

# Euceda Padilla Esly Alejandra.pdf

## Resumen de fuentes

3%

SIMILITUD GENERAL

1	creativecommons.org INTERNET	<1%
2	docplayer.es INTERNET	<1%
3	Rafael Pazinato, Gustavo Machado, Vanderlei Klauck, Willian M. Radavelli et al. "Influencia de la infección subclínica por agentes de la fi... CROSSREF	<1%
4	revistasmedicasmexicanas.com.mx INTERNET	<1%
5	eprints.ucm.es INTERNET	<1%
6	eprints.uanl.mx INTERNET	<1%
7	www.researchgate.net INTERNET	<1%
8	Ariel Alejandro Koval, Bibiana Felicitas Brihuega, Sylvia Grune Loffler, S. López et al. "Primer aislamiento de Leptospira borgpetersenii se... CROSSREF	<1%
9	www.mcponline.org INTERNET	<1%
10	www.google.com.mx INTERNET	<1%
11	Fernando Lledías, Jesús Gutiérrez, Aída Martínez-Hernández, Abisaí García-Mendoza et al. "Mayahuelin, a Type I Ribosome Inactivating ... CROSSREF	<1%
12	es.slideshare.net INTERNET	<1%
13	rmf.smf.org.mx INTERNET	<1%
14	Tamara Posse, Monica Prieto, Lucia Cipolla, Sara Kaufman. "Bacteriemia por Mycoplasma hominis : un agente etiológico subestimado",... CROSSREF	<1%

15	doczz.net INTERNET	<1%
16	www.frontiersin.org INTERNET	<1%
17	dspace.utpl.edu.ec INTERNET	<1%
18	ijastnet.com INTERNET	<1%
19	repositorio.usfq.edu.ec INTERNET	<1%
20	www.quepleno.com INTERNET	<1%
21	es.scribd.com INTERNET	<1%
22	patents.google.com INTERNET	<1%
23	repositorio.ufscar.br INTERNET	<1%
24	www.ameca.cu INTERNET	<1%
25	www.cosademujeres.cl INTERNET	<1%
26	www.elsevier.es INTERNET	<1%
27	www.hindawi.com INTERNET	<1%
28	www.scribd.com INTERNET	<1%
29	www.worcestercoop.org INTERNET	<1%

**Se excluyeron los depósitos de búsqueda:**

- Trabajos entregados

**Excluido del Informe de Similitud:**

- Bibliografía
- Citas
- Coincidencias menores (10 palabras o menos)

**Se excluyeron las fuentes:**

- Ninguno





<sup>12</sup> **CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR**

**"Impacto de la simbiosis entre *Mycoplasma hominis* y *Trichomonas vaginalis* en la citotoxicidad dependiente de cisteína proteinasas y del inhibidor endógeno TC-3"**

Tesis que presenta

**Eslly Alejandra Euceda Padilla**

<sup>21</sup> **Para obtener el grado de**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

En

**INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR**

Directora de tesis:

**Dra. Rossana Arroyo Verástegui**

Ciudad de México

Julio, 2019



Asesores:

**Dra. Bibiana Chávez Munguía**

Departamento de infectómica y patogénesis molecular, CINVESTAV.

**Dra. María Lilia Cedillo Ramírez**

**18** Centro de detección biomolecular, Vicerrectoría de investigación y estudios de posgrado, BUAP.



## Dedicatoria

Cuando persigues un sueño existen momentos en los que debes tomar decisiones que repercutirán en tu vida para siempre, a veces debes separarte de lo que amas para alcanzar tus metas. Salir de mi país y dejar a mi familia y amigos fue una de las decisiones más difíciles, que solo pude tomar por todo el apoyo que me han brindado, porque no importa si a veces es difícil estar lejos, el amor no conoce distancia. Todo este trabajo está dedicado a ellos, que me mantienen fuerte y consiente de que debo seguir mi corazón y llenarme de experiencias que enriquezcan mi vida personal y profesional.

Sepan que aun en la lejanía puedo sentirlos y los amo a todos.





## **Agradecimientos**

Agradezco al **CONACyT** por su apoyo con la beca otorgada en estos dos años, con el número de becario 636912.

Agradezco al **CINVESTAV** por una institución de calidad que me permitió crecer como profesional.

Agradezco a la **Dra. Rossana Arroyo** por brindarme todo su apoyo y conocimiento y por su constante guía que me permitió crecer profesionalmente.

Agradezco a mis asesoras, la **Dra. Bibiana Chávez Munguía** y a la **Dra. María Lilia Cedillo Ramírez** por su apoyo y consejos a lo largo de este proyecto.

Agradezco a la **QFB. Leticia Ávila** por transmitirme todo su conocimiento, por su apoyo y paciencia en los experimentos.

Agradezco a **Luis Alberto Rivera Rivas** por su amistad, sinceridad y todo su apoyo a lo largo de este año en el laboratorio, por ser mi sensei que por más que me costara aprender, allí estaba con toda su paciencia para que entendiera el porqué de las cosas.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio **Sarahí Rodríguez, Sebastián Benito** y **Jesús Miranda Ozuna** por siempre apoyarme en todos mis relajos en el laboratorio y por su compañía amena.

A lo largo de este viaje de dos años he podido conocer a muchas personas que me han cambiado, nuevos amigos que se quedarán para siempre conmigo. Conocerlos fue lo mejor de mi estancia aquí en México y no podría haber pedido mejores amigos que ustedes, gracias por apoyarme en las buenas y en las malas, por ser parte de mi vida, de mis alegrías, preocupaciones y tristezas. Mi corazón está con ustedes y saben que para mí son mi familia en México. **Adrián Gonzales, Carlos Cordero, Gabriela Morgan, Axel Soto, Gabriela Cáliz, Luis Rivera, Alejandro Almazán, Alonso Cruz, Iris Acatitla, Juan Ortiz, Jesús Letengena, Diana Albáñil.**



## Índice general

17	Índice de figuras .....	vii
	Lista de abreviaturas.....	viii
	Resumen .....	1
	Abstract .....	2
	Introducción .....	3
	<i>Trichomonas vaginalis</i> .....	3
	Epidemiología.....	4
	Manifestaciones clínicas y patología.....	4
	Patogenia .....	5
	Cisteína proteinasas de <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	6
	Inhibidores endógenos de CPs en <i>T. vaginalis</i> .....	7
	<i>Mycoplasma hominis</i> .....	8
	Epidemiología.....	9
	Manifestaciones clínicas y patología.....	9
	Patogenia .....	10
	Relaciones simbióticas en la naturaleza .....	10
	Simbiosis en <i>T. vaginalis</i> .....	11
	Simbiosis entre <i>T. vaginalis</i> y <i>M. hominis</i> .....	11
	Planteamiento del problema .....	12
	Antecedentes.....	13
	Generales.....	13
	Específicos.....	14
	Justificación .....	15
	Hipótesis.....	16
2	Objetivos.....	16
	Objetivo general .....	16
	Objetivos específicos.....	16
	Estrategia experimental .....	17
	Materiales y métodos .....	18
	Aislado de <i>Trichomonas vaginalis</i> y cultivo celular .....	18
	Curva de crecimiento de <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	18



Curación de <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	19
Obtención de proteína para electroforesis 1-DE.....	19
Western blot.....	19
Extracción de DNA genómico para TVV.....	19
PCR multiplex.....	20
Secuenciación de 16S de Mh y $\beta$ -tubulina de Tv.....	20
RT-PCR.....	20
Actividad proteolítica total de CPs.....	21
Zimogramas.....	21
Ensayo de citotoxicidad.....	22
Colocalización por inmunofluorescencia indirecta.....	22
Tinción de DNA extranuclear.....	22
Microscopía electrónica de transmisión (MET).....	23
Resultados.....	23
El aislado CNCD 280 de <i>T. vaginalis</i> se encuentra infectado con <i>M. hominis</i> y TVV.....	23
Curación del aislado CNCD 280 Tv/Mh (+).....	29
El aislado CNCD 280 Tv/Mh (+) sufre cambios morfológicos después de la curación.....	33
Las proteasas TvCP2 y TvCP3 y el inhibidor endógeno TC-3 modifican su localización y expresión después de la curación.....	36
El aislado Tv/Mh (+) exagera su patogenicidad después de la eliminación de <i>M. hominis</i> .....	45
El aislado Tv/Mh (-) es más patogénico que el aislado Tv/Mh (+).....	48
Discusión.....	51
Conclusiones.....	56
Perspectivas.....	61
Bibliografía.....	62
Anexos.....	72



## Índice de figuras

Figura 1. El aislado CNCND 280 de <i>T. vaginalis</i> está infectado con <i>M. hominis</i> .....	25
Figura 2. <i>M. hominis</i> el aislado Tv/Mh (+) se encuentra en vacuolas autofágicas .....	28
Figura 3. Curación de CNCND 280 Tv/Mh (+) .....	30
Figura 4. Patrón del DNA genómico de diferentes aislados de Tv .....	31
Figura 5. Curva de crecimiento de 24 horas de Tv/Mh (+) y Tv/Mh (-) .....	34
Figura 6. Tv/Mh (-) está más vacuolado que Tv/Mh (+) .....	35
Figura 7. El inhibidor endógeno TC-3 cambia su expresión a nivel de RNA, pero no a nivel proteico .....	37
Figura 8. La proteasa TvCP2 cambia su expresión y localización en el aislado Tv/Mh (-) .....	39
Figura 9. La proteasa TvCP3 cambia su expresión, localización y su colocalización con TC3 en el aislado Tv/Mh (-) .....	42
Figura 10. El aislado Tv/Mh (-) es más activo proteolíticamente que el Tv/Mh (+) .....	46
Figura 11. Tv/Mh (-) es más citotóxico que Tv/Mh (+) cuando interactúan con células HeLa .....	49





**Lista de abreviaturas**

ADH: Dihidrolasa de arginina	LPG: Lipofosfoglicano
AP: Proteína de adherencia	MET: Microscopia electrónica de transmisión
ATP: Adenosin Trifosfato	Mh: <i>Mycoplasma hominis</i>
CDC: Centers for Disease Control and Prevention	PI: preinmune
CP: Cisteína proteinasas	PRE: Extracto resistente a proteasa
CTB: "Cell Tracker Blue"	TA: Temperatura ambiente
CTS: Community state type	TC: Tricocistatina
F: Fluorescencia	TCA: Ácido tricloroacético
HeLa: células de cáncer de cérvix	TNF $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa
HIBS: Suero bovino inactivado por calor	Tv: <i>Trichomonas vaginalis</i>
HIV: Virus de la Inmunodeficiencia Humana	TvCP: <i>Trichomonas vaginalis</i> cisteína proteinasa
hVECs: Células del epitelio vaginal humano	TvLEGU-1: <i>Trichomonas vaginalis</i> legumaina-like-1
IFI: Inmunofluorescencia indirecta	TYM: Medio de cultivo tripticasa extracto de levadura-maltosa
IL: Interleucina	WHO: Organización Mundial de la Salud
ITS: Infección de transmisión sexual	



## 6 Resumen

*Trichomonas vaginalis* (Tv) es el agente causal de la tricomoniasis, la ITS de origen no viral más importante a nivel mundial, con alrededor de 248 millones de nuevos casos anualmente y representa un problema de salud pública. Dentro de los factores de virulencia de Tv las cisteína proteinasas (CPs) son las más abundantes (50% del degradoma) y están involucradas en la patogenicidad del parásito. Sin embargo, un exceso de actividad de CPs puede llegar a dañar a Tv, por lo que este parásito posee tres genes que codifican para inhibidores endógenos de CPs, llamados tricocistatinas (TC-1, TC-2 y TC-3) que se encargan de reducir su actividad proteolítica. Recientemente se demostró como blancos de TC-3 a las CPs TvCP2 y TvCP3; además, TC-3 puede llegar a proteger hasta en un 90% a las monocapas de células HeLa del daño por Tv. Estos hallazgos demuestran un importante mecanismo de regulación posttraduccional en las CPs de Tv. Sin embargo, se desconoce si a su vez éste está influenciado por la presencia de simbiontes naturales de este parásito, como *Mycoplasma hominis* (Mh), que en los últimos años se ha descrito como benéfica para Tv. Nuestros resultados demuestran que una vez que el aislado de Tv CNCD 280 naturalmente infectado con Mh es curado de este simbionte, cambia su morfología al presentar más vacuolización, aumenta su tamaño en un %, crece un 37.5% menos y tiene un comportamiento más agresivo en cultivo. Además, impacta en la expresión y localización de CPs (TvCP2 y TvCP3) y su colocalización con el inhibidor TC-3. En ensayos funcionales se observa un incremento de la actividad proteolítica y la citotoxicidad en el aislado libre de Mh que nos indican una mayor patogenicidad por parte del aislado libre de la bacteria.



## Abstract

9 *Trichomonas vaginalis* (Tv) is the causative agent of trichomoniasis, the most important non-viral STI worldwide, with around 248 million new cases annually and represents a public health problem. Among the virulence factors of Tv, cysteine proteinases (CPs) are the most abundant (50% of the degradoma) and are involved in the pathogenicity of the parasite. However, an excess of activity of CPs can damage Tv, this parasite has three genes that code for endogenous inhibitors of CPs, called trichocystatins (TC-1, TC-2 and TC-3) that are responsible of the reduction of its proteolytic activity. Recently TC-3 was shown to target the CPs TvCP2 and TvCP3; In addition, TC-3 can protect up to 90% of monolayers of HeLa cells from Tv damage. These findings demonstrate an important mechanism of posttranslational regulation in Tv CPs. However, it is unknown whether this in turn is influenced by the presence of natural symbionts of this parasite, such as *Mycoplasma hominis* (Mh), which in recent years has been described as beneficial for Tv. Our results show that once the Tv isolate CNCD 280 naturally infected with Mh is cured of this symbiont, it changes its morphology when it presents more vacuolization, increases its size by %, grows 37.5% less and has a more aggressive behavior in culture. In addition, it impacts the expression and localization of CPs (TvCP2 and TvCP3) and their colocalization with the inhibitor TC-3. In functional tests, an increase in proteolytic activity and cytotoxicity in the Mh-free isolate are observed, which indicate greater pathogenicity for the bacteria-free isolate.



## Introducción

### ***Trichomonas vaginalis***

*Trichomonas vaginalis* es un eucarionte unicelular anaeróbico facultativo que se caracteriza por presentar una morfología piriforme con un tamaño entre 7 – 20  $\mu\text{m}$  (Becerril, 2014). Es un parásito obligado del humano y establece la infección principalmente en el epitelio escamoso de la vagina, aunque también puede infectar las glándulas de Bartolino de la mujer (Petrin y col., 1998). En condiciones normales de cultivo *T. vaginalis* presenta una forma ovoide y uniforme, mientras que en biopsias de vagina de pacientes con tricomoniasis, en interacción *in vitro* con células vaginales (hVEC) o en condiciones de bajo hierro y baja glucosa éste presenta un fenotipo ameboide, el cual corresponde a la respuesta a cambios en el medio ambiente (Arroyo y col., 1993; Petrin y col., 1998). *T. vaginalis* posee cuatro flagelos anteriores y un flagelo recurrente unido a una membrana ondulante que utiliza para moverse. La pelta y el axostilo son organelos que tienen como principal función la de sostén y están constituidos de láminas altamente ordenadas de microtúbulos. La pelta refuerza la pared del canal periflagellar, desde la cual se proyectan los flagelos; el axostilo se extiende desde el extremo anterior al posterior de la célula (Lee y col., 2009). *T. vaginalis* posee un núcleo anterior, organelos con la función de la mitocondria llamados hidrogenosomas, un retículo endoplasmático (RE) que se encuentra alrededor del núcleo. *Trichomonas vaginalis* también posee ribosomas que se encuentran tanto adosados a la membrana del RE como libres en el citoplasma, así como lisosomas, fagosomas y un complejo de Golgi (G) muy desarrollado (Benchimol, 2004).

El metabolismo de *T. vaginalis* es principalmente a través de la utilización de carbohidratos por el metabolismo fermentativo en condiciones aeróbicas o anaeróbicas, mientras que la síntesis *de novo* de lípidos se restringe a fosfatidiletanolamina y el colesterol es adquirido de fuentes externas (Carlton y col., 2007). Además, existen dos tipos de aislados de *T. vaginalis*, tipo 1 y tipo 2, cuyas características principales son: los aislados de tipo 1 están frecuentemente infectados con el virus de *Trichomonas vaginalis* (TVV), son más virulentos, tienen mayor diversidad alélica y frecuentemente una alta susceptibilidad al metronidazol





(tratamiento de elección). En cambio, los aislados de tipo 2 no son frecuentemente infectados con TVV, son menos virulentos y son usualmente resistentes a metronidazol (Conrad y col., 2012).

## **2** Epidemiología

La tricomoniasis es la infección de transmisión sexual (ITS) no viral con mayor incidencia a nivel mundial, con alrededor de 248.48 millones de nuevos casos anualmente según la WHO (Poole & McClelland, 2013), incluso sobrepasando a otras ITS de origen bacteriano como la clamidiasis y la gonorrea (WHO). El estimado global para la prevalencia de la tricomoniasis es de 5.3% en mujeres y 0.6% en hombres, con rangos de 1.6 a 11.7% en mujeres y de 0.2 a 1.3% en hombres dependiendo de la región (Rowley y col., 2019). Reportes en Estados Unidos por Centers for Disease Control and Prevention (CDC) ha estimado que de las 20 millones de nuevas ITS anuales, el 13% (1,090,000) corresponde a la tricomoniasis, además de presentarse principalmente en edades >25 años (CDC, 2013).

