomas SMC	374	43.6	5.47
TVAG_055250	XP_001316262.1	Proteína de segregación de cromosomas SMC,	485	55.6	6.34
TVAG_347400	XP_001306383.1	Proteína de segregación de cromosomas SMC	543	63.1	4.60
TVAG_187940	XP_001327966.1	Proteína de segregación de cromosomas SMC	876	101.0	5.11
TVAG_480880	XP_001311642.1	Proteína de segregación de cromosomas SMC	983	113.1	5.58
TVAG_067830	XP_001318346.1	Proteína de segregación de cromosomas SMC	425	49.4	6.05
TVAG_283270	XP_001582143.1	Proteína de segregación de cromosomas SMC	262	30.7	9.41
TVAG_395340	XP_001314094.1	Proteína de segregación de cromosomas SMC	411	46.1	5.30
TVAG_304540	XP_001313742.1	Proteína de segregación de cromosomas SMC	281	32.5	5.45
TVAG_117060	XP_001324907.1	ATPasa de segregación de cromosomas	878	100.4	5.25
TVAG_416640	XP_001317244.1	ATPasa de segregación de cromosomas	1104	127.4	5.16
TVAG_416640	XP_001317244.1	ATPasa de segregación de cromosomas	1104	127.4	5.16
TVAG_264690	XP_001311350.1	ATPasa de segregación de cromosomas	1138	129.7	5.11
TVAG_178230	XP_001580765.1	ATPasa de segregación de cromosomas	858	99.9	5.85
TVAG_427270	XP_001306535.1	ATPasa de segregación de cromosomas	1015	116.7	5.48
TVAG_451080	XP_001314546.1	ATPasa de segregación de cromosomas	878	100.8	5.31
TVAG_045020	XP_001323301.1	ATPasa de segregación de cromosomas	425	49.1	6.92
TVAG_229850	XP_001302093.1	ATPasa de segregación de cromosomas	1109	127.1	5.78
TVAG_116090	XP_001314794.1	ATPasa de segregación de cromosomas	1220	139.0	5.25
TVAG_283610	XP_001582178.1	ATPasa de segregación de cromosomas	1022	118.9	5.00
TVAG_317780	XP_001313422.1	ATPasa de segregación de cromosomas	383	44.6	5.02
TVAG_257660	XP_001313141.1	ATPasa de segregación de cromosomas	1007	117.6	5.47
TVAG_297170	XP_001329261.1	ATPasa de segregación de cromosomas	554	62.8	5.88
TVAG_127260	XP_001323442.1	ATPasa de segregación de cromosomas	381	44.1	5.12
TVAG_246580	XP_001579966.1	ATPasa de segregación de cromosomas	371	43.0	5.10

TVAG_450670	XP_001315717.1	ATPasa de segregación de cromosomas	1031	119.1	5.39
TVAG_460690	XP_001326875.1	ATPasa de segregación de cromosomas	619	71.0	8.03
TVAG_255760	XP_001326607.1	ATPasa de segregación de cromosomas	319	36.6	5.19
TVAG_454320	XP_001316016.1	ATPasa de segregación de cromosomas	889	101.8	5.62
TVAG_040460	XP_001313993.1	ATPasa de segregación de cromosomas	866	100.4	5.08
TVAG_050350	XP_001319443.1	ATPasa de segregación de cromosomas	875	99.8	6.28
TVAG_252430	XP_001327653.1	ATPasa de segregación de cromosomas	327	38.0	6.16

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

Transporte nucleocitoplásmico

TVAG	No. Acceso	Región/dominio ¹	aa	MW [kDa]	pI
TVAG_296740	XP_001304272.1	Nup85	437	49.9	5.83
TVAG_075540	XP_001583793.1	Proteína del poro nuclear 84/107	521	59.2	5.41
TVAG_212410	XP_001325282.1	Nup54	293	32.0	6.83
TVAG_366350	XP_001581113.1	UL36, UL37 y US3	923	95.9	9.66
TVAG_410690	XP_001304486.1	Proteína con repetidos HEAT	494	54.7	8.05

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

Ribosomales

TVAG	No- Acceso	Regiones/dominios ¹	aa	MW [kDa]	pI
TVAG_359120	XP_001323355.1	Proteína ribosomal uS5	268	29.6	9.91
TVAG_199230	XP_001582470.1	Proteína ribosomal L27a, 60S	162	18.2	10.29

TVAG_111510	XP_001330420.1	Proteína ribosomal_S25	115	12.6	9.79
TVAG_222640	XP_001312833.1	RRM	179	20.6	5.76
TVAG_062280	XP_001301034.1	Proteína de la familia Noc2p	510	58.4	5.11

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

Transcripción

TVAG	No. Acceso	Región/dominio ¹	aa	MW [kDa]	pl
TVAG_145050	XP_001302327.1	Factor de transcripción	327	37.9	9.31
TVAG_379120	XP_001583419.1	Dominio BTB/POZ	238	27.7	6.54
TVAG_438000	XP_001310351.1	Dominio BTB/POZ	473	54.1	8.98
TVAG_444210	XP_001325361.1	TAF6	403	45.3	5.29
TVAG_311560	XP_001319254.1	TAF9	311	35.6	5.07
TVAG_322780	XP_001318881.1	PHD	236	26.9	7.85
TVAG_267140	XP_001312875.1	TFIIS_I	330	37.5	5.50
TVAG_434310	XP_001328817.1	AAA	318	36.4	9.35
TVAG_147050	XP_001579947.1	Shisa	370	41.0	6.84
TVAG_133110	XP_001321476.1	PRK11634	569	61.5	5.73

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

Remodelación de la cromatina

TVAG	No. Acceso	Región/dominio ¹	aa	MW [kDa]	pl
TVAG_499770	XP_001319712.1	Bromodominio	232	26.8	6.58
TVAG_135000	XP_001307523.1	Bromodominio	224	26.2	6.65

TVAG_249840	XP_001582910.1	Bromodominio	215	24.6	8.48
-------------	----------------	--------------	-----	------	------

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

Citoesqueleto y asociadas

TVAG	No. Acceso	Región/Dominio ¹	aa	MW [kDa]	pI
TVAG_199040	XP_001582451.1	Dominio MIT	263	30.9	7.14
TVAG_391680	XP_001581770.1	Proteína asociada a microtúbulos	481	55.9	5.91
TVAG_238120	XP_001582772.1	Subunidad del complejo ESCRT-II	176	20.7	7.71
TVAG_080900	XP_001317721.1	Dineína axonemal, cadena ligera	822	93.8	5.53
TVAG_426790	XP_001326708.1	Dominio tipo CH_2	629	70.1	5.50
TVAG_180570	XP_001321305.1	Dominio FERM	5481	613.2	6.06

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

Replicación del DNA

TVAG	No. Acceso	Región/dominio ¹	aa	MW [kDa]	pI
TVAG_409150	XP_001301493.1	Factor de replicación C	324	36.0	7.77
TVAG_195920	XP_001316222.1	ATPasa AAA	454	52.6	4.83

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

Reparación del DNA

TVAG	No. Acceso	Región/dominio ¹	aa	MW [kDa]	pI
TVAG_182530	XP_001584003.1	Endonucleasa	520	59.4	6.61

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

Procesamiento RNA

TVAG	No. Acceso	Región/dominio ¹	aa	MW [kDa]	pI
TVAG_250380	XP_001582964.1	Proteína de unión a cap, proteína de cis-splicing	734	83.7	4.83
TVAG_135220	XP_001310399.1	Factor de splicing	338	39.6	7.97

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

Metabólicas

TVAG	No. Acceso	Región/dominio ¹	aa	MW [kDa]	pI
TVAG_164890	XP_001305174.1	Fosfato isomerasa de azúcares	523	57.3	8.62
TVAG_165340	XP_001328129.1	Succinil-CoA sintetasa, sub alfa	309	32.5	9.45
TVAG_165330	XP_001328128.1	Familia YjgF, YER057c y UK114	306	35.4	9.88
TVAG_004210	XP_001304511.1	Ciclasa tipo LanC	1504	175.0	7.01

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

Proteasas

TVAG	No. Acceso	Región/dominio ¹	aa	MW [kDa]	pl
TVAG_318930	XP_001317761.1	Zinc peptidasa	454	50.7	8.24

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

Degradación de proteínas

TVAG	No. Acceso	Región/dominio ¹	aa	MW [kDa]	pl
TVAG_062600	XP_001579641.1	Familia ParcG	236	27.2	7.44

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

Transporte a través de membrana

TVAG	No. Acceso	Región/dominio ¹	aa	MW [kDa]	pl
TVAG_340650	XP_001328394.1	Transportador ABC	397	44.7	6.29
TVAG_167830	XP_001307232.1	Dominio hemeritrina	246	28.0	6.95
TVAG_493040	XP_001313860.1	PBP tipo 2	254	29.1	7.83
TVAG_139970	XP_001312429.1	Subunidad de antiportador Na ⁺ /H ⁺	482	55.9	5.97

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

Tráfico vesicular

TVAG	No. Acceso	Región/dominio¹	aa	MW [kDa]	pI
TVAG_432640	XP_001580654.1	Factor NSF	312	34.6	5.22
TVAG_432640	XP_001580654.1	Factor NSF	312	34.6	5.22
TVAG_403340	XP_001311582.1	Proteína de unión a NSF	284	31.6	5.90

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

ATPasas

TVAG	No. Acceso	Región/dominio¹	aa	MW [kDa]	pI
TVAG_262750	XP_001305213.1	ATPasa V	433	48.9	6.61
TVAG_150120	XP_001329084.1	ATPasa AAA	386	45.0	9.70