### **Manifestaciones clínicas y patología**

Una vez que *T. vaginalis* se establece en el aparato genitourinario produce una infección generalmente crónica en las mujeres (alcanzando meses a años de infección) e infecciones de resolución espontánea en hombres (menos de 10 días) (Poole & McClelland, 2013). La tricomoniasis se presenta en su mayoría como casos asintomáticos en el 85% de las mujeres infectadas (Sutton y col., 2007) y entre 42-85% en hombres (Krieger y col., 1993, Swygard y col., 2004, Seo y col., 2014), por lo que se considera que las cifras de prevalencia sean mucho mayores a las presentadas actualmente, pues se encuentran basadas en los reportes de infección de distintas regiones del mundo. Aún con lo descrito anteriormente, se considera que esta elevada prevalencia e incidencia responden al hecho de que se considera a la tricomoniasis como una enfermedad desatendida principalmente por la cantidad de casos asintomáticos, no es una enfermedad de reporte obligatorio y también puede atribuirse a la poca sensibilidad de los métodos convencionales de diagnóstico de esta infección, lo cual contribuye a la transmisión de la enfermedad (Poole & McClelland, 2013; Soper, 2004; Van Der Pol, 2007). Cuando se presentan



síntomas, el cuadro clínico para una infección es vulvitis difusa causada por la leucorrea que se presenta en alrededor del 50% de las mujeres (Petrin y col., 1998; Swygard y col., 2004), la secreción es espumosa, amarilla o verde, mucopurulenta y con olor fétido, seguido de disuria y prurito (Swygard y col., 2004), también se presenta eritema vulvar o vaginal (Wolner-Hanssen y col., 1989). En el 2% de las mujeres se presenta "colpitis macularis" o cérvix de fresa que son pequeñas hemorragias punteadas en el cérvix (Petrin y col., 1998; Swygard y col., 2004). Otras complicaciones asociadas con la tricomoniasis incluyen anexitis, piosalpinx, parto prematuro, a una infección posthisterectomía, infertilidad, y aumento del riesgo de cáncer de cuello uterino (Petrin y col., 1998; Soper, 2004; Vikki, 2000; Zhang y col., 1995). La tricomoniasis en los hombres es asintomática en la mayoría de los casos y se considera que los hombres son portadores asintomáticos de *T. vaginalis* e importantes vectores para la transmisión. El cuadro clínico se caracteriza por secreción escasa, clara a mucopurulenta, disuria, prurito leve y sensación de ardor inmediatamente después de la relación sexual. Las complicaciones asociadas con la tricomoniasis incluyen disuria, es el agente etiológico en el 13% de las uretritis no gonocócica, balanopostitis, epididimitis, prostatitis crónica, infertilidad y aumento del riesgo de cáncer de próstata (Petrin y col., 1998; Poole & McClelland, 2013; Soper, 2004; Swygard y col., 2004). Además, la tricomoniasis representa un factor de riesgo para la transmisión de VIH para ambos sexos (Guenthner y col., 2005; McClelland y col., 2007) y se estima que el 20% de los eventos de transmisión del VIH están ligados a la alta prevalencia de *T. vaginalis* (Sorvillo y col., 2001).

### **Patogenia**

Para que se establezca y mantenga la infección por *T. vaginalis* se requieren de diversos eventos ligados a la patogenicidad del parásito que van a depender tanto de factores del propio parásito, como del hospedero y del ambiente. Estos van a influenciar además del establecimiento de la infección, su curación. El primer evento que ocurre es la citoadherencia parasitaria a las células epiteliales vaginales (VEC), la cual es mediada por una gran variedad de adhesinas (AP23, AP33, AP51, AP65-1, AP120, BspA-like, TvROM1, TvBAP-1 y TvLEGU-1) proteínas del citoesqueleto y glicoconjugados (TvLP) que son especie-específicas y muchas de estas



moléculas son reguladas positivamente por las concentraciones de hierro y glucosa (Figueroa-Ángulo y col., 2012; Mercer & Johnson, 2018; Noël y col., 2010) Una vez que *T. vaginalis* se adhiere al epitelio vaginal modifica su morfología de piriforme a ameboide y comienza un proceso de citotoxicidad hacia las células para adquirir nutrientes. Se han identificado una gran variedad de proteínas relacionadas con la citotoxicidad de *T. vaginalis* de las que destacan la participación de cisteína proteinasas como TvCP39 (Ramón-Luig y col., 2011), el producto de secreción CP30 (TvCP2, TvCP3, TvCP4 y TvCPT) (Sommer y col., 2006), TvCP2 (Miranda-Ozuna y col., 2019), proteínas de tipo saponinas que forman poros (TvSaplip1 a la TvSaplip12) (Carlton y col., 2007) y metaloproteasas como TvMP50 (Puente-Rivera y col., 2017). *T. vaginalis* causa el desprendimiento de células hospederas, fagocita células, degrada la matriz de la mucosa y extracelular mediante mucinasas, hemólisis, inducción de respuestas inflamatorias y la evasión de la respuesta inmune mediada por la degradación del complemento, de inmunoglobulinas así como la destrucción de leucocitos (neutrófilos y macrófagos) por inducción de apoptosis (Figueroa-Ángulo y col., 2012; Mercer & Johnson, 2018; Petrin y col., 1998). Además, al ser *T. vaginalis* un parásito extracelular, ha adoptado estrategias que le permiten regular diferencialmente la expresión de sus factores de virulencia a diferentes niveles (transcripcional, posttranscripcional y posttraducional), dependiendo de diversos factores ambientales en el hospedero como pH vaginal, temperatura y nutrientes existentes en el ambiente vaginal como el hierro, glucosa y poliaminas y siendo así capaz de mantener una infección crónica (Arroyo y col., 2015; Figueroa-Ángulo y col., 2015; Figueroa-Ángulo y col., 2012; Miranda-Ozuna y col., 2016; Torres-Romero & Arroyo, 2009).

### **Cisteína proteinasas de *Trichomonas vaginalis***

*T. vaginalis* posee en la actualidad uno de los degradomas más grandes y complejos reportados, con alrededor de 446 genes que codifican para peptidasas, divididas en proteinasas de tipo aspártico, serina, treonina, metalo y cisteína proteinasas. Las más abundantes son las cisteína proteinasas (CPs) con 220 genes que corresponden al 50% del degradoma (Carlton y col., 2007). Las CPs de *T. vaginalis* están clasificadas dentro de los clanes CA, CD, CE, CF, CO y CP, de los que



destacan los clanes CA (papaina-like) en la familia C1 (catepsina-like) y el clan CD en la familia C13 (legumaina-like). La triada catalítica para estas proteinasas está conformada por los aminoácidos cisteína, histidina y asparagina (Cys25/His159/Asn175) para el clan CA con la hidrólisis en el P<sub>2</sub> e histidina y cisteína (His/Cys) para el clan CD con la hidrólisis de los péptidos y proteínas en el residuo de asparagina del carboxilo terminal (Arroyo y col., 2015; Sajid & McKerrow, 2002).

La mayoría de las CPs caracterizadas en la actualidad por su detección en zimogramas, ensayos de segunda dimensión y espectrometría de masas son del clan CA y pertenecen a la familia C1 al ser proteinasas de tipo catepsina L y están involucradas en la patogenicidad de *T. vaginalis*: TvCP1, TvCP2, TvCP3, TvCP4, TvCP4-like, TvCP12, TvCP25, TvCP39 y TvCP65. En el clan CD de la familia C13 solo se han caracterizado dos proteinasas de tipo Legumaina: TvLEGU-1 y TvLEGU-2 de las que TvLEGU-1 ha sido relacionada con la citoadherencia de *T. vaginalis* (Arroyo y col., 2015; Rendón-Gandarilla y col., 2013).

### **Inhibidores endógenos de CPs en *T. vaginalis***

Para controlar la actividad proteolítica de proteinasas que pueda resultar perjudicial para los organismos, muchos de estos han desarrollado estrategias para evitar ser autodestruidos, como la regulación de la expresión de las proteinasas mediante mecanismos de regulación transcripcional y posttranscripcional dependiendo de la concentración de nutrientes y la regulación posttraducciona por inhibidores endógenos de CPs. Estos inhibidores están presentes en la mayoría de los organismos eucariontes y procariontes y su función es la de regular los factores de virulencia de un organismo. Carlton y col., (2007) encontraron que *T. vaginalis* posee tres genes que codifican para inhibidores endógenos de CPs, llamados Tricocistatinas (TC-1, TC-2 y TC-3), que pertenecen a la superfamilia de las cistatinas y la familia de las estefinas; las cuales se caracterizan por no poseer puentes disulfuro, con un peso molecular pequeño de alrededor de 11 kDa, no están glicosiladas y tienen una localización principalmente citosólica (Oliveira y col., 2003; Puente-Rivera y col., 2014; Sánchez-Rodríguez y col., 2018) Análisis *in silico* de los



7

tres inhibidores muestran que tienen conservada la glicina (G) en el dominio N-terminal, el motivo central QxVxG (Glutamina, x, Valina, x, Glicina) está conservado en TC-1 y TC-3, pero en TC-2 está modificada la glutamina (Q) por una lisina (K) (KxVxG). El motivo PW del carboxilo terminal en TC-1 está modificado por una glicina (G) en vez del Triptofano (W) y TC-3 tiene dos lisinas (LL) en vez del PW. Los tres inhibidores carecen del residuo terminal de cuatro cisteínas (C). El motivo SND que es de unión a legumainas que está en el extremo amino terminal y el motivo central, se muestra que solo tienen a la aspargina central conservada con KNG (TC-1) y KNN (TC-3) (Puente-Rivera y col., 2014; Sánchez-Rodríguez y col., 2018). En cuanto a su actividad como inhibidor, en la actualidad solo TC-2 y TC-3 se han caracterizado. Puente-Rivera y col., (2014) identificó a TC-2 por espectrometría de masas en la región de 45 kDa asociada con TvCP39 y observó una reducción en la actividad proteolítica de *T. vaginalis* al proteger a la monocapa de células HeLa de su efecto citotóxico al utilizar concentraciones crecientes de TC-2r. Sánchez-Rodríguez y col., (2018) caracterizó a TC-3 como una estefina de 11.9 kDa con una conformación tridimensional teórica de tres cadenas  $\beta$ -plegadas que rodean a una  $\alpha$ -hélice, la glicina (G) conservada en el amino terminal y el motivo QxVxG en la primera asa de la  $\beta$ -plegada y no se encontró el motivo PW (LL). Los probables blancos de TC-3 son TvCP2, TvCP3, TvCP4-like, TvCP39 y TvLEGU-1, demostrando una asociación con TvCP3. Al utilizar a TC-3r en ensayos de citotoxicidad mediante la interacción entre *T. vaginalis* y monocapas de células HeLa, TC-3r también tiene un efecto protector de monocapas dependiente de concentración. Estos hallazgos demuestran un importante mecanismo de regulación en las CPs de *T. vaginalis* por los inhibidores endógenos que se desconoce si a su vez está influenciado no solo por factores ambientales como el hierro (Arroyo y col., 2015; Puente-Rivera y col., 2014) y la glucosa, sino también por la presencia de simbioses en *T. vaginalis* como TVV o el actualmente descrito *Mycoplasma hominis*.

### ***Mycoplasma hominis***

*Mycoplasma hominis* es una bacteria gram positiva que pertenece a la clase Mollicutes, caracterizado por no poseer pared celular, solo membrana



citoplasmática que les permite ser pleomórficos. En cultivos bacteriológicos su crecimiento tiene la característica de parecer un "huevo frito" (Rivera-Tapia y col., 2002) con un tamaño entre 100  $\mu\text{m}$  y 1 mm (Stanbridge., 1971). Su reproducción es por fisión binaria, se desarrolla como una secuencia de filamentos que se alargan y luego se dividen hasta formar nuevas bacterias con forma cocoide, que después dependiendo del ambiente en que se encuentren pueden modificar su forma desde cocoide hasta filamentosa (Razin, 1972). Además, *M. hominis* carece de la típica estructura de punta que tienen la mayoría de los *Mycoplasmas* que está relacionada con movimiento y adhesión celular (Roachford y col., 2017, Razin., 1972); tiene un genoma de ~0.665 Mpb que codifica alrededor de 527 genes y son el organismo con el genoma más pequeño con capacidad de replicarse (Waites y col., 2015). El contenido de G+C es menor en comparación con otros procariontes, con alrededor de 26% y la cantidad de lípidos en la membrana celular alcanza a ser el 35% del contenido total de la bacteria (Roachford y col., 2017). No poseen la maquinaria necesaria para la síntesis de novo de ácidos nucleicos, por lo que deben obtener al menos un nucleótido para luego convertirlo en los nucleótidos restantes. Su principal fuente de ATP es a través de la vía de la arginina dihidrolasa y no tiene capacidad de sintetizar lípidos, por lo que la adquisición de estos nutrientes es a través del hospedero (Razin., 1972).

### **Epidemiología**

Según distintos estudios la prevalencia de *M. hominis* va desde un 1.3 a 51% en mujeres (Taylor-Robinson., 2017) y en hombres entre un 4 a 13% (Posse y col., 2018), más si son sexualmente activos. En mujeres con vaginosis se observa una prevalencia tres veces mayor (26.8%) en comparación con mujeres sanas (6%) (Rumyantseva y col., 2018). Una de las condiciones con mayor prevalencia de infecciones por *M. hominis* son las mujeres embarazadas, en las que la prevalencia ronda entre 5-75% (Capoccia y col., 2013).

### **Manifestaciones clínicas y patología**

*M. hominis* es una bacteria normal de la microbiota vaginal con mucha variabilidad en su virulencia y patogenicidad. Está asociado a infecciones genitourinarias como



la vaginosis bacteriana, uretritis no gonocócica y pielonefritis, es causante de distintas enfermedades extragenitales como la enfermedad pélvica inflamatoria, corioamnionitis, endometritis, fiebre postparto, infertilidad, aborto espontáneo, bajo peso al nacer, parto prematuro, mortalidad prenatal, infecciones de heridas postcesárea o tras una histerectomía. En neonatos, puede ocasionar meningitis, abscesos cerebrales e infecciones oculares. En los adultos se han descrito bacteriemias, artritis sépticas, osteitis, endocarditis, mediastinitis, abscesos cerebrales e infecciones respiratorias. (Rumyantseya y col., 2018, Posse y col., 2018).

### Patogenia

Una vez que *M. hominis* se encuentra en el epitelio del aparato genitourinario, el primer paso es la adherencia al epitelio a través de proteínas de adhesión o lipoproteínas para evitar ser eliminado y adquirir nutrientes (Taylor-Robinson., 2010). Proteína de adhesión como la permeasa de unión a sustratos oligopeptidos (Oppa) están relacionadas incluso con apoptosis celular (Waites y Xiao., 2015). Al estar en contacto con la célula hospedara *M. hominis* libera productos finales del metabolismo como peróxido de hidrógeno y amonio que dañan la membrana celular y causan la destrucción del epitelio (Razin., 1978). Además, *M. hominis* es capaz de evadir el sistema inmune por la variación constante sus proteínas de superficie como la proteína antigénica asociada a adhesión (Vaa) y la proteína P75 y P120, y activar vía receptores Toll-like a macrófagos, monocitos y linfocitos que inician la respuesta proinflamatoria; también degradan las inmunoglobulinas por un sistema de MIB-MIP al cortar el dominio VH de IgG (Méndez-Martínez y col., 2016, Roachford y col., 2017).

### Relaciones simbióticas en la naturaleza

Simbiosis es un término que se utiliza para describir la relación que existe entre dos o más organismos de distintas especies estrechamente relacionados por periodos de tiempo prolongados. Esta puede ser de mutualismo (todos obtienen un beneficio de la relación), parasitismo (causa daño a uno de los organismos) y comensalismo (uno se beneficia sin que el otro sea dañado) (Dimijian, 2000). En la naturaleza podemos encontrar estas relaciones en casi todos los organismos, y ha jugado un



papel muy importante en el desarrollo de los ecosistemas de la Tierra y de la diversidad biológica. Desde el punto de vista evolutivo, la simbiosis ha generado la evolución de organelos como los plástidos y mitocondria de cianobacterias y alfa-proteobacterias, respectivamente (Moran, 2006). La simbiosis entre organismos como el humano y la microbiota ha tomado mucha fuerza en los últimos años, pues se ha observado que esta estrecha relación conlleva al desarrollo del sistema inmune. En los insectos, la simbiosis impacta enormemente en la biología del insecto a nivel nutricional, respuesta inmune y reproductiva (López-García y col., 2017). En eucariontes como *Acanthamoeba* spp se ha observado una estrecha relación simbiótica con diversas especies bacterianas que favorecen la virulencia de la ameba en modelos de keratitis amebiana (Paterson y col., 2011).

#### **Simbiosis en *T. vaginalis***

En la actualidad se conoce que *T. vaginalis* puede coexistir en simbiosis con dos organismos, TVV y *Mycoplasma hominis* (da Luz Becker y col., 2015; Fichorova y col., 2017; Mercer y Johnson., 2018).