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

Señalización					
TVAG	No. Acceso	Región/dominio¹	aa	MW [kDa]	pl
TVAG_311300	XP_001303432.1	Repetidos ricos en leucina	440	50.3	4.26
TVAG_440960	XP_001314940.1	Repetidos TPR	533	59.7	7.94
TVAG_447870	XP_001329051.1	Repetidos ricos en leucina	233	25.4	8.85
TVAG_386160	XP_001305122.1	Proteína tipo TMPIT	371	42.9	4.74
TVAG_458790	XP_001324030.1	DM10	191	22.1	8.22
TVAG_194710	XP_001307315.1	Repetidos ANK	578	65.9	6.10
TVAG_052080	XP_001313089.1	Repetidos ricos en leucina	406	46.9	4.42
TVAG_468300	XP_001326037.1	Repetidos ankirina	326	37.2	7.87
TVAG_128680	XP_001324677.1	Dominio SH3	284	32.6	4.92
TVAG_184000	XP_001584149.1	Dominios SH3	730	83.2	6.39
TVAG_483080	XP_001310981.1	Repetidos ankirina	251	28.2	6.19
TVAG_093810	XP_001583193.1	Repetidos ankirina	228	25.4	5.07
TVAG_030170	XP_001304048.1	Repetidos ricos en leucina	193	21.8	5.96
TVAG_253730	XP_001579247.1	Dominio CSN8/PSMD8/EIF3K	259	30.1	5.52

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

Otras					
TVAG	No. Acceso	Región/dominio¹	aa	MW [kDa]	pI
TVAG_021550	XP_001581194.1	Proteína con actividad de heterodimerización	408	46.1	6.13
TVAG_330860	XP_001295926.1	NYD-SP28	461	54.7	9.22
TVAG_491310	XP_001326215.1	DUF2317	385	43.5	6.92
TVAG_302800	XP_001306070.1	Sec3	699	79.9	7.33
TVAG_342930	XP_001319352.1	Proteína coreguladora de parkina	241	27.6	9.07
TVAG_104520	XP_001312501.1	Nucleósido/nucleótido cinasa	380	43.5	9.11
TVAG_486780	XP_001326458.1	Dominio DUF342	492	55.6	7.27

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

Sin regiones o dominios					
TVAG	No. Acceso	Región/dominio¹	aa	MW [kDa]	pI
TVAG_484000	XP_001322712.1	-	349	39.9	8.28
TVAG_291910	XP_001329461.1	-	327	37.7	9.32
TVAG_496250	XP_001305521.1	-	253	28.6	9.45
TVAG_166430	XP_001582254.1	-	844	95.0	4.83
TVAG_266970	XP_001329557.1	-	200	23.5	9.58
TVAG_197330	XP_001317655.1	-	250	29.0	9.80
TVAG_251250	XP_001304211.1	-	248	28.6	8.38
TVAG_266360	XP_001329496.1	-	473	54.9	4.98
TVAG_221720	XP_001325042.1	-	501	57.6	8.06
TVAG_269000	XP_001320597.1	-	243	27.9	9.39

TVAG_163260	XP_001581616.1	-	395	45.5	4.87
TVAG_080140	XP_001310684.1	-	358	41.7	9.11
TVAG_440200	XP_001309934.1	-	240	25.9	9.82
TVAG_190560	XP_001580146.1	-	192	22.3	8.62
TVAG_190040	XP_001580099.1	-	317	35.1	5.72
TVAG_455090	XP_001306669.1	-	218	22.6	9.61
TVAG_247850	XP_001294080.1	-	272	30.6	4.98
TVAG_447580	XP_001329022.1	-	170	18.7	10.21
TVAG_257010	XP_001302551.1	-	155	17.7	8.53

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

5. Tablas de las proteínas del extracto nuclear de parásitos cultivados en alto hierro identificadas por espectrometría de masas

a) Proteínas asignadas clasificadas con base a su función

Proteínas ribosomales					
TVAG	No. Acceso	Descripción¹	aa	MW [kDa]	pl
TVAG_164550	XP_001325568.1	Proteína ribosomal	370	40.3	9.98
TVAG_178710	XP_001580813.1	Proteína ribosomal S3	216	24.4	9.99
TVAG_112230	XP_001300910.1	Proteína ribosomal L13e	189	21.8	10.65
TVAG_262730	XP_001305211.1	Proteína ribosomal L14	128	14.6	9.58
TVAG_163450	XP_001581635.1	Proteína ribosomal S5, 40S	193	21.7	9.14
TVAG_490240	XP_001314140.1	Proteína ribosomal L5	308	34.8	9.92
TVAG_114810	XP_001308900.1	Proteína ribosomal L35Ae	102	11.7	10.20
TVAG_067980	XP_001318361.1	Proteína ribosomal L7-2, 60S	239	26.9	9.80
TVAG_213810	XP_001330584.1	Proteína ribosomal L30, 60S	112	12.3	8.79
TVAG_344700	XP_001303966.1	Proteína ribosomal L10	317	34.3	6.65
TVAG_353710	XP_001309971.1	Proteína ribosomal L14	128	14.6	9.50
TVAG_254840	XP_001314806.1	Proteína ribosomal L12, 60S	160	17.1	9.77
TVAG_416010	XP_001303151.1	Proteína ribosomal L18ae	176	19.8	9.83
TVAG_005910	XP_001323739.1	Proteína ribosomal L8	251	26.9	10.49
TVAG_107720	XP_001330285.1	Proteína ribosomal L10a	215	24.3	10.13
TVAG_379260	XP_001583433.1	Proteína ribosomal S4-C, 40S	255	28.6	9.91
TVAG_231250	XP_001313714.1	Proteína ribosomal L21e	159	17.9	11.02
TVAG_341090	XP_001328438.1	Proteína ribosomal S13p/S18e	155	17.5	11.28
TVAG_198680	XP_001582415.1	Proteína ribosomal S7, 40S	167	18.6	9.55

TVAG_074610	XP_001324856.1	Proteína ribosomal	209	23.8	10.33
TVAG_151480	XP_001300087.1	Proteína ribosomal L38e	74	8.4	9.70
TVAG_199100	XP_001582457.1	Proteína ribosomal S7, 40S	186	20.8	9.52
TVAG_117480	XP_001324949.1	Proteína ribosomal S14	159	16.6	10.30
TVAG_276360	XP_001321786.1	Proteína ribosomal L15-1, 60S	204	24.3	11.24
TVAG_185180	XP_001584198.1	Proteína ribosomal L19-3, 60S	178	21.0	11.74
TVAG_189070	XP_001313620.1	Proteína ribosomal L27e	139	15.9	9.99
TVAG_318710	XP_001294322.1	Proteína ribosomal L6	197	22.8	7.91
TVAG_027320	XP_001330149.1	Proteína ribosomal L36e	91	10.9	10.15
TVAG_371250	XP_001302994.1	Proteína ribosomal S24e	140	16.0	10.61
TVAG_498960	XP_001310290.1	Proteína ribosomal	255	28.4	5.17
TVAG_282960	XP_001582112.1	Proteína ribosomal S6e	216	24.5	10.37
TVAG_224750	XP_001327622.1	Proteína ribosomal L23	140	15.6	10.21
TVAG_237220	XP_001582682.1	Proteína ribosomal L24	138	15.7	10.46
TVAG_402510	XP_001580982.1	Proteína acídica P1, 60S	105	11.0	4.32
TVAG_313290	XP_001300556.1	Proteína ribosomal L32	132	15.3	10.81
TVAG_142060	XP_001303592.1	Proteína ribosomal S3Ae	247	28.1	9.45
TVAG_177920	XP_001580734.1	Proteína ribosomal S16, 40S	140	15.6	9.91

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

Histonas y asociadas

TVAG	No. Acceso	Descripción ¹	aa	MW [kDa]	pI
TVAG_239320	XP_001581544.1	Histona H4-3	101	11.4	11.33
TVAG_105970	XP_001301679.1	Histona H2A-IV	139	15.2	10.36
TVAG_228640	XP_001580587.1	Histona H2B	129	14.1	9.85
TVAG_239330	XP_001581545.1	Histona H3-1	138	15.5	11.25
TVAG_087830	XP_001299817.1	Histona H3-1	138	15.5	11.25
TVAG_002360	XP_001299861.1	Proteína de la familia linker de histona H1 y H5	302	35.4	9.73

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

Transcripción

TVAG	No. Acceso	Descripción ¹	aa	MW [kDa]	pI
TVAG_059360	XP_001316961.1	Proteína de la familia con repetidos tipo armadillo/beta-catenina	505	54.9	7.06
TVAG_322590	XP_001318862.1	Proteína de la familia con repetidos tipo armadillo/beta-catenina	776	86.7	5.35
TVAG_113600	XP_001579002.1	RNA polimerasa Rpb5, N-terminal	202	23.4	6.55
TVAG_035230	XP_001583486.1	Proteína de la familia con repetidos tipo armadillo/beta-catenina	506	55.1	6.01
TVAG_473790	XP_001317423.1	Proteína de la familia B-box dedo de zinc	685	77.2	5.91
TVAG_358260	XP_001318759.1	Factor de transcripción 2B	192	22.8	8.82
TVAG_038880	XP_001324264.1	Topoisomerasa II	1458	166.9	6.39
TVAG_193640	XP_001315517.1	Proteína que contiene el dominio SNF2, dominio N-terminal	1579	180.9	5.20