#### **Simbiosis entre *T. vaginalis* y *M. hominis***

Como muchos otros eucariontes, *T. vaginalis* se ha visto asociada a múltiples microorganismos como bacterias de la microbiota vaginal, especialmente al "community state type-IV" (CST-IV), la cual es predominantemente de bacterias anaeróbicas (Ravel y col., 2011), así como a un virus llamado Virus de *Trichomonas vaginalis* (TVV), el cual se ha observado que influye en la virulencia y susceptibilidad a metronidazol de *T. vaginalis* (Fichorova y col., 2017). En años recientes ha tomado gran interés la relación simbiótica que tiene Tv con la bacteria *Mycoplasma hominis* (Brotman y col., 2012; da Luz Becker y col., 2015; Rappelli y col., 2001; van der Schee y col., 2001), otro microorganismo que parasita de forma obligatoria el tracto genitourinario del humano y que también es causante de infertilidad, rotura prematura de la membrana amniótica, parto prematuro, bajo peso del producto, corioamnionitis, y vaginosis bacteriana (Huang y col., 2015; Taylor-Robinson, 1998; Taylor-Robinson y col., 2011). La prevalencia de *M. hominis* en los aislados de *T. vaginalis* va desde el 5% hasta el 89.1% (Fichorova y col., 2017). Múltiples estudios,





sugieren que esta simbiosis favorece la patogénesis de la enfermedad (Fiori y col., 2013; Margarita y col., 2016; Vancini y col., 2008), al aumentar la producción de ATP y el crecimiento de *T. vaginalis* (Margarita y col., 2016) e incluso conferirle cierta resistencia al tratamiento con metronidazol (Fürkranz y col., 2018; Xiao y col., 2006). Sin embargo, no se han comprobado las ventajas que esta relación le confiere a *T. vaginalis* en función de sus factores de virulencia.

### **Planteamiento del problema**

Estudios realizados independientemente por Vancini y col., (2007) y Fiori y col., (2013) sugieren que cuando *T. vaginalis* se encuentra en simbiosis con *M. hominis* presenta un fenotipo más agresivo que cuando no se encuentra esta bacteria, provocando la destrucción de la monocapa de células hVECs y activando la respuesta inflamatoria al inducir a los macrófagos a secretar citocinas proinflamatorias en respuesta a la infección. Además, parece favorecer la producción de ATP de *T. vaginalis*, aumentar su replicación y capacidad hemolítica (Margarita y col., 2016; Morada y col., 2010). *T. vaginalis* posee una gran cantidad de factores de virulencia, de los cuales las CPs están involucradas en muchos de los procesos de la patogenicidad del parásito (Arroyo y col., 2015), pero en orden de controlar la actividad de estas proteínas este parásito cuenta con tres inhibidores endógenos de CPs, TC-1, TC-2 y TC-3, cuya principal función es la de proteger a *T. vaginalis* del efecto de sus mismas proteinasas. Además, el inhibidor TC-3 tiene una expresión mayor en el aislado CNCD 280 (Tipo 1) que en otros aislados de tipo 2 y por lo tanto, participa en el control de la actividad de CPs (Carlton y col., 2007; Puente-Rivera y col., 2014; Sánchez-Rodríguez y col., 2018).

Con lo planteado anteriormente surgen las siguientes preguntas: ¿Está *Mycoplasma hominis* modulando la expresión de TC-3 de *Trichomonas vaginalis* para favorecer la cronicidad del aislado CNCD 280? ¿Cómo se encuentran los factores de virulencia de *T. vaginalis* cuando está en simbiosis con *M. hominis* en comparación a cuando no está infectada?



## Antecedentes

### Generales

La primera descripción de *T. vaginalis* albergando a *M. hominis* fue hecha por Nielsen & Nielsen, (1975) cuando al observar la adhesión de *T. vaginalis* al epitelio vaginal, en biopsias de pacientes identificaron a *M. hominis* dentro de vacuolas. Esta observación llevó a que múltiples investigadores demostraran que muchos de los aislados de *T. vaginalis* se encuentran en simbiosis con *M. hominis*. Pero esta simbiosis dependerá del tipo de aislado (tipo 1 o tipo 2), ya que de este último es capaz de salir de *T. vaginalis* e infectar células HeLa y esta relación puede mantenerse durante mucho tiempo (Rappelli y col., 1998; Rappelli y col., 2001; Dessì y col., 2005; Vancini & Benchimol, 2008).

Una vez demostrado que existe una simbiosis entre estos dos microorganismos resta la pregunta sobre ¿Cuál es el impacto de esta relación en la biología de *T. vaginalis*? Morada y col., (2010) y Margarita y col., (2016) demostraron que la simbiosis entre *T. vaginalis* y *M. hominis* resulta en un aumento en la producción de ATP, probablemente por la utilización de la vía de la dihidrolasa de arginina (ADH), crecimiento y replicación acelerada en un 20 y 40% respectivamente y el aumento en la actividad hemolítica del parásito. Estos dos estudios sientan el precedente de que cuando *T. vaginalis* alberga a *M. hominis* es probable que tenga efecto en sus mecanismos biológicos confiriéndole la capacidad de aumentar su patogenicidad. Los primeros acercamientos a si esta hipótesis es correcta son los estudios que demuestran que *T. vaginalis* es capaz de inducir una respuesta proinflamatoria exacerbada cuando se encuentra hospedando a *M. hominis*, debido a la producción de citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-8 y TNF $\alpha$ , así como la IL-23, cuya principal función es la de polarizar a los linfocitos al linaje Th17 y promover inflamación que podría resultar crónica (Fiori y col., 2013). Además, un estudio llevado a cabo por Margarita y col., (2016) observó que existe un aumento en la capacidad hemolítica y una disminución en la producción de óxido nítrico por parte de los macrófagos. Esto último podría explicarse por el aumento en la utilización de arginina como sustrato para la producción de ATP por parte de *T. vaginalis*.



Un punto controversial es la posibilidad de que esta simbiosis induzca la resistencia de *T. vaginalis* a metronidazol, Grupos como Xiao y col., (2006) y Fürnkranz y col., (2018) sugieren que si existe un aumento en la resistencia a metronidazol en los aislados que albergan a *M. hominis*, en comparación con los aislados sin esta bacteria. Por el contrario, un estudio realizado en Estados Unidos por el CDC observó que no existe tal diferencia significativa en la resistencia cuando se presenta esta simbiosis (Butler y col., 2010).

### Específicos

Al analizar el impacto en la biología y patología de *T. vaginalis* cuando se encuentra en simbiosis con *M. hominis* Vancini y col., (2008) observaron que *T. vaginalis* en simbiosis con *M. hominis* producía un mayor daño a monocapa de células hVECs en comparación con *T. vaginalis* no infectada. Además, observaron una morfología predominantemente ameboide en el aislado infectado en interacción con las células hVECs y aumento de su capacidad fagocítica en comparación con el aislado no infectado. Estos resultados los llevaron a concluir que cuando *T. vaginalis* se encuentra en simbiosis con *M. hominis* aumenta su capacidad citotóxica y fagocítica y de cambio de su morfología celular, por lo que ellos consideran que *M. hominis* puede contribuir en modular la virulencia de *T. vaginalis*.

¿Podría *Mycoplasma hominis* estar modulando los factores de virulencia de *Trichomonas vaginalis*? *T. vaginalis* posee una gran cantidad de peptidasas, principalmente las CPs descritas como importantes factores de virulencia en los diferentes eventos que ocurren en la infección como: adhesión, citólisis, hemólisis, resistencia al complemento e inducción de apoptosis (Arroyo y col., 2015). Pero para controlar la actividad de estas proteasas este parásito cuenta con tres inhibidores endógenos de CPs, TC-1, TC-2 y TC-3, cuya principal función es la de proteger a *T. vaginalis* del efecto de sus mismas proteinasas (Carlton y col., 2007; Puente-Rivera y col., 2014; Sánchez-Rodríguez y col., 2018). Sánchez-Rodríguez y col., (2018) demostraron que TC-3 es un importante inhibidor que regula la actividad de probablemente cinco CPs involucradas en la patogenia de *T. vaginalis*, TvCP2, TvCP3, TvCP4, TvCP39 y TvLEGU-1. Las primeras tres involucradas en la



citotoxicidad e inducción de apoptosis (Ramón-Luing y col., 2011; Kummer y col., 2008; Sommer y col., 2005) y la cuarta relacionada con el procesos de citoadherencia (Rendón-Gandarilla y col., 2013). Sánchez-Rodríguez y col. (2018) también observaron que el inhibidor TC-3 no se expresa igual en todos los aislados de *T. vaginalis*, el aislado CNCD 280 (Tipo 1) expresa más TC-3 comparado con aislados de tipo 2. Estas tricocistatinas le confieren a *T. vaginalis* la capacidad de prevenir su propia destrucción cuando secreta estas CPs para la destrucción de las células de la vagina y así obtener nutrientes. Una característica importante es que dependiendo del tipo de aislado es la expresión de las tricocistatinas. Este estudio demostró que el aislado tipo 1 presentaba un mayor nivel de este inhibidor comparado con el aislado tipo 2. Esto podría deberse a muchos factores que no están claros y uno de ellos podría ser la presencia de *M. hominis* en el aislado de tipo 1 CNCD 280.

### Justificación

<sup>6</sup> *Trichomonas vaginalis* es el agente causal de la tricomoniasis, la ITS de origen no viral más importante a nivel mundial, por encima de otras como gonorrea y sífilis (Van Der Pol, Kraft, & Williams, 2006), con ~248 millones de nuevos casos anualmente según la WHO (Pooie & McClelland, 2013) y representa un grave problema de salud pública. Aunque <sup>19</sup> las infecciones por *T. vaginalis* son asintomáticas en el 85% de las personas infectadas (Sutton y col., 2007), puede llegar representar un problema de salud al desarrollar complicaciones como la vaginitis, parto prematuro, uretritis, prostatitis, infertilidad y aumento del riesgo de cáncer de cuello uterino y próstata (Petrin y col., 1998; Soper, 2004; Vikki, 2000; Zhang y col., 1995). Además, representa un factor de riesgo para la transmisión de HIV (Guenther y col., 2005; McClelland y col., 2007).

<sup>24</sup> En los últimos años se ha demostrado una relación simbiótica entre *T. vaginalis* y *M. hominis*, lo que representa la primera simbiosis descrita entre dos parásitos obligados del hombre (Fiori y col., 2013) y ambos causantes de enfermedades genitourinarias (Capoccia y col., 2013; Petrin y col., 1998). Esta relación se ha descrito como benéfica para la patogenicidad de *T. vaginalis*, pues se ha dicho que





cuando se encuentra infectada por *M. hominis* aumenta su capacidad citotóxica, replicación, inducción de una respuesta proinflamatoria. Como una probable estrategia para evadir el sistema inmune se propone que el aumento en utilización de la vía de la ADH para la producción de ATP y para depletar de arginina el medio ambiente y así evitar la destrucción por macrófagos, comparativamente con aislados de *Tv* en los que no se encuentran en simbiosis con esta bacteria (Fiori y col., 2013; Margarita y col., 2016; Morada y col., 2010; Vancini y col., 2008). Poco se sabe sobre cómo afecta esta relación simbiótica a los factores de virulencia de *T. vaginalis* y si tendrá alguna repercusión en los sistemas de regulación de la actividad de cisteína proteinasas mediadas por las tricocistatinas que están encargadas de la regulación de la actividad proteolítica de CPs relacionadas con la citotoxicidad y adhesión del parásito. Por lo que consideramos importante el estudio del impacto en estos factores de virulencia de *T. vaginalis* en el contexto de una simbiosis o no con *M. hominis*.

### **Hipótesis**

La simbiosis entre *Trichomonas vaginalis* y *Mycoplasma hominis* resulta en una menor virulencia de *T. vaginalis* al aumentar la función del inhibidor endógeno TC-3 y reprimir la actividad de las cisteína proteinasas TvCP2 y TvCP3, disminuyendo la citotoxicidad del aislado CNCD 280 de *T. vaginalis*.

### **Objetivos**

#### **Objetivo general**

Evaluar el impacto en la función del inhibidor endógeno TC-3 y de las cisteína proteinasas TvCP2 y TvCP3 de *Trichomonas vaginalis* cuando se pierde la simbiosis con *Mycoplasma hominis*.

#### **Objetivos específicos**

1. Demostrar la presencia o ausencia de *M. hominis* en el aislado CNDC 280 de *T. vaginalis* antes y después de la curación.
2. Evaluar la expresión a nivel de mRNA y proteína del inhibidor endógeno TC-3 y de sus cisteína proteinasas blanco (TvCP2 y TvCP3) cuando se pierde la

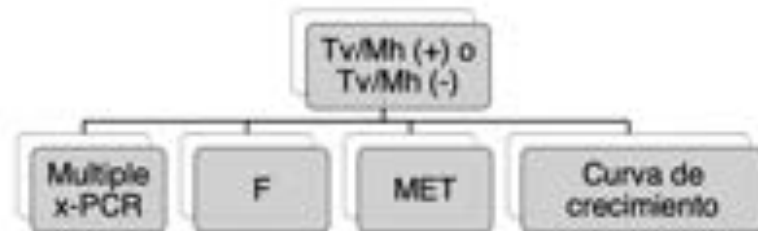


simbiosis de *T. vaginalis* con *M. hominis* en comparación con el aislado Tv/Mh (+).

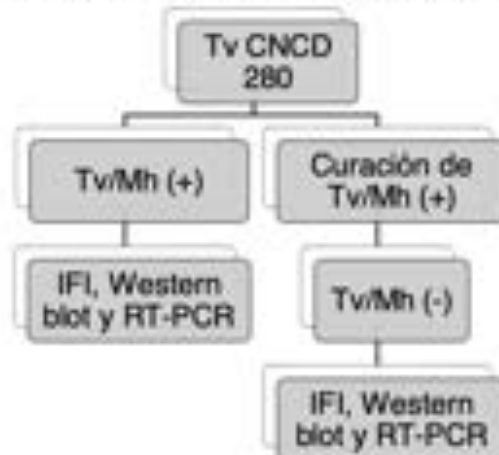
3. Evaluar el impacto en la actividad proteolítica y citotoxicidad de *T. vaginalis* cuando se pierde la simbiosis con *M. hominis* en comparación con el aislado Tv/Mh (+).

### Estrategia experimental

Demostrar la presencia o ausencia de *M. hominis* en el aislado CNDC 280 de *T. vaginalis* antes y después de la curación.



Evaluar la expresión a nivel de mRNA y proteína del inhibidor endógeno TC-3 y de sus cisteína proteinasas blanco (TvCP2 y TvCP3) cuando se pierde la simbiosis de *T. vaginalis* con *M. hominis* en comparación con el aislado Tv/Mh (+).





Evaluar el impacto en la actividad proteolítica y citotoxicidad de *T. vaginalis* cuando se pierde la simbiosis con *M. hominis* en comparación con el aislado Tv/Mh (+).



## Materiales y métodos

### Aislado de *Trichomonas vaginalis* y cultivo celular

El aislado de *Trichomonas vaginalis* utilizado en este estudio fue el CNCD 280 de dos semanas. Los parásitos se cultivaron en el medio de cultivo de extracto-tripticasa de levadura-maltosa (TYM) suplementado con 10% de suero bovino adulto inactivado por calor (HIBS) (Diamond, 1957). Las células HeLa humanas (ATCC® CCL2™) se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (Gibco) (DMEM) (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, EE. UU.) con HIBS al 10% (Álvarez-Sánchez et al., 2000; Arroyo et al., 1992).

### Curva de crecimiento de *Trichomonas vaginalis*

Los aislado CNCD 280 Tv/Mh (+) Tv/Mh (-) se cultivaron con  $0.75 \times 10^6$  parásitos en medio TYM suplementado con 10% de HIBS, se incubaron a 37 °C por 0, 6, 12, 18 y 24 horas, se contaron en una cámara de Neubauer y se realizó una curva de crecimiento basada en la densidad parasitaria de cada cultivo.



#### *Curación de Trichomonas vaginalis*

El aislado CNCD 280 naturalmente infectado con *M. hominis* se sometió a un tratamiento para la eliminación de esta bacteria con un programa de 50 µg/ml de cloranfenicol y 5 µg/ml de tetraciclina durante 5 días (Mercer y col., 2016) en el medio de cultivo estándar.

#### *Obtención de proteína para electroforesis 1-DE.*

Para obtener un extracto de proteína con detergente, se siguió el protocolo de Sánchez-Rodríguez y col., (2018) para preparar extractos de proteínas totales, los parásitos ( $2 \times 10^7$ ) se lisaron mediante precipitación con ácido tricloroacético al 10% (TCA) a 4°C durante la noche, y las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 12%.

#### *Western blot*

Una vez que las proteínas se separaron, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (NC) (Bio-Rad) para el ensayo de WB. Las membranas se bloquearon con leche desnatada al 5% sin grasa, se incubaron diferentes anticuerpos primarios: anti-TC-3r (1:100), anti-TvCP3r (1:3000), anti-TvCP2r (1:3000) y suero preinmune (PI) (dilución 1:100) como control negativo durante 18 h a 4 °C, lavando cinco veces con PBS-Tween 0.1%, se incubaron con un anticuerpo secundario policlonal de cabra anti-ratón o anti-conejo conjugado con peroxidasa (dilución 1:3000; Invitrogen) durante 2 h a temperatura ambiente (TA), se revelaron con sistema mejorado de quimioluminiscencia (SuperSignal Sustrato quimioluminiscente West Pico; Thermo Scientific-Pierce, Rockford, IL, EE. UU.) En un Chemidoc XR (Bio-Rad).

#### *Extracción de DNA genómico para TVV*

El DNA genómico se extrajo de  $20 \times 10^6$  de parásitos de los aislados CNCD 190, CNCD 188, Tv/Mh (+) y Tv/Mh (-). Se lisaron con PBS pH 7.0 y SDS al 10%, se mezclaron y se separaron los ácidos nucleicos con fenol y cloroformo, se precipitó con etanol al 100% y acetato de sodio pH 5.2 por tres días a -20 °C, se centrifugó a 13,000 rpm por 20 minutos, la pastilla se lavó con etanol al 70% y se resuspendió con buffer Tris-EDTA (TE). El DNA genómico se analizó por electroforesis en geles





de agarosa al 1% y se visualizó con un transiluminador ultravioleta (BioRad) después de la tinción con bromuro de etidio.

#### PCR multiplex

Se realizó una PCR-Multiplex según el protocolo de Díaz y col., (2010). La PCR-Multiplex fue en condiciones de crecimiento normal. Para la detección simultánea de *T. vaginalis* y *M. hominis* se hizo una modificación al protocolo, se utilizaron los oligonucleótidos TBU9 (5'-CATTGATAACGAAGCTCTTTTACGAT-3'), TBU2 (5'-GCATGTTGTGCCGGACATAACCAT-3') (Madico y col., 1998), RNH-1 (5'-CAATGGCTAATGGCCGGATACGC-3') y RNAH2 (5'-GGTACCGTCAGTCTGCAAT-3') (Blanchard y col., 1993). Las condiciones de ciclaje utilizadas fueron las siguientes: 94 °C durante 5 min, seguido de 35 ciclos a 94 °C durante 30 s, 55 °C durante 30 s, 1 min. a 72 °C, y un paso de extensión final de 8 min a 72 °C. Los productos de PCR-Multiplex se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% y se visualizaron con un transiluminador ultravioleta (BioRad) después de la tinción con bromuro de etidio.

#### Secuenciación de 16S de *Mh* y $\beta$ -tubulina de *Tv*

El producto de PCR de 16S de *Mh* y  $\beta$ -tubulina de *Tv* se ligaron en el vector pGEM T-easy y se transformaron en *E. coli* DH5 $\alpha$ , se sembraron en LB agar por 18 horas a 37 °C y las colonias se seleccionaron con IPTG/X-Gal y ampicilina. La extracción del DNA plasmídico se realizó con GeneJET Plasmid Miniprep kit (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se digirió el plásmido con la enzima Eco RI y se observó la liberación del fragmento con geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio y se mandó a secuenciar al Laboratorio de secuenciación genómica de la biodiversidad y de la salud de la UNAM.

#### RT-PCR

El RNA total se extrajo del aislado CNCD 280 usando TRIzol (Sigma). Para la síntesis de cDNA, se utilizó la transcriptasa reversa SuperScript® II (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), se siguieron las instrucciones del fabricante. Un total de 500 ng de cDNA se utilizó como plantilla para amplificar los genes *tvcp-3* (TVAG\_034880), *tvcp2* (TVAG\_057000) y *tvcp3* (TVAG\_090100) mediante RT-PCR



utilizando oligonucleótidos específicos, se realizaron los siguientes ciclajes: *fvcp-3*: *fvcp-2*: 2 min a 95 °C, 20 ciclos de 95 °C por 1 min, 55 °C por 35 seg y 1:20 min a 72 °C, y una extensión final a 72 °C por 7 min; *fvcp-3*: 95 °C por 2 min, 25 ciclos de 95 °C por 1 min, 60 °C por 1 min y 1 min a 72 °C, y una extensión final a 72 °C por 7 min. El mRNA de  $\beta$ -tubulina de *T. vaginalis* será usado como control interno. Los productos amplificados de cDNA se separaron en geles de agarosa al 2% con bromuro de etidio (Sánchez-Rodríguez y col., 2018). Los niveles del mRNA de  $\beta$ -tubulina se usaron para la normalización de los resultados.

#### *Actividad proteolítica total de CPs*

La actividad proteolítica total del aislado CNCD 280 se evaluó con el extracto rico en proteínas (PRE) según el protocolo descrito por Sánchez-Rodríguez y col., (2018) en el que 20  $\mu$ g de PRE será probado en buffer de ensayo C (acetato de sodio 100mM pH 5.5, EDTA 1 mM, NaCl 50 mM,  $\beta$ -mercaptoethanol 2 mM). La reacción se inició al adicionar el sustrato fluorogénico Z-Phe-Arg-MCA para Catepsinas-L (Sigma-Aldrich), a una concentración final de 20  $\mu$ M, en una microplaca de 96 pozos (Nunc). Inmediatamente después de la adición del sustrato, la fluorescencia liberada por la hidrólisis del sustrato se midió en una excitación de 355 nm y una emisión de 460 nm, usando el espectrofluorímetro Gemini EM (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

#### *Zimogramas*

El patrón de proteasas de *T. vaginalis* se evaluó con un PRE analizado por 1-DE SDS-PAGE en geles de poli(acrilamida) al 10% copolimerizados con 0.2% de gelatina (Bio-Rad). Después de la electroforesis, el gel se lavó con 2.5% de Tritón X-100 con agitación durante 1 h a TA (Álvarez-Sánchez y col., 2000). Para la activación de los zimogramas 1-DE, los geles se incubaron en tampón acetato pH 5,5 que contiene 2-mercaptoetanol al 0,1% durante 17 h a 37 °C. Las imágenes se obtuvieron con el sistema de imágenes moleculares ChemiDoc XRS utilizando el software Quantity One (versión 4.6.0; Bio-Rad).



### *Ensayo de citotoxicidad*

Los ensayos de citotoxicidad se realizaron como se describió previamente (Álvarez-Sánchez y col., 2000; Puente-Rivera y col., 2014 y Sánchez-Rodríguez y col., 2018). Brevemente, las monocapas de células HeLa confluentes en placas de 96 pocillos se incubaron con parásitos Tv/Mh (+) y Tv/Mh (-) y CNCD 188 como control de citotoxicidad en una proporción de parásitos 5:1 con las células HeLa en medio de interacción (DMEM: TYM en una relación 2:1 sin suero) durante 5 h a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. La destrucción de la monocapa se analizó por método colorimétrico descrito por Álvarez-Sánchez y col., (2000).

### *Colocalización por inmunofluorescencia indirecta*

Los parásitos Tv/Mh (+) y Tv/Mh (-) se cultivaron y se fijaron con formaldehído al 4% en PBS durante 20 min a TA en laminillas tratadas con Poli L-lisina. Se siguió el protocolo descrito por Sánchez-Rodríguez y col., (2018). Los parásitos se lavaron con NH<sub>4</sub>Cl/PBS 20 mM y BSA/PBS al 0.2% y se incubaron con un anticuerpo primario (anti-TC-3r de ratón o suero PI, dilución 1:100) durante 18 h a 4 °C en una cámara humidificada, se lavaron con BSA/PBS, se incubaron con un anticuerpo primario (anti-TvCP2 o anti-TvCP3 de conejo, dilución 1:100 para ambos) durante 3 horas, se lavaron con BSA/PBS y se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con FITC o Alexa-Fluor 594 (dilución 1:100) (Thermo-Scientific-Pierce) durante 1 h a TA, se lavaron con BSA/PBS y PBS, se volvieron a fijar y se lavaron como antes. Los parásitos se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.1% durante 10 min, se lavaron con PBS y BSA/PBS, y se incubaron como se describió anteriormente con el anticuerpo primario para el anticuerpo anti-TC3, para anti-TvCP2 y anti-TvCP3 la incubación fue de 18 h a 4 °C y para el secundario como se describió. Se lavaron con PBS y se montaron las laminillas con solución de montaje "Vectashield-DAPI" (Vector-Laboratories).

### *Tinción de DNA extranuclear*

Para detectar el DNA extranuclear, se realizaron las fluorescencias con Sytox Green y "Vectashiel-DAPI", para ello los parásitos se lavaron con NH<sub>4</sub>Cl/PBS 20 mM y BSA/PBS al 0.2% y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.1% durante 10 min, se



lavaron con BSA/PBS y se incubaron con Sytox Green (dilución 1:5000) (Molecular Probes) durante 30 min a TA, se lavaron con PBS y se montaron las laminillas con solución de montaje "Vectashield-DAPI". Las muestras se analizaron mediante microscopía confocal y el "software" Axio Imager Z2 (Zeiss) o mediante microscopía de epifluorescencia (Nikon, Japón).

#### Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Para los ensayos de etiquetado con inmuno-oro el aislado CNCD 280 Tv/Mh (+) y Tv/Mh (-) se fijaron con glutaraldehído al 0.5% y paraformaldehído al 4% en un buffer de cacodilato de sodio durante 1 h a TA, se lavaron con PBS, se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol, se incluyeron en resina "LR White" (London Resin Co) y se polimerizaron a 56 °C durante la noche. Se obtuvieron cortes finos (60 nm) y se incubaron durante la noche a TA con los anticuerpos primarios: anti-TC-3r de ratón (dilución 1:10), anti-TvCP2 (dilución 1:30), anti-TvCP3 (dilución 1:10) de conejo, se lavaron y se incubaron con IgG anti-ratón o IgG anti-conejo conjugado con oro (dilución 1:60) como anticuerpos secundarios (Ted Pella Inc) (usando partículas de oro de 30 y 15 nm, respectivamente), e individualmente para Tv/Mh (+) se utilizó un anticuerpo anti-ATG8 de ratón, se hizo el mismo procedimiento descrito previamente al incubarlo con IgG anti-ratón conjugado con oro (partículas de oro de 15 nm), se contrastaron con acetato de uranio y citrato de plomo. Como control negativo se usará el anticuerpo secundario solo (Sánchez-Rodríguez y col., 2018).

#### Resultados

*El aislado CNCD 280 de T. vaginalis se encuentra infectado con M. hominis y TVV*

Para corroborar que el aislado CNCD 280 de *T. vaginalis* está infectado con *M. hominis*, se extrajo DNA genómico del aislado en condiciones normales de crecimiento y se realizó una PCR multiplex amplificando los genes de 16S de *M. hominis* y  $\beta$ -tubulina de *T. vaginalis* (Fig. 1B) en la que se observa la presencia de ambas bandas y demuestra que el aislado CNCD 280 está infectado con *M. hominis*, como no se contaba con un control positivo de DNA genómico de *M. hominis*, se decidió secuenciar el producto de PCR de 16S y  $\beta$ -tubulina por separado en el

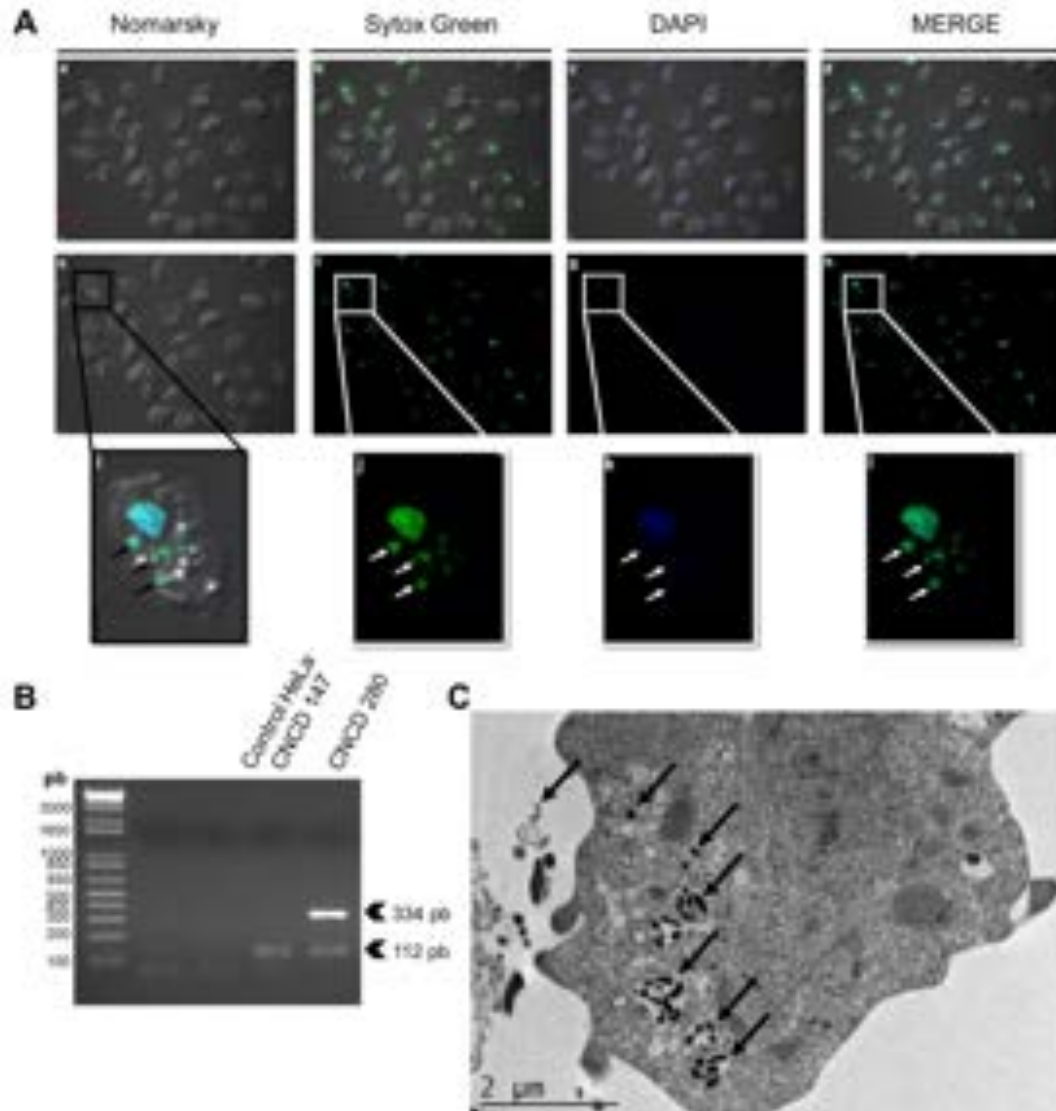




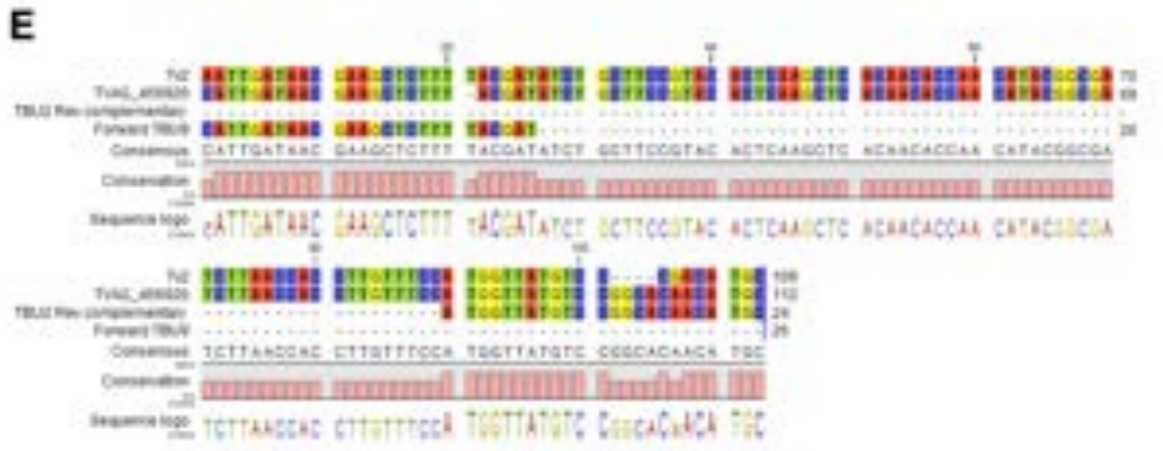
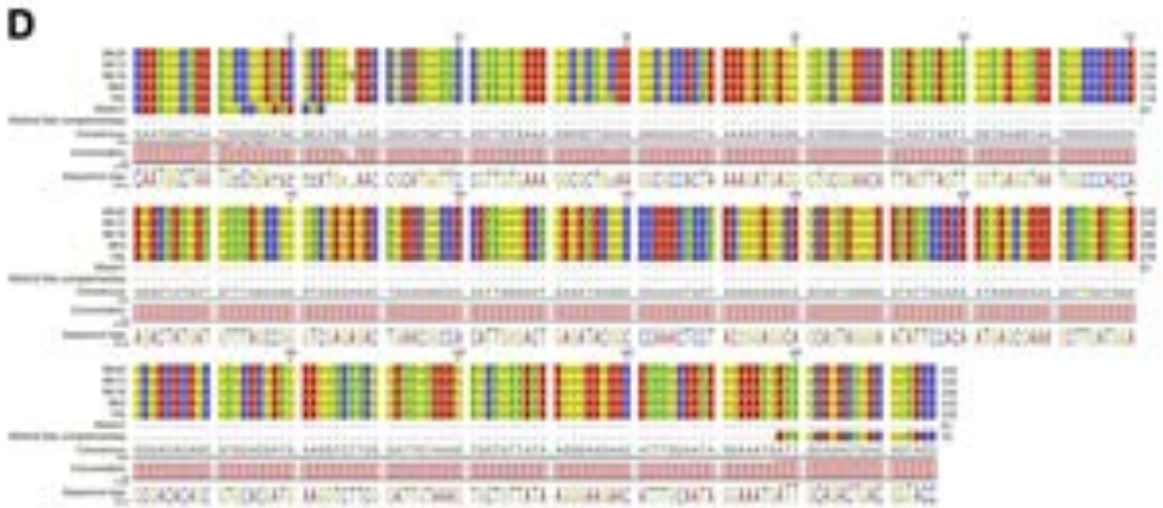
1 Laboratorio de secuenciación genómica de la biodiversidad y de la salud de la UNAM. Con el análisis de la secuencia de DNA de los amplicones, se pudo corroborar que la secuencia genómica obtenida correspondió a la reportada para la 16S de *M. hominis* y  $\beta$ -tubulina de *T. vaginalis* y que no presentó cambios (Fig. 1D y E). También se realizó una fluorescencia del aislado con los fluorocromos DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) y Sytox green que marcan ácidos nucleicos (Fig. 1A), los resultados muestran fluorescencia extranuclear con colocalización entre ambos fluorocromos, sugiriendo la presencia de un microorganismo en el interior de *T. vaginalis*, ya que no posee DNA extranuclear (Dessi y col. 2005). Además existe un mayor porcentaje de infección en condiciones normales de cultivo (Tabla suplementaria 1). En concentraciones de alta glucosa con el aislado CNCD 280 en MET (Microscopía electrónica de transmisión) se observan estructuras electrondensas sugerentes a *Mycoplasma hominis* en el interior de *T. vaginalis* con un tamaño promedio de 0.27  $\mu\text{m}$  (Fig. S1 suplementaria 1), concordando con lo reportado por Maniloff en 1969 (0.25  $\mu\text{m}$ ). *M. hominis*, se encuentra tanto en vacuolas (con un promedio de 4 bacterias por vacuola) como libre en el citoplasma, lo que sugiere que este aislado de *T. vaginalis* es uno "naturalmente infectado" según lo descrito por Vancini y col., (2008).