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

Procesamiento del RNA

TVAG	No. Acceso	Descripción¹	aa	MW [kDa]	pI
TVAG_158990	XP_001323895.1	Proteína de unión a RNA	189	21.1	10.30
TVAG_371980	XP_001325947.1	Proteína que contiene el dominio de unión SnoRNA	569	63.6	6.95
TVAG_179860	XP_001313244.1	RNA helicasa p47 dependiente de ATP	420	47.5	6.23

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

ATPasas

TVAG	No. Acceso	Descripción₁	aa	MW [kDa]	pI
TVAG_075320	XP_001309656.1	Proteína de la familia de ATPasas tipo V, sub 116kDa	797	91.5	6.24
TVAG_136250	XP_001580480.1	Proteína de la familia de ATPasas tipo V, sub C	174	17.9	7.24

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

Metabólicas

TVAG	No. Acceso	Descripción¹	aa	MW [kDa]	pI
TVAG_238830	XP_001581497.1	Malato deshidrogenasa	567	63.2	6.92
TVAG_412220	XP_001314029.1	Malato deshidrogenasa, sub A	566	62.9	7.96
TVAG_267870	XP_001579740.1	Malato deshidrogenasa	567	63.1	8.09
TVAG_230580	XP_001321321.1	Piruvato:ferredoxina oxidoreductasa BI	1157	127.9	7.97
TVAG_198110	XP_001582360.1	Piruvato:ferredoxina oxidoreductasa A	1157	127.9	8.03
TVAG_242960	XP_001311861.1	Piruvato:ferredoxina oxidoreductasa BII	1157	128.0	7.93
TVAG_259190	XP_001322061.1	Succinil-CoA ligasa, cadena beta, precursor hidrogenosomal	407	43.8	7.01

TVAG_464170	XP_001325506.1	Enolasa 4	493	53.3	6.73
TVAG_157940	XP_001310739.1	Proteína de la familia de 4-alfa-glucanotransferasa	932	109.0	6.13
TVAG_154680	XP_001313895.1	Proteína de la familia de 4-alfa-glucanotransferasa	930	108.7	6.02
TVAG_391760	XP_001581778.1	Proteína de la familia de fosfofructocinasa	323	34.7	8.41
TVAG_293770	XP_001307577.1	Proteína de la familia de fosfofructocinasa	326	34.6	8.10
TVAG_268050	XP_001579758.1	Fosfoglicerato cinasa	419	45.3	7.06
TVAG_360700	XP_001307153.1	Fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa	328	36.2	6.30
TVAG_462920	XP_001579592.1	Proteína de la familia de fosfofructocinasa	324	34.5	8.16
TVAG_272760	XP_001330332.1	Proteína de la familia de dihidrolipoamida deshidrogenasa	471	50.2	8.56
TVAG_239660	XP_001320829.1	Proteína tipo IscS/NifS	411	44.8	8.21

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

Adhesinas

TVAG	No. Acceso	Descripción ¹	aa	MW [kDa]	pI
TVAG_183790	XP_001584128.1	Adhesina AP65-3	567	63.1	8.32
TVAG_340290	XP_001319074.1	Adhesina AP65-1, precursor	567	63.2	7.53
TVAG_183500	XP_001584099.1	Adhesina AP51-3	409	43.8	7.78
TVAG_318670	XP_001300482.1	Adhesina AP33-1	309	32.4	9.44
TVAG_144730	XP_001303981.1	Adhesina AP51-2	409	43.8	7.44

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

Citoesqueleto y asociadas

TVAG	No. Acceso	Descripción¹	aa	MW [kDa]	pI
TVAG_456920	XP_001583043.1	Beta-tubulina	447	49.9	4.92
TVAG_206890	XP_001330666.1	Alfa-tubulina 1	452	50.1	5.03
TVAG_512800	XP_001281986.1	Actina, parcial	360	40.2	5.49
TVAG_134920	XP_001307515.1	Dineina, cadena ligera 1, citoplásmica	90	10.4	7.37
TVAG_190450	XP_001580136.1	Alfa-actinina	931	106.2	5.02
TVAG_239310	XP_001581543.1	Actinina	1129	127.8	5.00
VAG_497260	XP_001320325.1	Proteína de la familia de dineina, cadena pesada	4493	512.3	5.63
TVAG_015940	XP_001329899.1	RIB72	182	20.8	7.24
TVAG_006480	XP_001323796.1	Proteína de la familia de dineina, cadena pesada	4660	529.9	6.04

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

Plegamiento de proteínas

TVAG	No. Acceso	Descripción¹	aa	MW [kDa]	pI
TVAG_088050	XP_001312753.1	Chaperonina 60	556	59.1	6.93
TVAG_044510	XP_001314691.1	HSP70	659	71.2	5.40
TVAG_153560	XP_001317545.1	Proteína de choque térmico	720	83.6	5.02

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

Tráfico vesicular

TVAG	No. Acceso	Descripción¹	aa	MW [kDa]	pI
TVAG_072120	XP_001584535.1	Proteína que contiene el dominio C2	290	33.3	6.43
TVAG_485580	XP_001302514.1	Proteína que contiene el dominio C2	1284	144.1	6.11
TVAG_398430	XP_001304932.1	Proteína que contiene el dominio C2	287	33.1	8.48

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

Señalización

TVAG	No. Acceso	Descripción¹	aa	MW [kDa]	pI
TVAG_261950	XP_001328168.1	Proteína de la familia de lectinas con repetidos QXW	131	15.0	6.35
TVAG_366360	XP_001581114.1	Proteína de la familia de lectinas con repetidos QXW	246	28.4	8.35
TVAG_274750	XP_001322334.1	Proteína G, sub alfa	363	40.3	5.26

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

Otras

TVAG	No. Acceso	Descripción¹	aa	MW [kDa]	pI
TVAG_067400	XP_001328958.1	Factor de elongación 1 alfa	437	48.3	8.63
TVAG_264700	XP_001311351.1	Poliubiquitina	229	26.0	6.57
TVAG_137880	XP_001322019.1	Ciclofilina citosólica	172	18.6	8.24
TVAG_064490	XP_001320125.1	Rubreritina	191	21.3	7.99
TVAG_051820	XP_001308200.1	Proteína transportadora mitocondrial	401	44.6	9.66
TVAG_371230	XP_001302992.1	Proteína poli embriónica	426	47.9	8.56

TVAG_037570	XP_001310180.1	Hierro hidrogenasa, 64kDa	591	65.0	7.71
TVAG_310050	XP_001318941.1	TvhydB	404	44.7	9.17
TVAG_212800	XP_001325321.1	Metalopeptidasa aminopeptidasa tipo P, Clan MG, familia M24	967	109.1	5.40
TVAG_030160	XP_001304047.1	MGC78960	605	65.6	6.93
TVAG_421580	XP_001305564.1	Adaptina mu	426	48.9	6.37
TVAG_036010	XP_001583562.1	Oxígeno reductasa hidrogenosomal	417	46.4	7.85
TVAG_298300	XP_001316433.1	Proteína de la familia de dinamina, región central	594	67.3	6.21

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

b) Proteínas hipotéticas clasificadas con base a las regiones/dominios que presentan

Ribosomales					
TVAG	No. Acceso	Región/dominio¹	aa	MW [kDa]	pl
TVAG_125550	XP_001311341.1	Proteína ribosomal L3p, putativa	415	46.7	10.24
TVAG_259540	XP_001298508.1	Proteína ribosomal S9, 40S, putativa	185	21.7	10.27
TVAG_359120	XP_001323355.1	Proteína ribosomal uS5	268	29.6	9.91
TVAG_206300	XP_001325685.1	Proteína ribosomal S8, 40S	197	22.1	10.33
TVAG_143790	XP_001300997.1	Proteína ribosomal L27a, 60S, putativa	151	17.0	10.18
TVAG_344720	XP_001303968.1	Proteína ribosomal L13a, 60S, putativa	200	22.4	10.08

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

Segregación de cromosomas					
TVAG	No. Acceso	Región/dominio¹	aa	MW [kDa]	pl
TVAG_474360	XP_001316453.1	Proteína de segregación de cromosomas SMC	1042	119.0	5.17
TVAG_465850	XP_001314948.1	Proteína de segregación de proteínas SMC	874	99.2	5.49
TVAG_117060	XP_001324907.1	ATPasa de segregación de cromosomas	878	100.4	5.25
TVAG_461810	XP_001308338.1	Proteína de segregación de cromosomas SMC	863	98.1	5.48
TVAG_136170	XP_001580472.1	Proteína de segregación de cromosomas SMC	906	103.1	5.39
TVAG_012080	XP_001301231.1	Proteína de segregación de cromosomas SMC	1037	117.8	5.78
TVAG_197420	XP_001317664.1	Proteína de segregación de cromosomas SMC	1033	117.9	5.39
TVAG_325000	XP_001330234.1	Proteína de segregación de cromosomas SMC	1011	117.1	5.77
TVAG_182880	XP_001584038.1	Proteína de segregación de cromosomas SMC	1148	131.5	5.60

TVAG_262380	XP_001328211.1	Proteína de segregación de cromosomas SMC	482	55.3	7.62
TVAG_122010	XP_001323020.1	Proteína de segregación de cromosomas SMC	535	61.1	4.87

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

Procesamiento RNA

TVAG	No. Acceso	Región/dominio ¹	aa	MW [kDa]	pI
TVAG_043470	XP_001315624.1	Proteína de unión a RNA, putativa	202	23.2	10.27
TVAG_210380	XP_001327731.1	Ribonucleoproteína heterogénea nuclear A1, putativa	190	21.1	11.21