Interesantemente, también se observó la colocalización entre *M. hominis* y ATG8 en vacuolas autofágicas (Fig. 2B) que sugieren que *M. hominis* podría usarlas como vacuolas nodrizas para replicarse y luego ser expulsadas por *T. vaginalis* para infectar a las células del epitelio vaginal o que *T. vaginalis* resguarde a *M. hominis* para luego degradarlo y mantener controlada la población de esta bacteria en su interior.









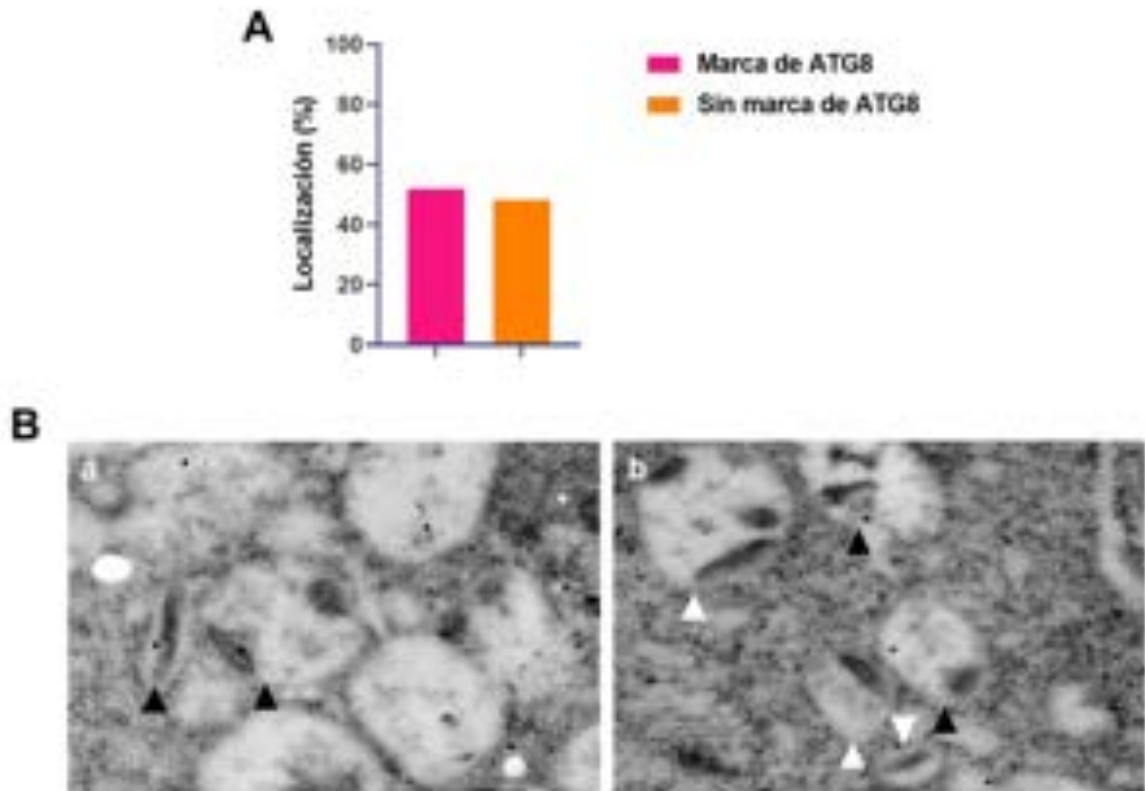


**Figura 1. El aislado CNCND 280 de *T. vaginalis* está infectado con *M. hominis*.**

**A.** Fluorescencia con DAPI y Sytox green que sugieren la presencia de un microorganismo ajeno a *T. vaginalis*. **B.** PCR-M del aislado CNCND 280 de *T. vaginalis* infectado con *M. hominis*, control negativo sin DNA y células HeLa. Bandas específicas de *M. hominis* se observaron a 334 pb. Bandas específicas de *T. vaginalis* se observaron a 112 pb. **C.** Microscopía electrónica de transmisión (MET), flechas negras señalan a *M. hominis*. **D. y E.** Alineamiento del producto de PCR de la 16S de *M. hominis* y  $\beta$ -tubulina de *T. vaginalis* con el DNA genómico reportado en NCBI de ambos microorganismos.







**Figura 2.** *M. hominis* el aislado Tv/Mh (+) se encuentra en vacuolas autofágicas. **A.** Porcentaje de colocalización entre *M. hominis* y ATG8 en vacuolas autofágicas en Tv/Mh (+). **B.** MET de Tv/Mh (+) que muestra con flechas negras las vacuolas con marca de ATG8 (partículas de 15 nm) que contienen a *M. hominis*, flechas blancas muestran vacuolas que contienen a *M. hominis* sin marca de ATG8.

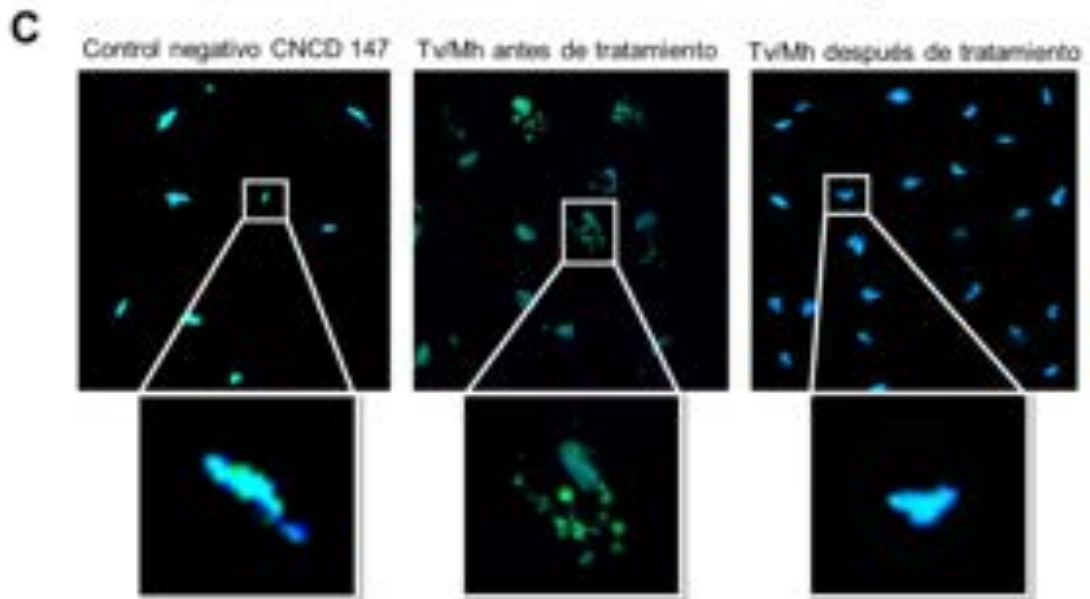
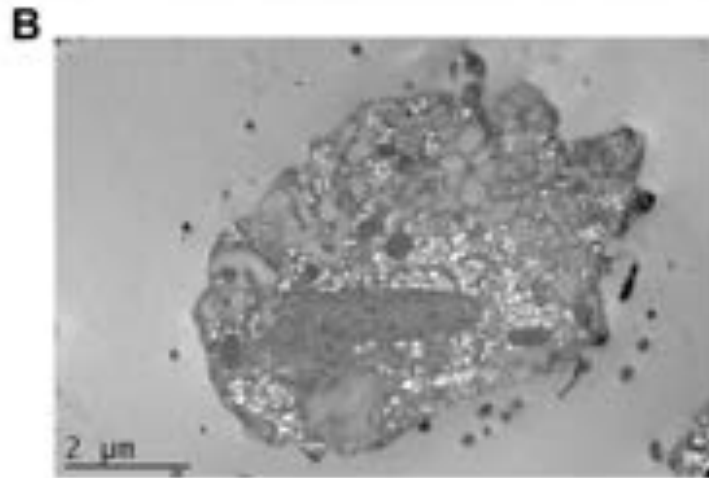
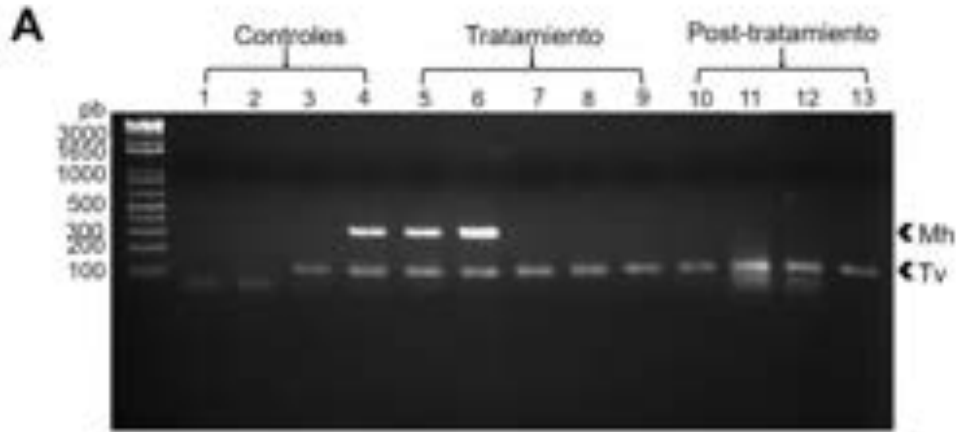


#### *Curación del aislado CNCD 280 Tv/Mh (+)*

Como parte de la estrategia de estudio del efecto de *M. hominis* en la patogenia de *T. vaginalis* se decidió eliminar a *M. hominis* del aislado CNCD 280 con un protocolo de curación de 5 días con cloranfenicol [50 µg/ml] y tetraciclina [5 µg/ml] en los que se extrajo DNA genómico en días intercalados y se realizaron PCR multiplex para corroborar la ausencia de *M. hominis*, se siguió por siete días sin tratamiento para verificar que el aislado siguiera limpio de *M. hominis* (Fig. 3A). Para comprobar la curación del aislado se realizó un ensayo de fluorescencia con Sytox green en el que se muestra la ausencia de marca de DNA extranuclear en el aislado post-tratamiento (Fig. 3C) y microscopía electrónica de transmisión en la que tampoco se observan los gránulos electrodensos característicos de *M. hominis* (Fig. 3B).

*T. vaginalis* tiene descritos a dos simbiontes, *M. hominis* y TVV, para corroborar la presencia de este último se realizó una extracción de DNAg en la que observamos que el aislado CNCD 280 se encuentra también en simbiosis con TVV y que esta no se ve afectada por el proceso de curación (Figura 4).



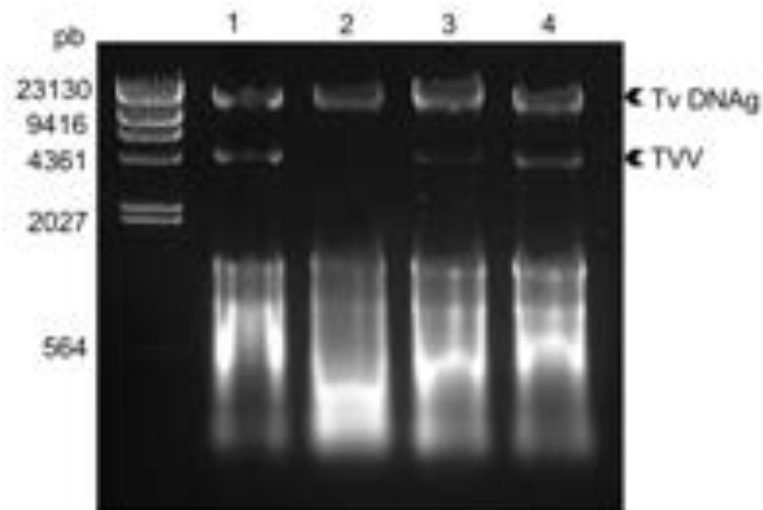




**Figura 3. Curación de CNCD 280 Tv/Mh (+).** **A.** PCR multiplex de días intercalados en el curso de la curación del aislado (líneas 5 a 9) en los que se observa la pérdida de la banda de *M. hominis* después del segundo día de curación. Se siguió por siete días pos-tratamiento para corroborar la estabilidad de la curación (líneas 10 a 13). Controles sin DNA, DNA de HeLa, DNA del aislado de *T. vaginalis* no infectado con *M. hominis* (CNCD 147) y el aislado de *T. vaginalis* infectado con *M. hominis* (CNCD 280) (líneas 1 a 4, respectivamente). **B.** MET de Tv/Mh (-) post-tratamiento. **C.** Fluorescencia con Sytox Green de CNCD 280 Tv/Mh (+) antes y después de la curación.







**Figura 4. Patrón del DNA genómico de diferentes aislados de Tv.** CNCD 190 como control positivo de la simbiosis con TVV (carril 1), CNCD 188 como control negativo de la simbiosis con TVV (carril 2), Tv/Mh (+) (carril 3), Tv/Mh (-) (carril 4). Banda de 4000 pb corresponde a TVV y banda de 23000 pb corresponde a DNAG de *T. vaginalis*. Las bandas de menor tamaño corresponden a RNA ribosomal.



*El aislado CNCND 280 Tv/Mh (+) sufre cambios morfológicos después de la curación*

Para verificar cambios en la morfología y el comportamiento que sigue el aislado CNCND 280 curado de *M. hominis* se realizó la evaluación de la morfología por MET y una curva de crecimiento de 24 h en condiciones normales de cultivo. Por MET se observa que el aislado Tv/Mh (-) está más vacuolado que el aislado Tv/Mh (+) (Fig. 6); además, tiene un comportamiento más agresivo cuando se encuentra en cultivos con una densidad mayor a  $1.5 \times 10^6$ . El aislado Tv/Mh (-) crece un 35.7% menos que el aislado Tv/Mh (+) (Fig. 5). Estos datos concuerdan con lo reportado por Margarita y col. (2016) en el que demuestran que los aislados infectados con *M. hominis* tienen una densidad parasitaria mayor de alrededor de un 40% en comparación de un aislado libre de *M. hominis*.



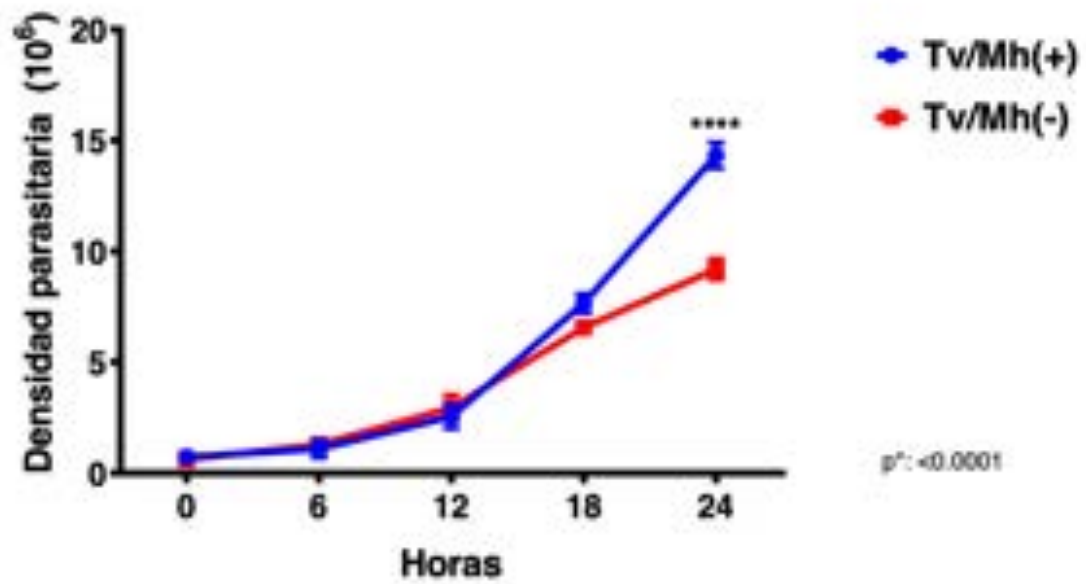
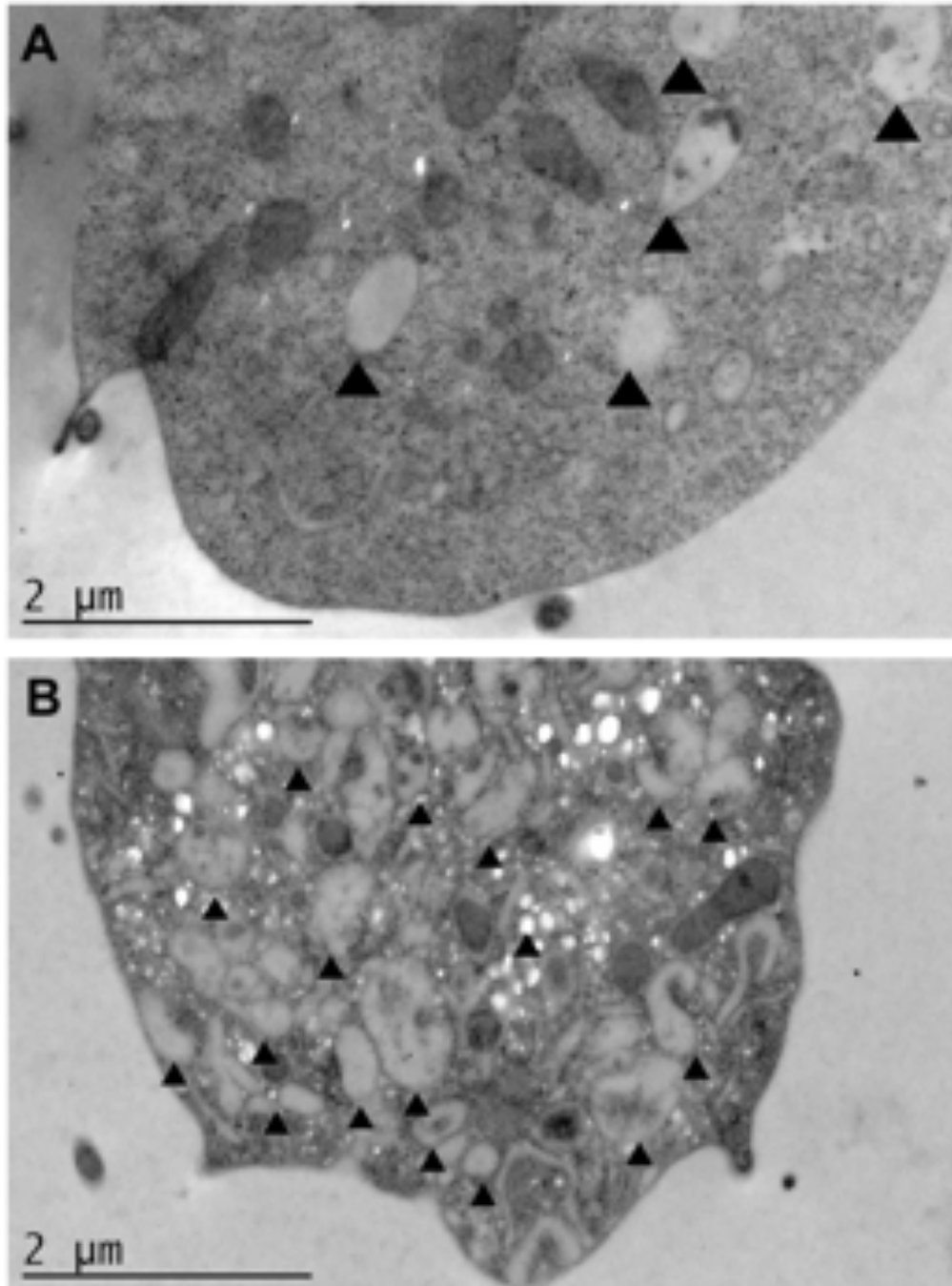


Figura 5. Curva de crecimiento de 24 horas de Tv/Mh (+) y Tv/Mh (-). El aislado Tv/Mh (+) crece un 37.5% más que el aislado libre de *M. hominis*.





**Figura 6.** Tw/Mh (-) está más vacuolado que Tw/Mh (+). MET de Tw/Mh (+) **A.** y Tw/Mh (-) **B.** que muestra una mayor presencia de vacuolas en Tw/Mh (-) señalado por triángulos negros.

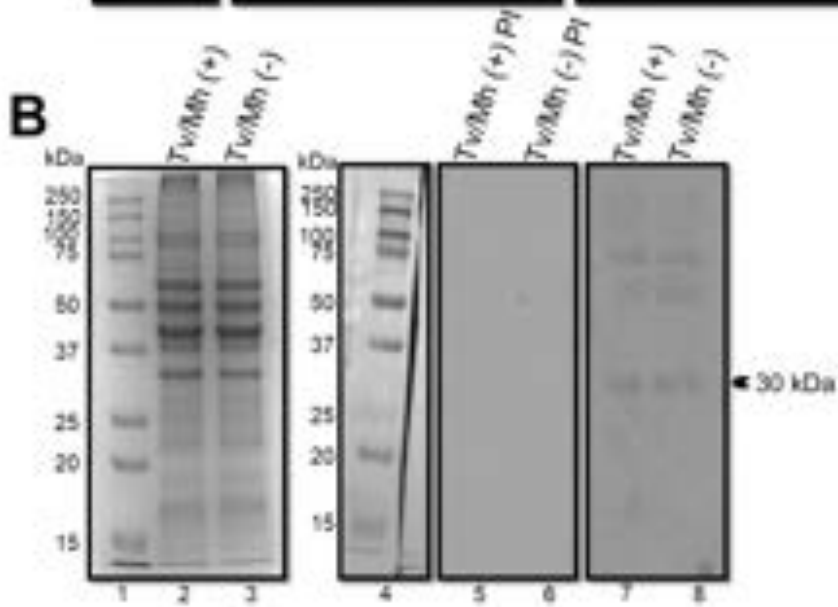
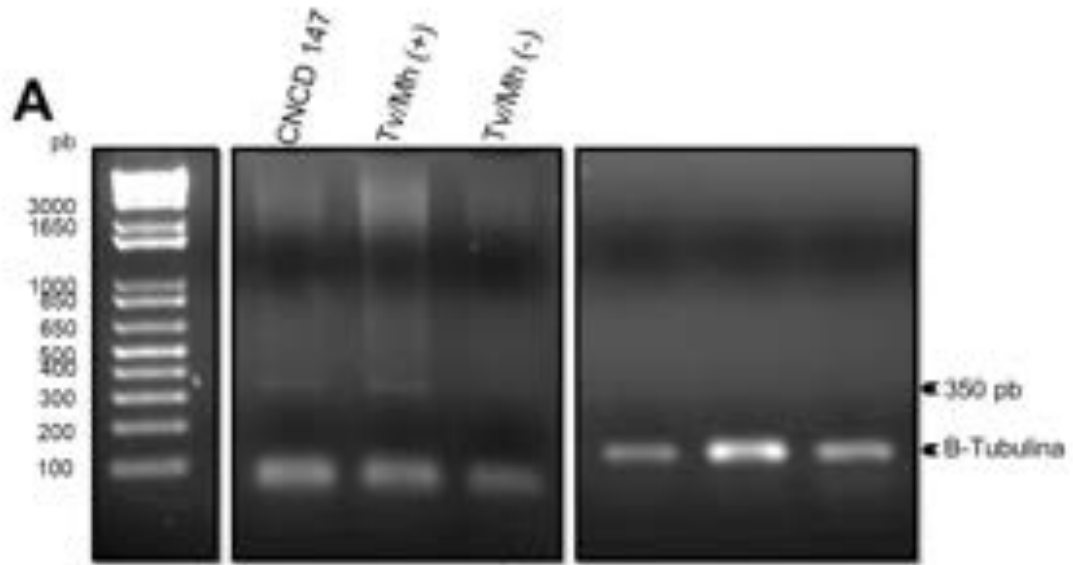




*Las proteasas TvCP2 y TvCP3 y el inhibidor endógeno TC-3 modifican su localización y expresión después de la curación*

Para evaluar si existe una diferencia en la expresión, localización y colocalización de las cisteína proteinasas TvCP2 y TvCP3 con respecto al inhibidor endógeno TC-3, se sintetizó cDNA a partir del RNA de ambos aislados (Tv/Mh (+) y Tv/Mh (-)) y se realizaron ensayos de RT-PCR para las tres proteínas. Ambas proteinasas se expresaron menos en el aislado Tv/Mh (-) (Figs. 8A y 9A), también el inhibidor endógeno TC-3 se expresó menos en el aislado Tv/Mh (-) (Fig. 7A). A nivel de proteína se observó que no existen cambios significativos en TvCP2 y TC-3 (Figs. 7B y 8B), pero sí en TvCP3 (Fig. 9B). Para conocer la localización y colocalización de las proteasas con TC-3 se realizaron ensayos de IFI y MET que demostraron que TvCP2 y TvCP3 colocalizan menos con TC-3 en el aislado libre de *M. hominis* (Figs. 8 y 9, paneles C-I). Además, ambas proteinasas en el aislado Tv/Mh (+) predominan principalmente en citoplasma, mientras que en el aislado Tv/Mh (-) se encuentran principalmente en vesículas. Esto podría sugerir que estas proteinasas se secretan en mayor cantidad y pueden causar mayor daño a las células huésped en el aislado curado (Figs. 8 y 9, paneles H-I).

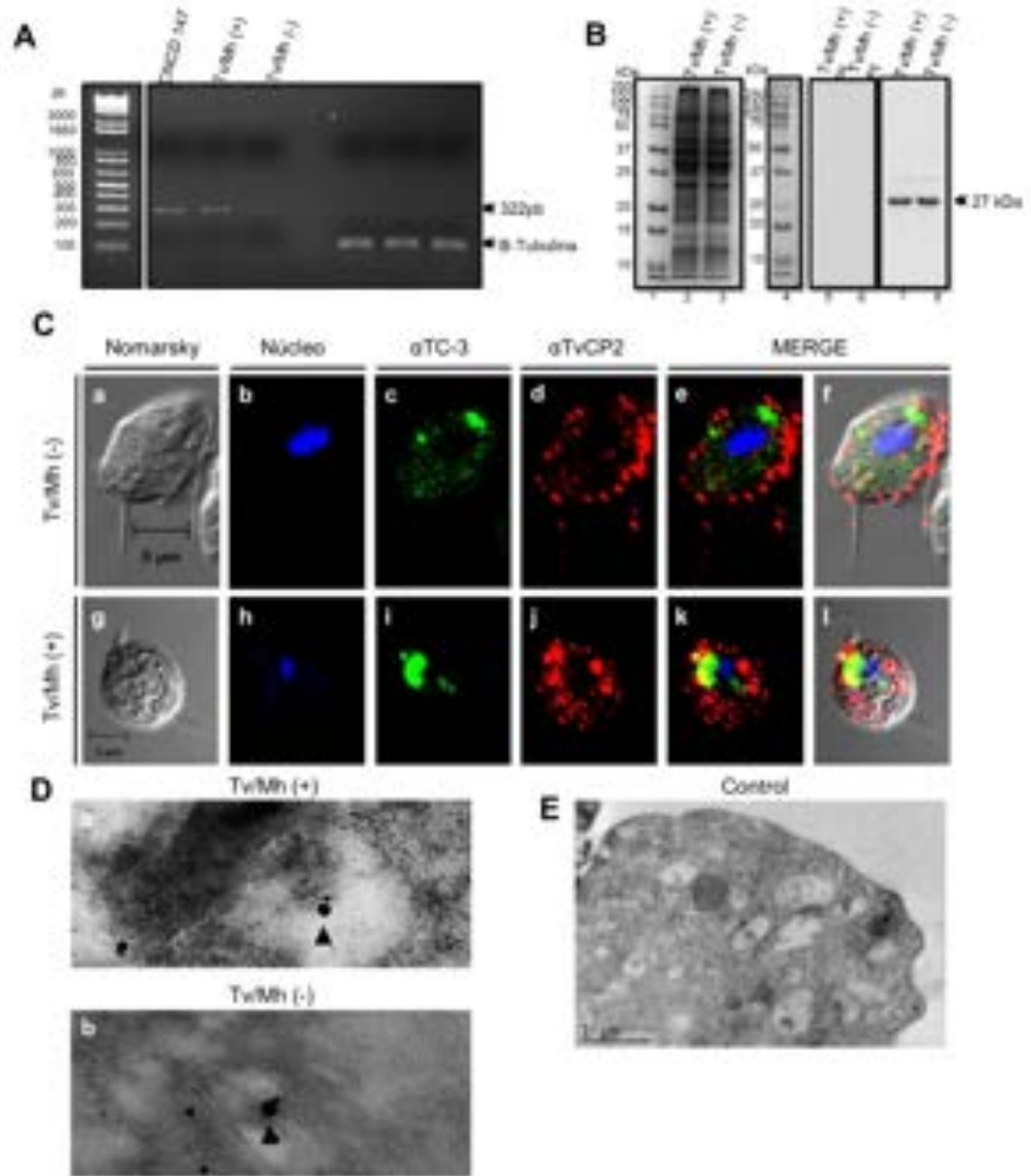






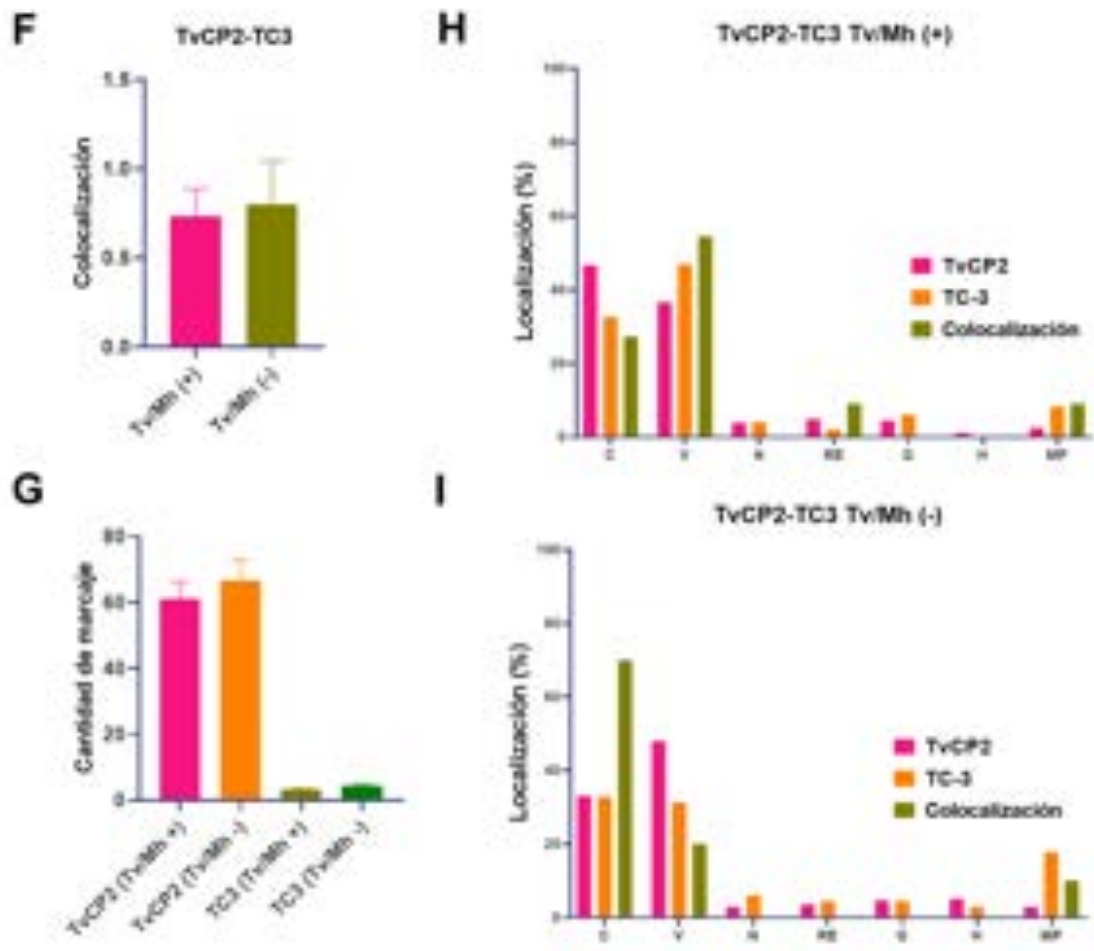
**Figura 7. El inhibidor endógeno TC-3 cambia su expresión a nivel de RNA, pero no a nivel proteico. A.** RT-PCR de TC-3 con CNCD 147 como control de expresión de TC-3 y a  $\beta$ -tubulina como control de carga. **B.** Western blot de TC-3 con extractos de Tv. Gel teñido con CCB: carriles 2 y 3 corresponden a Tv/Mh (+) y Tv/Mh (-) respectivamente. Ensayo de WB: carriles 5 y 6 corresponden a suero preinmune de conejo como control negativo para Tv/Mh (+) y Tv/Mh (-) respectivamente, carriles 7 y 8, anticuerpo policlonal anti-TC-3r contra Tv/Mh (+) y Tv/Mh (-) respectivamente.