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

Reparación del DNA

TVAG	No. Acceso	Región/dominio ¹	aa	MW [kDa]	pI
TVAG_339450	XP_001311558.1	Exonucleasa reparadora de DNA SbcCD, sub ATPasa	977	110.9	5.25
TVAG_192570	XP_001581267.1	Proteína de reconocimiento estructura específica	493	56.5	5.07

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

Metabólicas

TVAG	No. Acceso	Región/dominio ¹	aa	MW [kDa]	pI
TVAG_165340	XP_001328129.1	Succinil-CoA sintetasa, sub alfa	309	32.5	9.45
TVAG_047890	XP_001330450.1	Succinato--CoA ligasa, sub alfa	309	32.6	9.44

TVAG_395550	XP_001330176.1	Acetil-CoA hidrolasa, putativa	523	57.2	8.79
TVAG_366380	XP_001581116.1	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	361	39.2	7.84
TVAG_164890	XP_001305174.1	Acetil-CoA hidrolasa, putativa	523	57.3	8.62
TVAG_412780	XP_001298944.1	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	361	39.2	7.62

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

Degradación de proteínas

TVAG	No. Acceso	Región/dominio ¹	aa	MW [kDa]	pI
TVAG_062600	XP_001579641.1	Parkina co-reguladora	236	27.2	7.44
TVAG_342930	XP_001319352.1	Parkina co-reguladora	241	27.6	9.07

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

Otras

TVAG	No. Acceso	Región/dominio ¹	aa	MW [kDa]	pI
TVAG_006020	XP_001323750.1	ATPasa tipo V	347	40.0	5.03
TVAG_458790	XP_001324030.1	Dominio DM10	191	22.1	8.22
TVAG_056140	XP_001318843.1	SAS-6, N-terminal	206	23.8	4.91
TVAG_443950	XP_001325335.1	Lisil-tRNA sintetasa	483	57.2	7.02
TVAG_328600	XP_001313027.1	Dock-10, putativa	1729	199.4	6.15
TVAG_420260	XP_001321627.1	ATP sintasa, sub beta, putativa	610	67.9	5.26

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

Sin regiones/dominios					
TVAG	No. Acceso	Región/dominio ¹	aa	MW [kDa]	pI
TVAG_440200	XP_001309934.1	-	240	25.9	9.82
TVAG_567390	XP_001297700.1	-	257	30.2	7.34
TVAG_365950	XP_001581073.1	-	512	58.9	6.64
TVAG_081640	XP_001323815.1	-	130	14.0	9.19
TVAG_433060	XP_001580696.1	-	923	106.9	5.47
TVAG_529190	XP_001296407.1	-	1088	122.4	6.47
TVAG_181630	XP_001298524.1	-	135	15.6	5.95
TVAG_409860	XP_001311778.1	-	734	81.3	6.11
TVAG_382870	XP_001307832.1	-	489	55.7	6.48
TVAG_377870	XP_001583294.1	-	304	36.2	9.60
TVAG_455090	XP_001306669.1	-	218	22.6	9.61
TVAG_317280	XP_001305600.1	-	139	16.1	4.56
TVAG_499740	XP_001319709.1	-	180	20.1	7.56
TVAG_393390	XP_001326835.1	-	563	64.0	5.30
TVAG_152530	XP_001306095.1	-	108	12.4	8.50

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

6. Comparación de los proteomas nucleares de parásitos cultivados en GN y AH

a) Lista de proteínas nucleares de parásitos cultivados en GN y AH que se comparten

TVAG	No. Acceso	Descripción ¹	aa	MW [kDa]	pl
TVAG_165340	XP_001328129.1	Proteína hipotética	309	32.5	9.45
TVAG_474360	XP_001316453.1	Proteína hipotética	1042	119.0	5.17
TVAG_164890	XP_001305174.1	Proteína hipotética	523	57.3	8.62
TVAG_465850	XP_001314948.1	Proteína hipotética	874	99.2	5.49
TVAG_117060	XP_001324907.1	Proteína hipotética	878	100.4	5.25
TVAG_461810	XP_001308338.1	Proteína hipotética	863	98.1	5.48
TVAG_136170	XP_001580472.1	Proteína hipotética	906	103.1	5.39
TVAG_440200	XP_001309934.1	Proteína hipotética	240	25.9	9.82
TVAG_567390	XP_001297700.1	Proteína hipotética	257	30.2	7.34
TVAG_012080	XP_001301231.1	Proteína hipotética	1037	117.8	5.78
TVAG_062600	XP_001579641.1	Proteína hipotética	236	27.2	7.44
TVAG_458790	XP_001324030.1	Proteína hipotética	191	22.1	8.22
TVAG_197420	XP_001317664.1	Proteína hipotética	1033	117.9	5.39
TVAG_359120	XP_001323355.1	Proteína hipotética	268	29.6	9.91
TVAG_342930	XP_001319352.1	Proteína hipotética	241	27.6	9.07
TVAG_455090	XP_001306669.1	Proteína hipotética	218	22.6	9.61
TVAG_122010	XP_001323020.1	Proteína hipotética	535	61.1	4.87
TVAG_325000	XP_001330234.1	Proteína hipotética	1011	117.1	5.77
TVAG_182880	XP_001584038.1	Proteína hipotética	1148	131.5	5.60
TVAG_499740	XP_001319709.1	Proteína hipotética	180	20.1	7.56
TVAG_262380	XP_001328211.1	Proteína hipotética	482	55.3	7.62
TVAG_238830	XP_001581497.1	Malato deshidrogenasa	567	63.2	6.92
TVAG_456920	XP_001583043.1	Beta-tubulina	447	49.9	4.92
TVAG_412220	XP_001314029.1	Malato deshidrogenasa, sub A	566	62.9	7.96
TVAG_340290	XP_001319074.1	adhesina AP65-1, precursor	567	63.2	7.53

TVAG_206890	XP_001330666.1	Alfa-tubulina 1	452	50.1	5.03
TVAG_183500	XP_001584099.1	Adhesina AP51-3	409	43.8	7.78
TVAG_105970	XP_001301679.1	Histona H2A-IV	139	15.2	10.36
TVAG_228640	XP_001580587.1	Histona H2B	129	14.1	9.85
TVAG_072120	XP_001584535.1	Proteína que contiene el dominio C2	290	33.3	6.43
TVAG_261950	XP_001328168.1	Proteína de la familia de lectinas con repetidos QXW	131	15.0	6.35
TVAG_464170	XP_001325506.1	Enolasa 4	493	53.3	6.73
TVAG_134920	XP_001307515.1	Dineina citoplásmica, cadena ligera 1	90	10.4	7.37
TVAG_088050	XP_001312753.1	Chaperonina 60	556	59.1	6.93
TVAG_178710	XP_001580813.1	Proteína ribosomal S3	216	24.4	9.99
TVAG_391760	XP_001581778.1	Proteína de la familia de fosfofructocinasa	323	34.7	8.41
TVAG_262730	XP_001305211.1	Proteína ribosomal L14	128	14.6	9.58
TVAG_163450	XP_001581635.1	Proteína ribosomal S5, 40S	193	21.7	9.14
TVAG_015940	XP_001329899.1	Proteína RIB72	182	20.8	7.24
TVAG_059360	XP_001316961.1	Proteína de la familia con repetidos tipo armadillo/beta-catenina	505	54.9	7.06
TVAG_114810	XP_001308900.1	Proteína ribosomal L35Ae	102	11.7	10.20
TVAG_067980	XP_001318361.1	Proteína ribosomal L7-2, 60S	239	26.9	9.80
TVAG_213810	XP_001330584.1	Proteína ribosomal L30, 60S	112	12.3	8.79
TVAG_353710	XP_001309971.1	Proteína ribosomal L14	128	14.6	9.50
TVAG_416010	XP_001303151.1	Proteína ribosomal L18ae	176	19.8	9.83
TVAG_107720	XP_001330285.1	Proteína ribosomal L10a	215	24.3	10.13
TVAG_341090	XP_001328438.1	Proteína ribosomal S13p/S18e	155	17.5	11.28
TVAG_137880	XP_001322019.1	Ciclofilina citosólica	172	18.6	8.24
TVAG_151480	XP_001300087.1	Proteína ribosomal L38e	74	8.4	9.70
TVAG_117480	XP_001324949.1	Proteína ribosomal S14	159	16.6	10.30
TVAG_027320	XP_001330149.1	Proteína ribosomal L36e	91	10.9	10.15
TVAG_498960	XP_001310290.1	Proteína ribosomal	255	28.4	5.17
TVAG_298300	XP_001316433.1	Proteína de la familia de dinamina, región central	594	67.3	6.21
TVAG_274750	XP_001322334.1	Proteína G, sub alfa	363	40.3	5.26

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

b) Lista de proteínas nucleares propias de parásitos cultivados en GN

TVAG	No. acceso	Descripción¹	aa	MW [kDa]	pI
TVAG_436840	XP_001581846.1	Proteína de la familia de dinamina, región central	597	66.1	6.28
TVAG_033000	XP_001310857.1	Proteína de la familia con motivos UvrB/uvrC	745	82.5	4.87
TVAG_497930	XP_001304082.1	Proteína de la familia EF hand	153	17.9	4.83
TVAG_487600	XP_001320756.1	Proteína de la familia de enolasa	487	53.5	5.17
TVAG_028010	XP_001324471.1	Proteína de la familia de dinamina, región central	639	71.8	6.24
TVAG_100580	XP_001317958.1	Histona H4-3	101	11.4	11.33
TVAG_263740	XP_001317828.1	Proteína de la familia de enolasa	483	53.2	5.63
TVAG_110540	XP_001581428.1	Poliubiquitina	147	16.7	5.95
TVAG_381870	XP_001313886.1	Proteína de interacción con huntingtina	373	42.5	5.11
TVAG_358110	XP_001318744.1	Proteína de la familia de enolasa	483	52.5	5.91
TVAG_091180	XP_001312581.1	Proteína de la familia EF hand	187	21.6	5.24
TVAG_265950	XP_001313821.1	Proteína ribosomal L32	132	15.2	10.78
TVAG_388670	XP_001326757.1	Proteína que contienen el dominio PCI	435	48.9	5.03
TVAG_249080	XP_001582834.1	Proteína de la familia de Sinaptobrevina	221	25.7	9.25
TVAG_344080	XP_001323537.1	Proteína de la familia de adaptina, región N terminal	739	81.4	6.39
TVAG_176230	XP_001299883.1	Proteína de unión a NSF alfa-soluble	291	32.8	5.10
TVAG_287530	XP_001307548.1	Proteína de la familia de cristalina Hsp20/alfa	109	12.0	8.85
TVAG_083260	XP_001579459.1	Proteína ribosomal L22	164	18.5	9.92
TVAG_470330	XP_001301006.1	Proteína ribosomal L32	133	15.3	10.68
TVAG_128790	XP_001324688.1	Proteína ribosomal	370	40.2	9.98
TVAG_167250	XP_001582336.1	Chaperonina	559	60.0	6.64
TVAG_207570	XP_001313783.1	Proteína ribosomal S19e	148	16.5	10.18
TVAG_225690	XP_001578929.1	14-3-3	225	25.2	8.72
TVAG_440180	XP_001309932.1	snoRNP	177	18.1	10.37
TVAG_459000	XP_001324051.1	Proteína de la familia con repetidos HEAT	584	64.6	5.94
TVAG_182190	XP_001583969.1	Proteína de la familia de coatomero, sub épsilon	276	30.8	4.77

TVAG_136270	XP_001580482.1	Proteína de la familia con repetidos tipo armadillo/beta-catenina	505	54.2	6.96
TVAG_311330	XP_001303435.1	Centrina	160	18.4	4.70
TVAG_251260	XP_001304212.1	14-3-3	238	27.2	4.84
TVAG_292620	XP_001330361.1	Proteína de la familia EF hand	165	19.2	5.50
TVAG_158830	XP_001323879.1	Proteína ribosomal L29	124	14.3	10.39
TVAG_038640	XP_001326979.1	Proteína de la familia de ATPasa tipo V, sub D	246	27.9	8.03
TVAG_044240	XP_001326085.1	Proteína de la familia de adaptina, región N terminal	1006	111.6	5.40
TVAG_459530	XP_001308534.1	Proteína de la familia SNF7	204	22.9	4.67
TVAG_190130	XP_001580105.1	Proteína ribosomal L22-1, 60S	105	12.2	9.60
TVAG_081600	XP_001323811.1	Proteína de la familia con motivos WH2	422	45.8	5.86
TVAG_243080	XP_001299580.1	Proteína de la familia de tioredoxina	357	40.6	8.70
TVAG_002270	XP_001303884.1	Proteína que contiene el dominio de unión a DNA tipo Myb	390	44.8	5.27
TVAG_479680	XP_001307133.1	Proteína de la familia de oxidoreductasa, 2-nitropropano dioxigenasa	318	33.9	9.32
TVAG_350040	XP_001305587.1	Proteína de la familia de dinamina, región central	611	68.1	7.01
TVAG_120180	XP_001276929.1	Proteína que contienen el dominio plectina/S10	141	16.2	9.67
TVAG_301860	XP_001309075.1	Proteína de la familia de EF hand	190	21.5	4.98
TVAG_109300	XP_001322569.1	Proteína de la familia de caseína cinasa II, sub regulatoria	208	24.6	5.12
TVAG_074990	XP_001324893.1	Proteína de la familia de dinamina, región central	636	71.4	6.74
TVAG_476640	XP_001583721.1	Proteína que contiene bromodominio	231	26.3	7.97
TVAG_435990	XP_001310782.1	Proteína que contiene el dominio NAC	138	15.1	8.05
TVAG_256840	XP_001309474.1	14-3-3	224	25.2	4.96
TVAG_212110	XP_001319795.1	Proteína de la familia tctex-1	109	12.4	6.52
TVAG_466650	XP_001307237.1	Proteína ribosomal L5	308	34.8	9.92
TVAG_228400	XP_001580563.1	EB1	298	33.1	5.54
TVAG_266680	XP_001329528.1	EB1	318	35.1	6.65
TVAG_267890	XP_001579742.1	Proteína que contiene bromodominio	228	26.3	6.57
TVAG_455950	XP_001302879.1	Proteína flagelar radial	512	57.7	4.54
TVAG_462940	XP_001579594.1	14-3-3	237	27.1	5.19
TVAG_300550	XP_001317796.1	Proteína rica en prolina	367	41.7	8.40

TVAG_377950	XP_001583302.1	Proteína que contiene bromodominio	322	36.9	7.14
TVAG_197980	XP_001319407.1	Proteína de la familia de cristalina Hsp20/alfa	110	12.0	8.06
TVAG_323830	XP_001313193.1	Proteína que contiene el dominio de unión a DNA tipo Myb	357	40.5	8.28
TVAG_226360	XP_001317046.1	Dominio encontrado en la familia de proteínas IF2B/IF5	405	46.2	4.96
TVAG_256060	XP_001326637.1	Proteína que contiene bromodominio	228	26.7	8.51
TVAG_051110	XP_001321099.1	Proteína que contiene bromodominio	151	17.8	6.68
TVAG_464050	XP_001325494.1	Proteína ribosomal L7Ae	127	13.7	8.69
TVAG_317210	XP_001305593.1	Proteína que contiene el dominio DnaJ	325	35.6	8.27
TVAG_304300	XP_001308830.1	Proteína que contiene bromodominio	192	22.4	7.93
TVAG_269860	XP_001301845.1	Proteína pequeña de unión a GTP	179	19.9	8.05
TVAG_081670	XP_001323818.1	ATPasa, familia AAA	325	35.9	5.83
TVAG_436380	XP_001581800.1	Proteína que contiene bromodominio	164	19.6	9.38
TVAG_473170	XP_001316853.1	Proteína de la familia EF hand	167	19.4	5.43
TVAG_494010	XP_001329594.1	Proteína de la familia con repetidos HEAT	623	69.4	7.30
TVAG_216960	XP_001312904.1	Proteína de inclusión viral tipo A	3748	440.8	4.75
TVAG_371700	XP_001325919.1	Bistina	398	45.2	5.41
TVAG_110530	XP_001581427.1	Proteína ribosomal S10p/S20e	122	13.8	9.58
TVAG_474360	XP_001316453.1	Proteína hipotética	1042	119.0	5.17
TVAG_416640	XP_001317244.1	Proteína hipotética	1104	127.4	5.16
TVAG_416640	XP_001317244.1	Proteína hipotética	1104	127.4	5.16
TVAG_340420	XP_001319087.1	Proteína hipotética	501	57.7	6.25
TVAG_264690	XP_001311350.1	Proteína hipotética	1138	129.7	5.11
TVAG_178230	XP_001580765.1	Proteína hipotética	858	99.9	5.85
TVAG_427270	XP_001306535.1	Proteína hipotética	1015	116.7	5.48
TVAG_062280	XP_001301034.1	Proteína hipotética	510	58.4	5.11
TVAG_451080	XP_001314546.1	Proteína hipotética	878	100.8	5.31
TVAG_567400	XP_001297701.1	Proteína hipotética	512	58.5	4.94
TVAG_199040	XP_001582451.1	Proteína hipotética	263	30.9	7.14
TVAG_045020	XP_001323301.1	Proteína hipotética	425	49.1	6.92
TVAG_484000	XP_001322712.1	Proteína hipotética	349	39.9	8.28

TVAG_291910	XP_001329461.1	Proteína hipotética	327	37.7	9.32
TVAG_318930	XP_001317761.1	Proteína hipotética	454	50.7	8.24
TVAG_229850	XP_001302093.1	Proteína hipotética	1109	127.1	5.78
TVAG_496250	XP_001305521.1	Proteína hipotética	253	28.6	9.45
TVAG_166430	XP_001582254.1	Proteína hipotética	844	95.0	4.83
TVAG_340650	XP_001328394.1	Proteína hipotética	397	44.7	6.29
TVAG_266970	XP_001329557.1	Proteína hipotética	200	23.5	9.58
TVAG_311300	XP_001303432.1	Proteína hipotética	440	50.3	4.26
TVAG_197330	XP_001317655.1	Proteína hipotética	250	29.0	9.80
TVAG_145050	XP_001302327.1	Proteína hipotética	327	37.9	9.31
TVAG_021550	XP_001581194.1	Proteína hipotética	408	46.1	6.13
TVAG_116090	XP_001314794.1	Proteína hipotética	1220	139.0	5.25
TVAG_391680	XP_001581770.1	Proteína hipotética	481	55.9	5.91
TVAG_165330	XP_001328128.1	Proteína hipotética	306	35.4	9.88
TVAG_406070	XP_001327916.1	Proteína hipotética	1003	115.4	5.50
TVAG_133110	XP_001321476.1	Proteína hipotética	569	61.5	5.73
TVAG_251250	XP_001304211.1	Proteína hipotética	248	28.6	8.38
TVAG_250380	XP_001582964.1	Proteína hipotética	734	83.7	4.83
TVAG_167830	XP_001307232.1	Proteína hipotética	246	28.0	6.95
TVAG_256860	XP_001309476.1	Proteína hipotética	390	46.1	5.21
TVAG_283610	XP_001582178.1	Proteína hipotética	1022	118.9	5.00
TVAG_440960	XP_001314940.1	Proteína hipotética	533	59.7	7.94
TVAG_266360	XP_001329496.1	Proteína hipotética	473	54.9	4.98
TVAG_221720	XP_001325042.1	Proteína hipotética	501	57.6	8.06
TVAG_269000	XP_001320597.1	Proteína hipotética	243	27.9	9.39
TVAG_163260	XP_001581616.1	Proteína hipotética	395	45.5	4.87
TVAG_080140	XP_001310684.1	Proteína hipotética	358	41.7	9.11
TVAG_447870	XP_001329051.1	Proteína hipotética	233	25.4	8.85
TVAG_135220	XP_001310399.1	Proteína hipotética	338	39.6	7.97
TVAG_317780	XP_001313422.1	Proteína hipotética	383	44.6	5.02