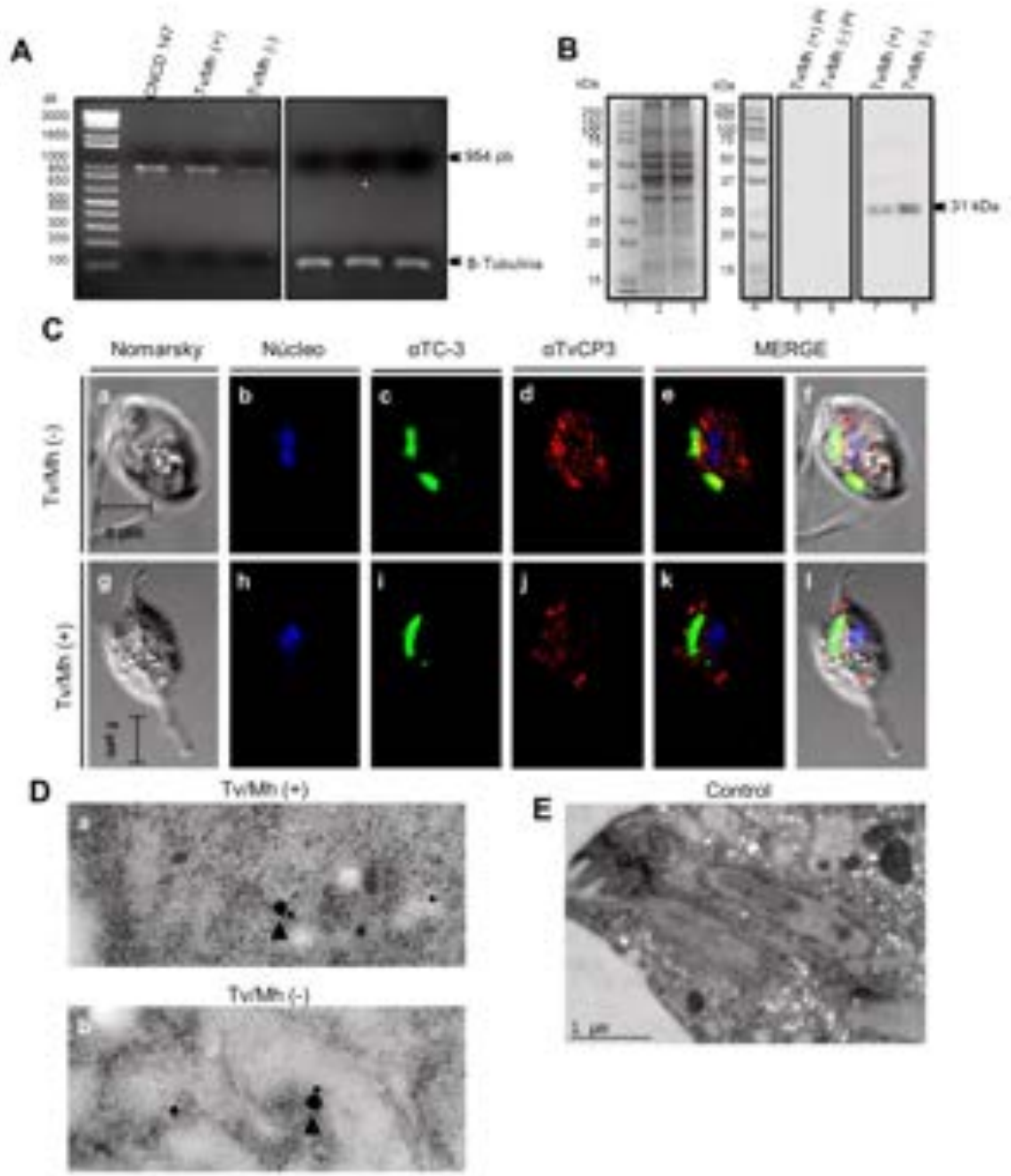




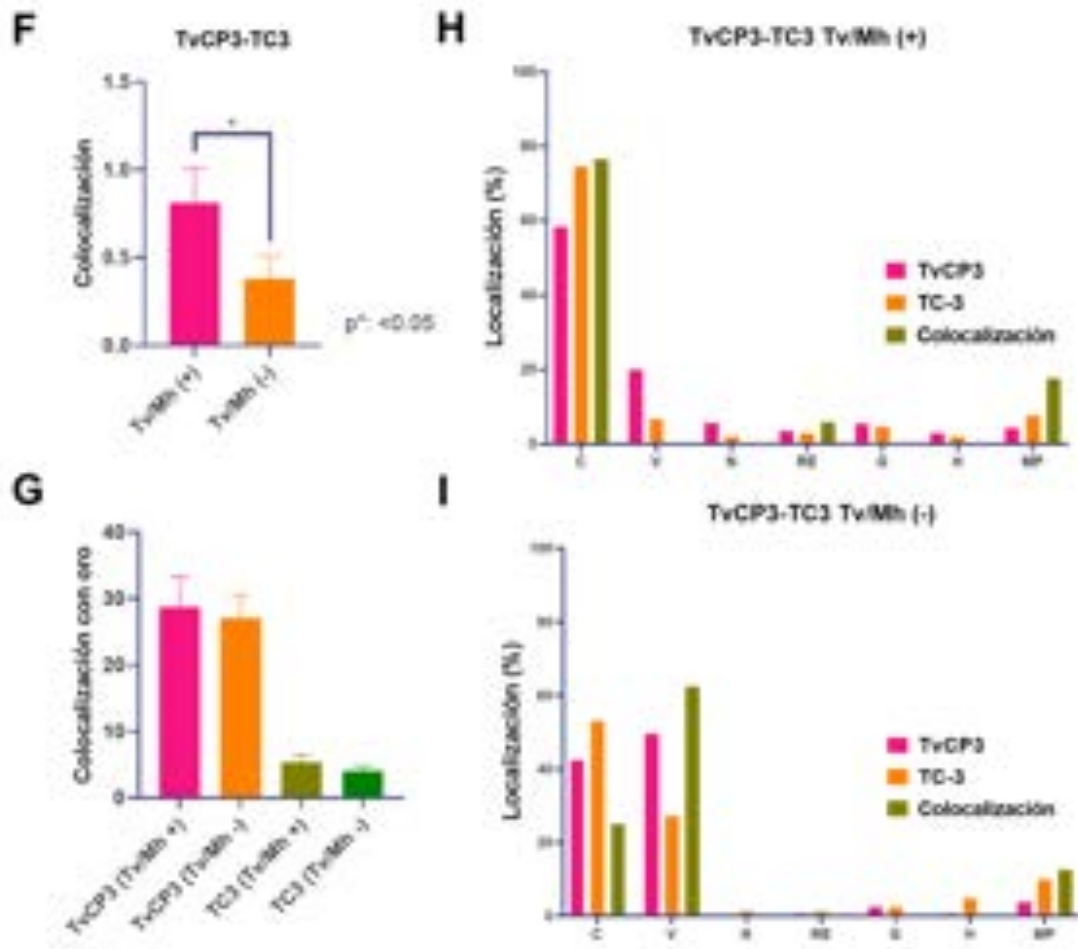


**Figura 8. La proteasa TvCP2 cambia su expresión y localización en el aislado Tv/Mh (-).** **A.** RT-PCR de TvCP2 con CNCD 147 como control de expresión de TvCP2 y a  $\beta$ -tubulina como control de carga. **B.** Western blot de TvCP2 con extractos de Tv. Gel teñido con CCB: carriles 2 y 3 corresponden a Tv/Mh (+) y Tv/Mh (-) respectivamente. Ensayo de WB: carriles 5 y 6 corresponden a suero preinmune de conejo como control negativo para Tv/Mh (+) y Tv/Mh (-) respectivamente, carriles 7 y 8, anticuerpo policlonal anti-TvCP2r contra Tv/Mh (+) y Tv/Mh (-) respectivamente. **C.** Análisis por microscopía confocal de la colocalización entre TvCP2 con anticuerpo de conejo marcado con Alexa 594 y TC-3 con anticuerpo de conejo marcado con FITC en los aislados Tv/Mh (+) (paneles g-i) y Tv/Mh (-) (paneles a-f). **D.** Colocalización con MET de TvCP2 con anticuerpos de conejo y partículas de 15 nm de oro (panel a) y TC-3 con anticuerpos de ratón y partículas de 30 nm de oro (panel b). **E.** Como control negativo de MET se colocó solamente el anticuerpo secundario. **F.** Análisis de la colocalización de TvCP2 y TC-3 entre Tv/Mh (+) y Tv/Mh (-). **G.** Análisis del promedio de marcaje individual de TvCP2 y TC-3 entre Tv/Mh (+) y Tv/Mh (-). **H.** Análisis de la localización del marcaje de TvCP2 y TC-3 en Tv/Mh (+). **I.** Análisis de la localización del marcaje de TvCP2 y TC-3 en Tv/Mh (-).













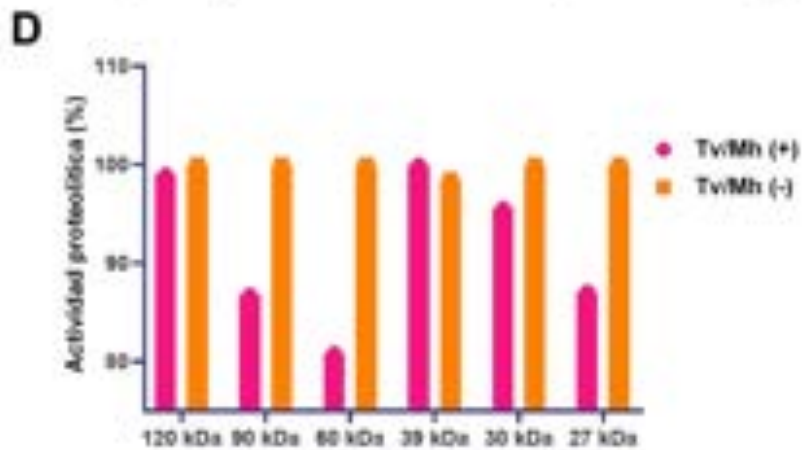
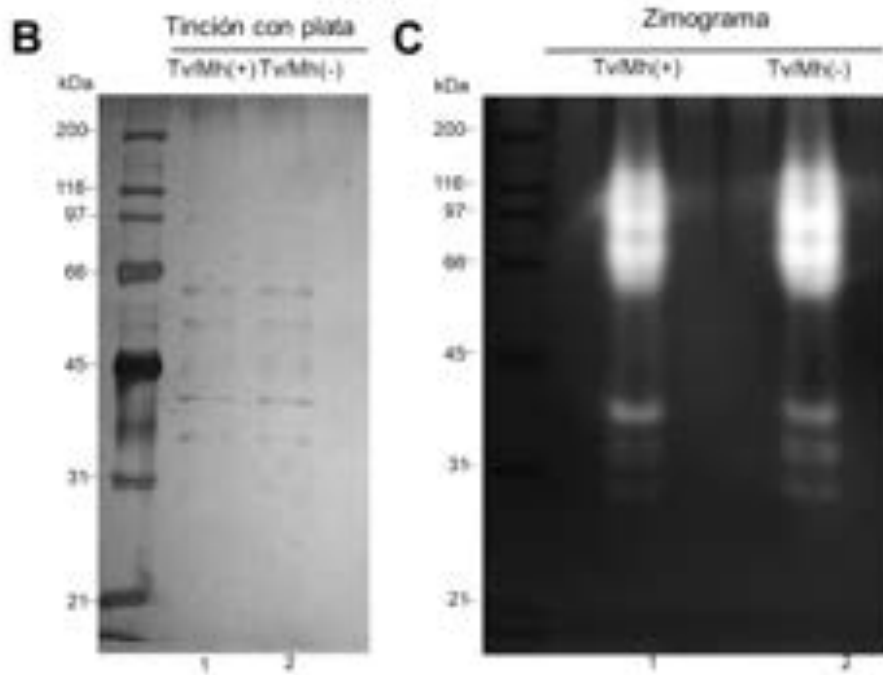
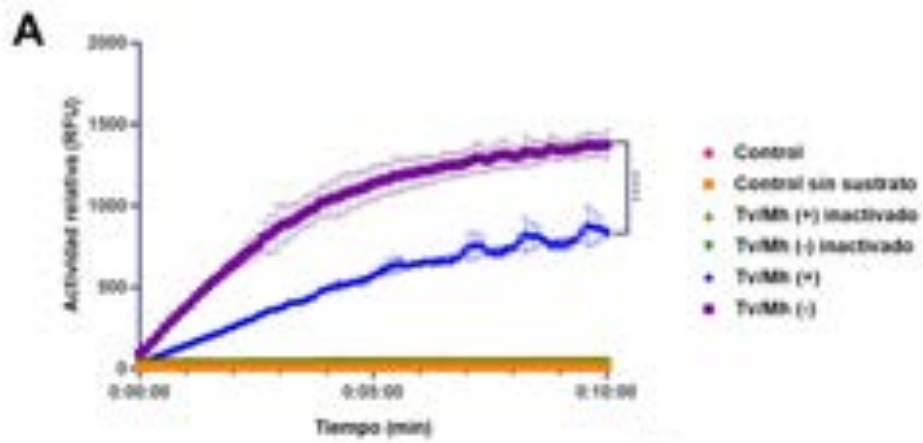
**Figura 9. La proteasa TvCP3 cambia su expresión, localización y su colocalización con TC3 en el aislado Tv/Mh (-).** **A.** RT-PCR de TvCP3 con CNCD 147 como control de expresión de TvCP3 y a  $\beta$ -tubulina como control de carga. **B.** Western blot de TvCP3 con extractos de Tv. Gel teñido con CCB: carriles 2 y 3 corresponden a Tv/Mh (+) y Tv/Mh (-) respectivamente. Ensayo de WB: carriles 5 y 6 corresponden a suero preinmune de conejo como control negativo para Tv/Mh (+) y Tv/Mh (-) respectivamente, carriles 7 y 8, anticuerpo policlonal anti-TvCP3r contra Tv/Mh (+) y Tv/Mh (-) respectivamente. **C.** Análisis por microscopía confocal de la colocalización entre TvCP3 con anticuerpo de conejo marcado con Alexa 594 y TC-3 con anticuerpo de conejo marcado con FITC en los aislados Tv/Mh (+) (paneles g-i) y Tv/Mh (-) (paneles a-f). **D.** Colocalización por MET de TvCP3 con anticuerpos de conejo y partículas de 15 nm de oro (panel a) y TC-3 con anticuerpos de ratón y partículas de 30 nm de oro (panel b). **E.** Como control negativo de MET se colocó solamente el anticuerpo secundario. **F.** Análisis de la colocalización de TvCP3 y TC-3 entre Tv/Mh (+) y Tv/Mh (-). **G.** Análisis del promedio de marcaje individual de TvCP3 y TC-3 entre Tv/Mh (+) y Tv/Mh (-). **H.** Análisis de la localización del marcaje de TvCP3 y TC-3 en Tv/Mh (+). **I.** Análisis de la localización del marcaje de TvCP3 y TC-3 en Tv/Mh (-).



*El aislado Tv/Mh (+) exagera su patogenicidad después de la eliminación de M. hominis*

Para conocer si existen cambios en la patogenicidad de *T. vaginalis* cuando se elimina la simbiosis con *M. hominis* se hicieron ensayos funcionales mediante ensayos de zimografía en una dimensión y ensayos de actividad proteolítica. Los ensayos de zimografía demuestran una mayor actividad proteolítica en el aislado Tv/Mh (-), principalmente en las regiones de 90, 60 y 27 kDa (Fig. 10B y C). El ensayo de actividad proteolítica fue realizado con el sustrato fluoregénico Z-Phe-Arg-MCA que es específico para evaluar la actividad de catepsinas L, el experimento nos demuestra una mayor actividad proteolítica en el aislado Tv/Mh (-), ambos resultados sustentan que el aislado libre de *M. hominis* es más activo proteolíticamente que el aislado con la bacteria.







**Figura 10. El aislado Tv/Mh (-) es más activo proteolíticamente que el Tv/Mh (+). A.** Actividad proteolítica de catepsinas L en Tv/Mh (+) y Tv/Mh (-) detectada por espectrofluorometría con un sustrato fluorogénico específico para catepsinas L. **B.** Control de carga proteica. **C.** Zimografía de Tv/Mh (+) y Tv/Mh (-). **D.** Análisis de la intensidad de las bandas en las regiones de 120, 90 60, 39, 30 y 27 kDa entre ambos aislados con Tv/Mh (-) como 100% de actividad.



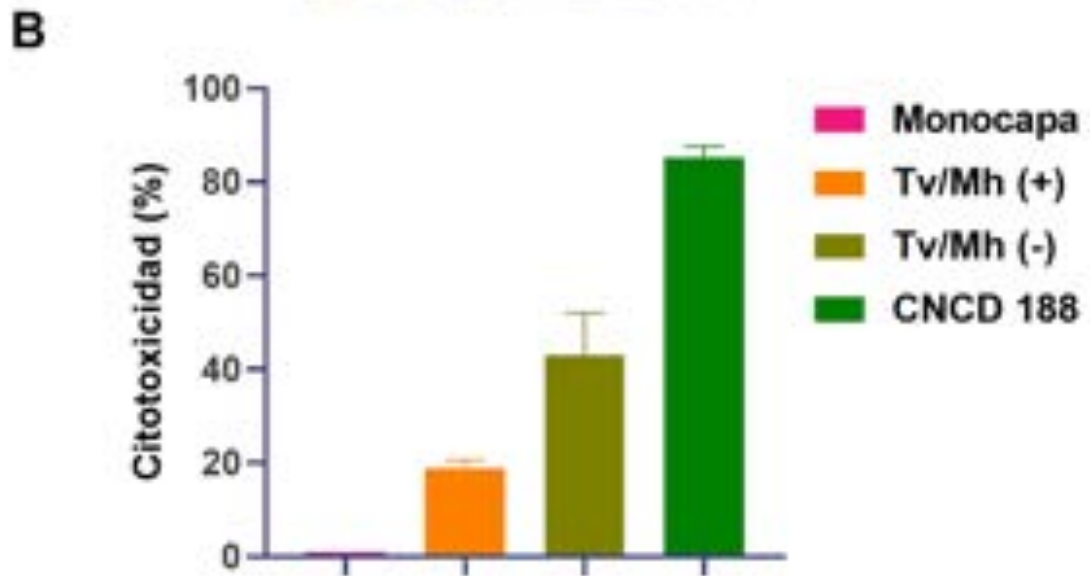
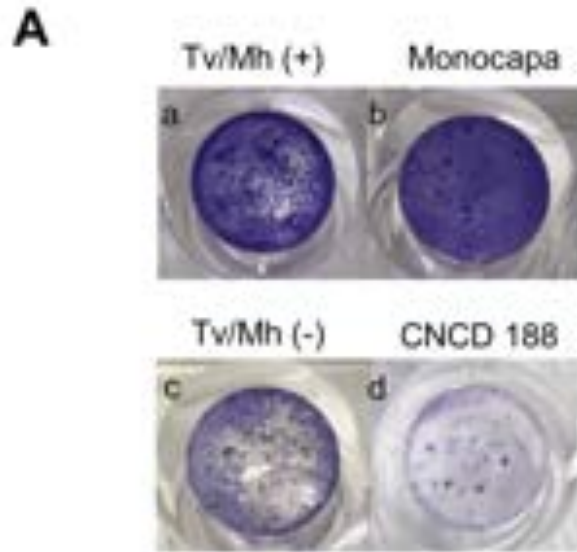


*El aislado Tv/Mh (-) es más patogénico que el aislado Tv/Mh (+)*

Para determinar si realmente existe un efecto en la patogénesis de *T. vaginalis* cuando un aislado en simbiosis con *M. hominis* es curado de esta bacteria, se realizó un ensayo de citotoxicidad que demostró que el aislado Tv/Mh (-) es más citotóxico cuando se pone a interactuar a *T. vaginalis* con células HeLa (Fig. 11).