TVAG_432640	XP_001580654.1	Proteína hipotética	312	34.6	5.22
TVAG_432640	XP_001580654.1	Proteína hipotética	312	34.6	5.22
TVAG_194710	XP_001307315.1	Proteína hipotética	578	65.9	6.10
TVAG_441340	XP_001309350.1	Proteína hipotética	1001	115.6	5.71
TVAG_190560	XP_001580146.1	Proteína hipotética	192	22.3	8.62
TVAG_386160	XP_001305122.1	Proteína hipotética	371	42.9	4.74
TVAG_190040	XP_001580099.1	Proteína hipotética	317	35.1	5.72
TVAG_366350	XP_001581113.1	Proteína hipotética	923	95.9	9.66
TVAG_379120	XP_001583419.1	Proteína hipotética	238	27.7	6.54
TVAG_199230	XP_001582470.1	Proteína hipotética	162	18.2	10.29
TVAG_247850	XP_001294080.1	Proteína hipotética	272	30.6	4.98
TVAG_447580	XP_001329022.1	Proteína hipotética	170	18.7	10.21
TVAG_434310	XP_001328817.1	Proteína hipotética	318	36.4	9.35
TVAG_257660	XP_001313141.1	Proteína hipotética	1007	117.6	5.47
TVAG_438000	XP_001310351.1	Proteína hipotética	473	54.1	8.98
TVAG_444210	XP_001325361.1	Proteína hipotética	403	45.3	5.29
TVAG_257010	XP_001302551.1	Proteína hipotética	155	17.7	8.53
TVAG_330860	XP_001295926.1	Proteína hipotética	461	54.7	9.22
TVAG_262750	XP_001305213.1	Proteína hipotética	433	48.9	6.61
TVAG_111510	XP_001330420.1	Proteína hipotética	115	12.6	9.79
TVAG_140050	XP_001312436.1	Proteína hipotética	528	60.7	9.20
TVAG_092780	XP_001304622.1	Proteína hipotética	379	43.5	8.46
TVAG_297170	XP_001329261.1	Proteína hipotética	554	62.8	5.88
TVAG_238120	XP_001582772.1	Proteína hipotética	176	20.7	7.71
TVAG_127260	XP_001323442.1	Proteína hipotética	381	44.1	5.12
TVAG_267140	XP_001312875.1	Proteína hipotética	330	37.5	5.50
TVAG_493040	XP_001313860.1	Proteína hipotética	254	29.1	7.83
TVAG_246580	XP_001579966.1	Proteína hipotética	371	43.0	5.10
TVAG_322780	XP_001318881.1	Proteína hipotética	236	26.9	7.85
TVAG_080900	XP_001317721.1	Proteína hipotética	822	93.8	5.53

TVAG_395640	XP_001303448.1	Proteína hipotética	481	55.7	5.15
TVAG_238980	XP_001581512.1	Proteína hipotética	701	79.4	5.30
TVAG_010060	XP_001311161.1	Proteína hipotética	420	46.8	6.67
TVAG_163390	XP_001581629.1	Proteína hipotética	126	14.6	5.21
TVAG_098230	XP_001321910.1	Proteína hipotética	426	49.7	5.99
TVAG_317690	XP_001313413.1	Proteína hipotética	681	78.8	5.24
TVAG_491310	XP_001326215.1	Proteína hipotética	385	43.5	6.92
TVAG_311560	XP_001319254.1	Proteína hipotética	311	35.6	5.07
TVAG_052080	XP_001313089.1	Proteína hipotética	406	46.9	4.42
TVAG_468300	XP_001326037.1	Proteína hipotética	326	37.2	7.87
TVAG_026160	XP_001326518.1	Proteína hipotética	130	14.3	7.85
TVAG_450670	XP_001315717.1	Proteína hipotética	1031	119.1	5.39
TVAG_113570	XP_001578999.1	Proteína hipotética	374	43.6	5.47
TVAG_186560	XP_001584334.1	Proteína hipotética	581	66.0	6.18
TVAG_128680	XP_001324677.1	Proteína hipotética	284	32.6	4.92
TVAG_184000	XP_001584149.1	Proteína hipotética	730	83.2	6.39
TVAG_296740	XP_001304272.1	Proteína hipotética	437	49.9	5.83
TVAG_139970	XP_001312429.1	Proteína hipotética	482	55.9	5.97
TVAG_216370	XP_001317884.1	Proteína hipotética	303	35.8	6.61
TVAG_302800	XP_001306070.1	Proteína hipotética	699	79.9	7.33
TVAG_147050	XP_001579947.1	Proteína hipotética	370	41.0	6.84
TVAG_083250	XP_001579458.1	Proteína hipotética	435	49.4	8.72
TVAG_116170	XP_001330699.1	Proteína hipotética	284	32.0	6.33
TVAG_180570	XP_001321305.1	Proteína hipotética	5481	613.2	6.06
TVAG_055250	XP_001316262.1	Proteína hipotética	485	55.6	6.34
TVAG_460690	XP_001326875.1	Proteína hipotética	619	71.0	8.03
TVAG_104520	XP_001312501.1	Proteína hipotética	380	43.5	9.11
TVAG_483080	XP_001310981.1	Proteína hipotética	251	28.2	6.19
TVAG_403340	XP_001311582.1	Proteína hipotética	284	31.6	5.90
TVAG_149360	XP_001318673.1	Proteína hipotética	290	32.8	5.92

TVAG_211910	XP_001319775.1	Proteína hipotética	660	75.5	8.63
TVAG_010020	XP_001311157.1	Proteína hipotética	241	25.9	9.69
TVAG_410690	XP_001304486.1	Proteína hipotética	494	54.7	8.05
TVAG_409150	XP_001301493.1	Proteína hipotética	324	36.0	7.77
TVAG_255760	XP_001326607.1	Proteína hipotética	319	36.6	5.19
TVAG_093810	XP_001583193.1	Proteína hipotética	228	25.4	5.07
TVAG_195920	XP_001316222.1	Proteína hipotética	454	52.6	4.83
TVAG_414400	XP_001309889.1	Proteína hipotética	259	29.2	5.07
TVAG_454320	XP_001316016.1	Proteína hipotética	889	101.8	5.62
TVAG_486780	XP_001326458.1	Proteína hipotética	492	55.6	7.27
TVAG_347400	XP_001306383.1	Proteína hipotética	543	63.1	4.60
TVAG_122230	XP_001579143.1	Proteína hipotética	280	30.9	5.97
TVAG_182530	XP_001584003.1	Proteína hipotética	520	59.4	6.61
TVAG_187940	XP_001327966.1	Proteína hipotética	876	101.0	5.11
TVAG_030170	XP_001304048.1	Proteína hipotética	193	21.8	5.96
TVAG_004210	XP_001304511.1	Proteína hipotética	1504	175.0	7.01
TVAG_193290	XP_001581339.1	Proteína hipotética	516	58.1	5.40
TVAG_222640	XP_001312833.1	Proteína hipotética	179	20.6	5.76
TVAG_499770	XP_001319712.1	Proteína hipotética	232	26.8	6.58
TVAG_040460	XP_001313993.1	Proteína hipotética	866	100.4	5.08
TVAG_135000	XP_001307523.1	Proteína hipotética	224	26.2	6.65
TVAG_075540	XP_001583793.1	Proteína hipotética	521	59.2	5.41
TVAG_480880	XP_001311642.1	Proteína hipotética	983	113.1	5.58
TVAG_113250	XP_001578967.1	Proteína hipotética	216	24.4	6.29
TVAG_050350	XP_001319443.1	Proteína hipotética	875	99.8	6.28
TVAG_449230	XP_001308319.1	Proteína hipotética	795	90.8	5.30
TVAG_119930	XP_001276904.1	Proteína hipotética	417	48.0	4.93
TVAG_067830	XP_001318346.1	Proteína hipotética	425	49.4	6.05
TVAG_252430	XP_001327653.1	Proteína hipotética	327	38.0	6.16
TVAG_283270	XP_001582143.1	Proteína hipotética	262	30.7	9.41

TVAG_150120	XP_001329084.1	Proteína hipotética	386	45.0	9.70
TVAG_249840	XP_001582910.1	Proteína hipotética	215	24.6	8.48
TVAG_212410	XP_001325282.1	Proteína hipotética	293	32.0	6.83
TVAG_253730	XP_001579247.1	Proteína hipotética	259	30.1	5.52
TVAG_234200	XP_001303257.1	Proteína hipotética	243	28.3	5.44
TVAG_026760	XP_001326578.1	Proteína hipotética	717	79.0	5.80
TVAG_440190	XP_001309933.1	Proteína hipotética	515	58.0	5.50
TVAG_426790	XP_001326708.1	Proteína hipotética	629	70.1	5.50
TVAG_071910	XP_001584513.1	Proteína hipotética	473	54.5	4.93
TVAG_168910	XP_001315112.1	Proteína hipotética	203	23.1	8.82
TVAG_395340	XP_001314094.1	Proteína hipotética	411	46.1	5.30
TVAG_304540	XP_001313742.1	Proteína hipotética	281	32.5	5.45
TVAG_431730	XP_001302280.1	Proteína hipotética	394	45.1	4.87

[†][*Trichomonas vaginalis* G3]

c) Lista de proteínas nucleares propias de parásitos cultivados en AH

TVAG	No. Acceso	Descripción¹	aa	MW [kDa]	pI
TVAG_047890	XP_001330450.1	Proteína hipotética	309	32.6	9.44
TVAG_395550	XP_001330176.1	Proteína hipotética	523	57.2	8.79
TVAG_366380	XP_001581116.1	Proteína hipotética	361	39.2	7.84
TVAG_412780	XP_001298944.1	Proteína hipotética	361	39.2	7.62
TVAG_006020	XP_001323750.1	Proteína hipotética	347	40.0	5.03
TVAG_339450	XP_001311558.1	Proteína hipotética	977	110.9	5.25
TVAG_365950	XP_001581073.1	Proteína hipotética	512	58.9	6.64
TVAG_043470	XP_001315624.1	Proteína hipotética	202	23.2	10.27
TVAG_081640	XP_001323815.1	Proteína hipotética	130	14.0	9.19
TVAG_433060	XP_001580696.1	Proteína hipotética	923	106.9	5.47
TVAG_210380	XP_001327731.1	Proteína hipotética	190	21.1	11.21
TVAG_125550	XP_001311341.1	Proteína hipotética	415	46.7	10.24
TVAG_529190	XP_001296407.1	Proteína hipotética, parcial	1088	122.4	6.47
TVAG_259540	XP_001298508.1	Proteína hipotética	185	21.7	10.27
TVAG_181630	XP_001298524.1	Proteína hipotética	135	15.6	5.95
TVAG_409860	XP_001311778.1	Proteína hipotética	734	81.3	6.11
TVAG_382870	XP_001307832.1	Proteína hipotética	489	55.7	6.48
TVAG_206300	XP_001325685.1	Proteína hipotética	197	22.1	10.33
TVAG_377870	XP_001583294.1	Proteína hipotética	304	36.2	9.60
TVAG_056140	XP_001318843.1	Proteína hipotética	206	23.8	4.91
TVAG_317280	XP_001305600.1	Proteína hipotética	139	16.1	4.56
TVAG_143790	XP_001300997.1	Proteína hipotética	151	17.0	10.18

TVAG_344720	XP_001303968.1	Proteína hipotética	200	22.4	10.08
TVAG_192570	XP_001581267.1	Proteína hipotética	493	56.5	5.07
TVAG_443950	XP_001325335.1	Proteína hipotética	483	57.2	7.02
TVAG_393390	XP_001326835.1	Proteína hipotética	563	64.0	5.30
TVAG_328600	XP_001313027.1	Proteína hipotética	1729	199.4	6.15
TVAG_420260	XP_001321627.1	Proteína hipotética	610	67.9	5.26
TVAG_152530	XP_001306095.1	Proteína hipotética	108	12.4	8.50
TVAG_267870	XP_001579740.1	Malato deshidrogenasa	567	63.1	8.09
TVAG_183790	XP_001584128.1	Adhesina AP65-3	567	63.1	8.32
TVAG_230580	XP_001321321.1	Piruvato:ferredoxina oxidoreductasa BI	1157	127.9	7.97
TVAG_198110	XP_001582360.1	Piruvato:ferredoxina oxidoreductasa A	1157	127.9	8.03
TVAG_242960	XP_001311861.1	pyruvato:ferredoxina oxidoreductasa BII	1157	128.0	7.93
TVAG_318670	XP_001300482.1	Adhesina AP33-1	309	32.4	9.44
TVAG_144730	XP_001303981.1	Adhesina AP51-2	409	43.8	7.44
TVAG_259190	XP_001322061.1	Succinil-CoA ligasa, cadena beta, precursor hidrogenosomal	407	43.8	7.01
TVAG_036010	XP_001583562.1	Oxígeno reductasa hidrogenosomal	417	46.4	7.85
TVAG_239320	XP_001581544.1	Histona H4-3	101	11.4	11.33
TVAG_158990	XP_001323895.1	Proteína de unión a RNA	189	21.1	10.30
TVAG_067400	XP_001328958.1	Factor de elongación alfa 1	437	48.3	8.63
TVAG_512800	XP_001281986.1	Actina, parcial	360	40.2	5.49
TVAG_239330	XP_001581545.1	Histona H3-1	138	15.5	11.25
TVAG_264700	XP_001311351.1	Poliubiquitina	229	26.0	6.57
TVAG_157940	XP_001310739.1	Proteína de la familia de 4-alfa-glucanotransferasa	932	109.0	6.13
TVAG_164550	XP_001325568.1	Proteína ribosomal	370	40.3	9.98

TVAG_087830	XP_001299817.1	Histona H3-1	138	15.5	11.25
TVAG_154680	XP_001313895.1	Proteína de la familia de 4-alfa-glucanotransferasa	930	108.7	6.02
TVAG_075320	XP_001309656.1	Proteína de la familia de ATPasas tipo V, sub 116kDa	797	91.5	6.24
TVAG_190450	XP_001580136.1	Alfa-actinina	931	106.2	5.02
TVAG_366360	XP_001581114.1	Proteína de la familia de lectinas con repetidos QXW	246	28.4	8.35
TVAG_112230	XP_001300910.1	Proteína ribosomal L13e	189	21.8	10.65
TVAG_490240	XP_001314140.1	Proteína ribosomal L5	308	34.8	9.92
TVAG_239660	XP_001320829.1	Proteína tipo IscS/NifS	411	44.8	8.21
TVAG_344700	XP_001303966.1	Proteína ribosomal L10	317	34.3	6.65
TVAG_239310	XP_001581543.1	Actinina	1129	127.8	5.00
TVAG_254840	XP_001314806.1	Proteína ribosomal L12, 60S	160	17.1	9.77
VAG_497260	XP_001320325.1	Proteína de la familia de dineina, cadena pesada	4493	512.3	5.63
TVAG_005910	XP_001323739.1	Proteína ribosomal L8	251	26.9	10.49
TVAG_293770	XP_001307577.1	Proteína de la familia de fosfofructocinasa	326	34.6	8.10
TVAG_379260	XP_001583433.1	Proteína ribosomal S4-C, 40S	255	28.6	9.91
TVAG_231250	XP_001313714.1	Proteína ribosomal L21e	159	17.9	11.02
TVAG_268050	XP_001579758.1	Fosfoglicerato cinasa	419	45.3	7.06
TVAG_198680	XP_001582415.1	Proteína ribosomal S7, 40S	167	18.6	9.55
TVAG_074610	XP_001324856.1	Proteína ribosomal	209	23.8	10.33
TVAG_199100	XP_001582457.1	Proteína ribosomal S7, 40S	186	20.8	9.52
TVAG_038880	XP_001324264.1	Topoisomerasa II	1458	166.9	6.39
TVAG_177920	XP_001580734.1	Proteína ribosomal S16, 40S	140	15.6	9.91
TVAG_136250	XP_001580480.1	Proteína de la familia de ATPasas tipo V	174	17.9	7.24
TVAG_064490	XP_001320125.1	Rubreritrina	191	21.3	7.99
TVAG_051820	XP_001308200.1	Transportador mitocondrial	401	44.6	9.66

TVAG_193640	XP_001315517.1	Proteína que contiene el dominio SNF2, N-terminal	1579	180.9	5.20
TVAG_276360	XP_001321786.1	Proteína ribosomal L15-1, 60S	204	24.3	11.24
TVAG_322590	XP_001318862.1	Proteína de la familia con repetidos tipo armadillo/beta-catenina	776	86.7	5.35
TVAG_185180	XP_001584198.1	Proteína ribosomal L19-3, 60S	178	21.0	11.74
TVAG_189070	XP_001313620.1	Proteína ribosomal L27e	139	15.9	9.99
TVAG_113600	XP_001579002.1	RNA polimerasa Rpb5, N-terminal	202	23.4	6.55
TVAG_360700	XP_001307153.1	Fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa	328	36.2	6.30
TVAG_371230	XP_001302992.1	Proteína poli embrionica	426	47.9	8.56
TVAG_462920	XP_001579592.1	Proteína de la familia de fosfofructocinasa	324	34.5	8.16
TVAG_318710	XP_001294322.1	Proteína ribosomal L6	197	22.8	7.91
TVAG_002360	XP_001299861.1	Proteína de la familia de linker histona H1 y H5	302	35.4	9.73
TVAG_371980	XP_001325947.1	Proteína que contiene el dominio de unión SnoRNA	569	63.6	6.95
TVAG_037570	XP_001310180.1	Hierro hidrogenasa 64kDa	591	65.0	7.71
TVAG_371250	XP_001302994.1	Proteína ribosomal S24e	140	16.0	10.61
TVAG_358260	XP_001318759.1	Factor de transcripción 2B	192	22.8	8.82
TVAG_282960	XP_001582112.1	Proteína ribosomal S6e	216	24.5	10.37
TVAG_035230	XP_001583486.1	Proteína de la familia con repetidos tipo armadillo/beta-catenina	506	55.1	6.01
TVAG_044510	XP_001314691.1	HSP70 citoplásmica	659	71.2	5.40
TVAG_310050	XP_001318941.1	TvhydB	404	44.7	9.17
TVAG_224750	XP_001327622.1	Proteína ribosomal L23	140	15.6	10.21
TVAG_237220	XP_001582682.1	Proteína ribosomal L24	138	15.7	10.46
TVAG_473790	XP_001317423.1	Proteína de la familia B-box dedo de zinc	685	77.2	5.91
TVAG_212800	XP_001325321.1	Metalopeptidasa, Clan MG, familia M24	967	109.1	5.40

TVAG_179860	XP_001313244.1	RNA helicasa p47 dependiente de ATP	420	47.5	6.23
TVAG_402510	XP_001580982.1	Proteína ribosomal acídica P1, 60S	105	11.0	4.32
TVAG_030160	XP_001304047.1	MGC78960	605	65.6	6.93
TVAG_421580	XP_001305564.1	Adaptina mu	426	48.9	6.37
TVAG_313290	XP_001300556.1	Proteína ribosomal L32	132	15.3	10.81
TVAG_485580	XP_001302514.1	Proteína que contiene el dominio C2	1284	144.1	6.11
TVAG_153560	XP_001317545.1	Proteína de choque térmico	720	83.6	5.02
TVAG_142060	XP_001303592.1	Proteína ribosomal S3Ae	247	28.1	9.45
TVAG_398430	XP_001304932.1	Proteína que contiene el dominio C2	287	33.1	8.48
TVAG_272760	XP_001330332.1	Proteína de la familia de dihidrolipoamida deshidrogenasa	471	50.2	8.56
TVAG_006480	XP_001323796.1	Proteína de la familia de dineina, cadena pesada	4660	529.9	6.04

¹[*Trichomonas vaginalis* G3]

7. Soluciones

▪ Solución de acrilamida al 30%

Acrilamida	29.2 g
Bisacrilamida	0.8 g

Disolver en H₂O destilada en un volumen menor a 100 ml y posteriormente aforar a 100 ml. Almacenar a 4°C cubierta de la luz por no más de 30 días.

▪ Amortiguador de electroforesis SDS-PAGE 10x

Tris base	30.2 g
Glicina	144 g
SDS	10 g

Disolver en H₂O destilada y llevar a un volumen final de 1L. Almacenar a TA.

▪ Amortiguador de transferencia

Tris base	6.06 g
Glicina	28.83 g
Metanol	400 ml

Disolver en H₂O destilada y llevar a un volumen final de 2L. Almacenar a 4°C cubierto de la luz.

▪ Amortiguador Salino de Fosfatos (PBS) pH 7.0

NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	0.65 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g

Disolver en H₂O destilada en un volumen menor a 1L, ajustar el pH a 7.0 con una solución de HCl o con una solución de NaOH y esterilizar por autoclave. Almacenar a TA.

▪ Amortiguador Tris-HCl/SDS pH 6.8

Tris Base	6.05 g
SDS	0.4 g

Disolver en H₂O destilada en un volumen menor a 100 ml, ajustar el pH a 6.8 con una solución de HCl, aforar a 100 ml y pasar la solución por un filtro de 0.45 µm. Almacenar a 4°C.

▪ **Amortiguador Tris-HCl/SDS pH 8.8**

Tris Base 18.2 g

SDS 0.33 g

Disolver en H₂O destilada en un volumen menor a 100 ml, ajustar pH a 8.8 con una solución de HCl, aforar a 100 ml y pasar por un filtro de 0.45 µm. Almacenar a 4°C.

▪ **Amortiguador de muestra 2x**

Tris Base 1.52 g

SDS 2.0 g

Disolver en 50 ml de H₂O destilada, ajustar el pH a 6.8 con una solución de HCl y adicionar:

Glicerol 20 ml

Aforar a un volumen de 100 ml. Almacenar a TA.

▪ **Persulfato de amonio al 10%**

(NH₄)₂S₂O₈ 0.1 g

Disolver en 1 ml de H₂O destilada. Almacenar en alícuotas a -20°C.

▪ **Solución de glucosa 1 M**

Glucosa 1.8 g

Disolver en PBS pH 7.0 en un volumen menor a 10 ml, aforar a 10 ml y esterilizar por filtración (0.22 µm). Almacenar a 4°C por no más de dos semanas.

▪ **Solución de sulfato ferroso amoniacal 25 mM**

Ácido sulfosalicílico 127 mg

Disolver en 8 ml de H₂O MilliQ y añadir:

Sulfato ferroso amoniacal hexahidratado 98 mg

Disolver, aforar a 10 ml y esterilizar por autoclave. Almacenar cubierto de la luz a 4°C por no más de dos semanas.

- **Solución de 2-2',dipiridilo 15 mM**

2-2',dipiridilo	23.4 mg
-----------------	---------

Disolver en H₂O MilliQ en un volumen menor a 10 ml, aforar a 10 ml y esterilizar por filtración (0.22 µm). Almacenar cubierto de la luz a 4°C por no más de dos semanas.

- **Amortiguador Tris Salino (TBS) pH 7.6 10x**

Tris Base	24 g
-----------	------

NaCl	88 g
------	------

Disolver en H₂O destilada en un volumen menor a 1L, llevar a un volumen final de 1L. Almacenar a TA.

- **Solución decolorante para geles de poliacrilamida**

Ácido acético	35 ml
---------------	-------

Metanol	25 ml
---------	-------

Llevar a un volumen final de 500 ml. Almacenar a TA cubierto de la luz.

- **PBS-albúmina 1%**

Albúmina	0.5 g
----------	-------

Disolver en PBS pH 7.0 filtrado y llevar a un volumen de 50 ml. Almacenar a 4°C.

- **Triton X-100 0.07% en PBS**

Triton X-100	7 µl
--------------	------

Disolver en PBS pH 7.0 filtrado y llevar a un volumen final de 10 ml. Almacenar a TA.

- **PBS-glicina 0.5 M**

Glicina	1.88 g
---------	--------

Disolver en PBS pH 7.0 filtrado en un volumen menor a 50 ml y aforar a 50 ml. Almacenar a 4°C.

- **PBS-suero fetal bovino 1%**

SFB	100 µl
-----	--------

Llevar a un volumen final de 10 ml en PBS pH 7.0 filtrado.

▪ **Formaldehído 4%**

Formaldehído al 37% 1.082 ml

Llevar a un volumen de 10 ml en PBS pH 7.0 filtrado. Almacenar a TA.

▪ **Amortiguador de equilibrio I**

Urea 3.6 g

Tris-HCl 1M pH 8.8 3.75 ml

SDS 0.2 g

Glicerol al 85% 2.35 ml

DTT 0.2 g

Disolver a 30°C y aforar a 10 ml con H₂O MilliQ.

▪ **Buffer de equilibrio II**

Urea 3.6 g

Tris-HCl 1M pH 8.8 3.75 ml

SDS 0.2 g

Glicerol al 85% 2.35 ml

Iodoacetamida 0.25 g

Disolver a 30°C y aforar a 10 ml con H₂O MilliQ.

▪ **Solución de Triton X-100 al 2.5%**

Triton X-100 2.5 ml

Disolver en H₂O destilada y llevar a un volumen final de 100 ml.

▪ **Solución de azul de Coomassie 0.05%**

Metanol 500 ml

Ácido acético 100 ml

H₂O destilada 400 ml

Azul brillante de Coomassie R 250 0.5 g

Disolver durante toda la noche cubierto de la luz. Filtrar con papel Whatman No. 1. Almacenar a TA cubierto de la luz.

▪ **Solución de sulfato de cobre 1 M**

CuSO₄ • 5H₂O 2.5 g

Disolver en H₂O MilliQ en un volumen menor a 10 ml y aforar a 10 ml. Almacenar cubierto de la luz.

- **Amortiguador de acetato de sodio 50 mM pH 4.5**

Acetato de sodio trihidratado 0.68 g

Disolver en 50 ml de H₂O destilada, ajustar el pH a 4.5 con ácido acético glacial y aforar a un volumen de 100 ml. Almacenar a TA cubierto de la luz.

- **Amortiguador fosfato de sodio 50 mM pH 7.0**

Na₂HPO₄ • 12H₂O 1.03 g

NaH₂PO₄ • H₂O 0.29 g

Disolver en H₂O destilada en un volumen menor a 100 ml, ajustar el pH a 7.0 con ácido fosfórico o con una solución de NaOH.

- **Amortiguador EB**

HEPES 10 mM pH 7.5

KCl 40 mM

MgCl₂ 3 mM

Glicerol 5%

Nonidet P-40 0.5%

100 µl HEPES 1M pH 7.5

400 µl KCl 1M

75 µl MgCl₂ 0.4M

588 µl glicerol al 85 %

50 µl

8.787 ml H₂O destilada

Volumen final: 10 ml

- **Amortiguador RN**

HEPES 25 mM pH 7.5

KCl 400 mM

MgCl₂ 3 mM

EDTA 0.2 mM

DTT 5 mM

Glicerol 25%

25 µl HEPES 1M pH 7.5

400 µl KCl 0.4 M

7.5 µl MgCl₂ 0.4M

0.4 µl EDTA 0.5 M

5 µl DTT 1M

294 µl glicerol al 85%

268.1 µl H₂O destilada

Volumen final: 1 ml