*T. vaginalis* es un parásito del tracto genitourinario que es capaz de encontrarse en simbiosis con otros microorganismos, como TVV y *M. hominis*, nos muestran un panorama en el que la simbiosis entre ambos microorganismos le confiere a *T. vaginalis* la capacidad de reducir su patogenicidad, inducir probablemente menos síntomas en las mujeres infectadas y poder permanecer por tiempos más prolongados infectando.







**Figura 11. Tv/Mh (-) es más citotóxico que Tv/Mh (+) cuando interactúan con células HeLa. A.** Imagen representativa del ensayo de citotoxicidad realizado con Tv/Mh (+) y Tv/Mh (-), Monocapa sin interacción con *T. vaginalis* se usó como control negativo de destrucción y el aislado CNCD 188 se utilizó como control positivo de destrucción. **B.** Análisis comparativo del porcentaje de citotoxicidad entre ambos aislados, monocapa sin interacción con *T. vaginalis* fue usado como control negativo y 100% de monocapa y CNCD 188 fue utilizado como control positivo de la destrucción de la monocapa de células HeLa.



## Discusión

*T. vaginalis* es un parásito cuya virulencia depende del medio ambiente del tracto urogenital, de factores propios del protozoario e incluso de su relación con otros microorganismos simbiotes como virus (TVV) y bacterias (*M. hominis*, *C. M. gerendii* y *U. urealyticum*) (Ravel y col., 2011; Conrad y col., 2012; da Luz Becker y col., 2014). La simbiosis entre *T. vaginalis* y estos microorganismos ha demostrado tener un impacto significativo en la virulencia del protozoario. Cuando se encuentra en simbiosis con TVV los aislados son más virulentos y sensibles al tratamiento con metronidazol (Conrad y col., 2012, El-Gayar y col., 2016). La principal bacteria con la que se ha asociado a *T. vaginalis* es con *M. hominis*; los aislados de Tv infectados con Mh son más virulentos que los libres de esta bacteria. Esta simbiosis le ayuda a evadir la respuesta inmune del hospedero al impedir la producción de óxido nítrico (NO) de macrófagos, a aumentar su tasa de replicación, y sus niveles de fagocitosis, de hemólisis y de citotoxicidad (Vancini y col., 2008; Fiori y col., 2013; Margarita y col., 2016; Morada y col., 2010). Además, según Vancini y Benchimol, (2006) existen dos tipos de comportamiento entre distintos aislados de *T. vaginalis*; 1) los aislados permisivos a la simbiosis son considerados "naturalmente infectados", se caracterizan por mantener la simbiosis a largo plazo y *M. hominis* se observa en vesículas y libre en citoplasma de *T. vaginalis*; 2) mientras que un aislado no permisivo para la simbiosis se caracteriza por degradar a *M. hominis*, aunque no todas las bacterias son destruidas por completo.

En nuestro grupo de trabajo observamos que el aislado CNCD 280 está naturalmente infectado con *M. hominis* y TVV (Figs. 1, 4 y suplementaria 2), es un aislado tipo 1 (más virulento) que se caracteriza por no ser tan citotóxico como otros aislados de tipo 2 del grupo de trabajo como el aislado CNCD 188 que carece de simbiotes (Álvarez-Sánchez y col., 2000). Esta diferencia podría estar mediada por la presencia de uno o ambos simbiotes, contradiciendo lo reportado hasta el momento que indica que los aislados de *T. vaginalis* en simbiosis con *M. hominis* son más virulentos. Esta simbiosis podría conferirle a *T. vaginalis* la capacidad de regular su actividad proteolítica al inducir un aumento de inhibidores de proteasas como TC-3. Con el fin de evaluar el impacto en la expresión de TC-3 y sus cisteína





proteinasas blanco (TvCP2 y TvCP3) se estableció un modelo comparativo con *T. vaginalis* infectada con *M. hominis* CNCD 280 (Tv/Mh (+)) y el mismo aislado libre de *M. hominis* CNCD 280 (Tv/Mh (-)) al someterlo a tratamiento con antibióticos (Fig. 2). Una vez curado el aislado, por análisis de imágenes de MET y una cinética de crecimiento pudimos observar que el aislado Tv/Mh (+) crece un 35.7% más que el aislado Tv/Mh (-) (Fig. 5), corroborando los resultados de Margarita y col., (2016). Además, el aislado Tv/Mh (-) contiene más vacuolas en su interior que Tv/Mh (+), lo que podría indicar una mayor secreción de factores de virulencia del parásito cuando no se encuentra en simbiosis con *M. hominis* (Fig. 6). En condiciones de cultivo, Tv/Mh (-) mantiene un comportamiento más agresivo cuando se sobrepasa una densidad parasitaria de  $1 \times 10^6$ /ml (datos no mostrados) comparado con el cultivo de Tv/Mh (+) que si aguanta una densidad de  $2 \times 10^6$ /ml.

*T. vaginalis* posee el degradoma más grande entre protozoarios patógenos que se conoce hasta ahora, la mayoría de estas proteasas son de tipo CPs y están relacionadas principalmente con la citotoxicidad de *T. vaginalis* (Figueroa-Ángulo y col., 2012, Arroyo y col., 2015). Para contrarrestar la actividad de estas proteinasas, *T. vaginalis* utiliza inhibidores endógenos de CPs como TC-3, que actúa inhibiendo la actividad proteolítica de algunas CPs (Sánchez-Rodríguez y col., 2018; Miranda-Ozuna y col., 2019). Llama la atención que este inhibidor se expresa en mayor cantidad en el aislado de tipo 1 Tv/Mh (+), que por las características descritas por Conrad y col., (2012) debería ser un aislado más virulento que el tipo 2, pero Tv/Mh (+) ha demostrado no ser tan virulento.

Estas diferencias podrían estar vinculadas a la presencia de ambos simbiosis, *M. hominis* y TVV, sugiriendo un mecanismo de regulación de la patogenicidad del aislado que podría estar regulado por la doble simbiosis. Para demostrar esto analizamos a nivel de expresión, proteico y funcional a TC-3 y sus proteinasas blanco (TvCP2 y TvCP3) en Tv/Mh (+) y Tv/Mh (-). A nivel de expresión de RNA ambas proteinasas y TC-3 se expresan en menor cantidad en el aislado Tv/Mh (-) (Figs. 6A, 7A y 8A), mientras que a nivel proteico TvCP2 y TC-3 no muestran una diferencia significativa en la cantidad de proteína entre ambos aislados, pero TvCP3



muestra mayor cantidad de proteína en Tv/Mh (-) que en Tv/Mh (+) (Figs. 6B, 7B y 8B).

Aunque la cantidad proteica no varía mucho entre ambos aislados, un aspecto importante es la interacción entre las proteinasas y el inhibidor TC-3. Para comprobar si existe alguna diferencia en estas interacciones, se realizaron ensayos de IFI y MET en los que la colocalización entre TvCP2-TC-3 en Tv/Mh (+) y Tv/Mh (-) mostró un coeficiente de Pearson de 0.804 y 0.61, respectivamente. La colocalización entre TvCP3-TC-3 en Tv/Mh (+) y Tv/Mh (-) mostró un coeficiente de Pearson de 0.8372 y 0.558, respectivamente por IFI. Por inmunolocalización con oro y MET se corroboró la diferencia en la colocalización entre TvCP3 y TC-3, pero no para TvCP2 y TC-3. Sin embargo, un punto interesante es que a pesar de que no hay diferencia en la cantidad de proteína, éstas se relocalizaron. En Tv/Mh (+) estas proteínas se encuentran mayoritariamente en citoplasma, para luego de la curación encontrarse principalmente en vacuolas o vesículas. Esto sugiere que como se observó en la morfología celular, algunos de los factores de virulencia del parásito podrían secretarse y participar en el daño a las células huésped.

También pudimos observar que el 51.9% las vacuolas que contienen a *M. hominis* en Tv/Mh (+) poseen marca para ATG8, un marcador de vacuolas autofágicas, lo que sugiere que *T. vaginalis* podría degradar a *M. hominis* utilizando la vía de degradación de la autofagia, para mantener controlada la población bacteriana en su interior y aprovechar sus nutrientes. Sin embargo, no descartamos que tricomonas también podría utilizar estas vacuolas para expulsar a *M. hominis* y cumplir una función de caballo de Troya (Rapelli y col., 2001; Thu y col., 2018).

A nivel funcional, se analizaron los cambios entre ambos aislados mediante zimografía en una dimensión, actividad proteolítica total de CPs de tipo catepsinas L y ensayos de citotoxicidad. La zimografía mostró una mayor actividad proteolítica en Tv/Mh (-) con patrones diferenciales principalmente en las regiones de 90, 60 y 27 kDa. El ensayo de actividad proteolítica de tipo catepsinas L con sustrato fluorogénico específico para medir la actividad total de estas CPs que representan la actividad proteolítica más abundante en *T. vaginalis* (Carlton y col., 2007), se



observó que Tv/Mh (-) muestra más actividad proteolítica de catepsinas L que Tv/Mh (+). Estos resultados concuerdan con la zimografía y sugieren que la patogenicidad de Tv/Mh (+) se reduce por la simbiosis con Mh. Para corroborarlo, se hicieron ensayos de citotoxicidad de Tv contra monocapas de células HeLa, Tv/Mh (-) es 20% más citotóxico que Tv/Mh (+).

La simbiosis de *T. vaginalis* con *M. hominis* y TVV resulta en cambios en la morfología, comportamiento y crecimiento del parásito, así como en la expresión y localización de factores de virulencia como TC-3, TvCP2 y TvCP3 y se reduce la actividad proteolítica de tipo catepsinas L del aislado, lo que se refleja en una reducción de la citotoxicidad. Todas estas características sugieren que en este aislado de *T. vaginalis* la simbiosis doble induce una reducción en la patogenicidad del aislado, confiriéndole la capacidad de ser un mejor parásito y mantener el daño al huésped en niveles mínimos que le permitan a los simbiosis y al parásito mantenerse de forma crónica.

Aunque cabe destacar que estos resultados sugieren también que el impacto de la simbiosis en la actividad proteolítica y citotoxicidad del aislado no dependen exclusivamente a las proteinasas (TvCP2 y TvCP3) y del inhibidor endógeno TC-3, ya que la virulencia es multifactorial. Estos resultados no concuerdan con lo demostrado por otros grupos de investigación. Los estudios de Vancini y col., (2008) que indican que los aislados con *M. hominis* son más patogénicos fueron realizados con un aislado artificialmente infectado. Además, en el artículo de Vancini y Benchimol, (2008) se indicó la dificultad de estabilizar la simbiosis Tv/Mh, llegando a observar la destrucción de la mayoría de las bacterias en alrededor de 3 h. Además de que no se conoce qué tipo de aislado es el que usaron ni si posee o no al segundo simbiote (TVV). Así también los estudios de Fiori y col., (2013) y Margarita y col., (2016) también utilizaron un aislado artificialmente infectado con *M. hominis*. Está característica de no utilizar un aislado de Tv naturalmente infectado, como el utilizado en nuestro estudio podría repercutir en los resultados de los experimentos y por lo tanto ser diferentes a los de un aislado con una simbiosis ya establecida, como el caso del aislado CNCI 280 utilizado en nuestro trabajo.



Además, en estos estudios tampoco se plantea la presencia o ausencia de TVV como otro simbionte de *T. vaginalis* que también modifica la patogenicidad del parásito (Conrad y col., 2012; Graves y col., 2019).

Falta mucho camino por recorrer para conocer la verdadera naturaleza de la simbiosis en *T. vaginalis* y el impacto que ésta tiene en su biología. Los resultados obtenidos en este estudio nos indican que al curar al aislado de Tv CNC D 280 de uno de sus simbiontes (*M. hominis*) se induce un fenotipo más agresivo, por lo que, en este aislado la simbiosis doble le confiere la capacidad de reducir su patogenicidad.



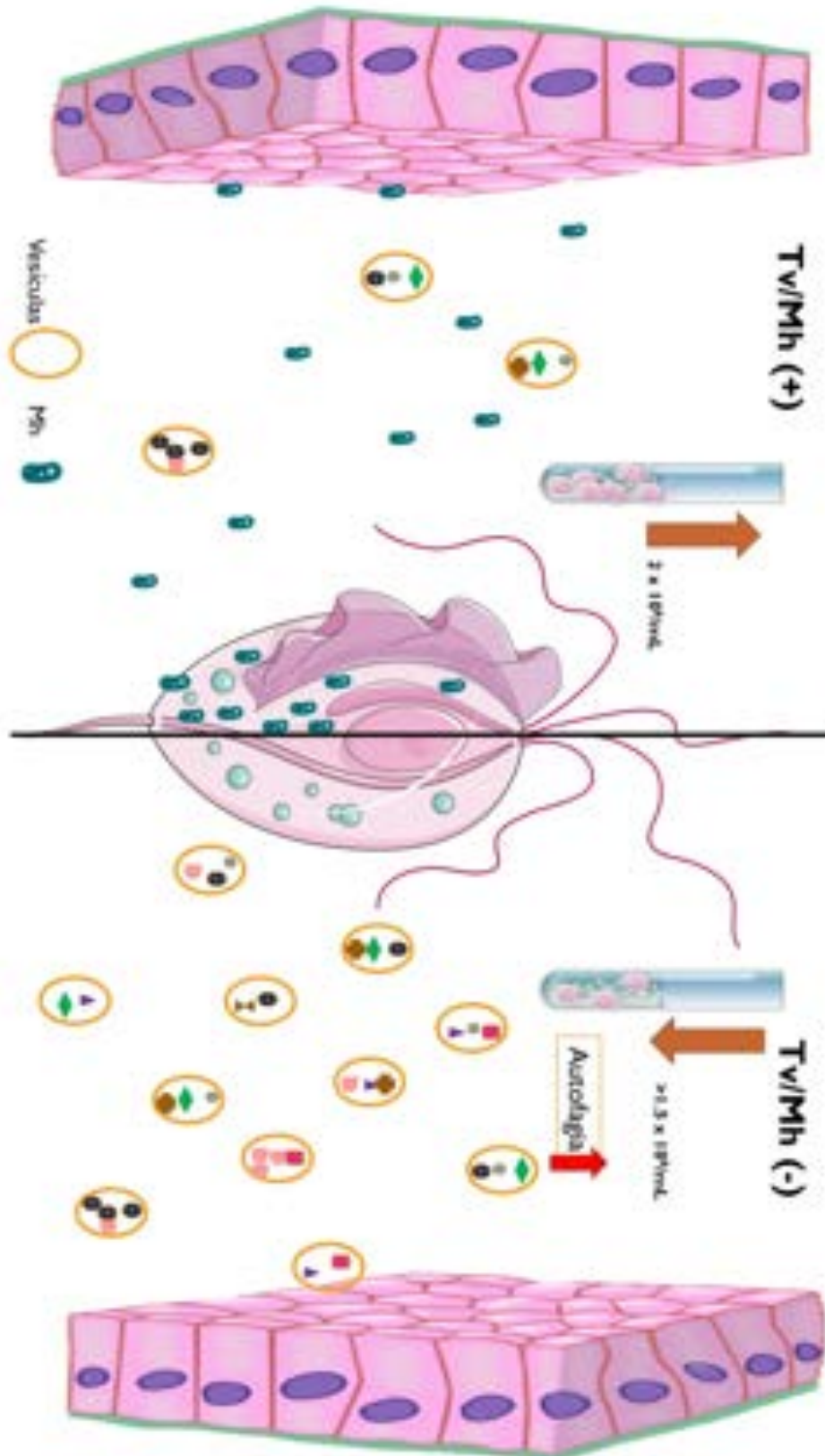


## Conclusiones

*T. vaginalis* es un parásito capaz de mantener relaciones simbióticas con otros microorganismos como *M. hominis*. Esta simbiosis resulta en cambios en la biología del parásito que le permiten modular su patogenicidad. En nuestro estudio pudimos demostrar que el aislado Tv/Mh (-) es más citotóxico y más activo proteolíticamente que el aislado Tv/Mh (+). A nivel de factores de factores de virulencia, escogimos al inhibidor endógeno TC-3, por presentar una mayor expresión en Tv/Mh (+) (aislado tipo 1) que en aislados de tipo 2, considerando que este inhibidor podría estar cumpliendo una función en la regulación de la patogenicidad de Tv cuando se encuentra en simbiosis. También escogimos a sus proteinasas blanco (TvCP2 y TvCP3) para evaluar su comportamiento después de la curación. Nuestros resultados sugieren que estos factores de virulencia se ven afectados a nivel de expresión de mRNA, que aunque no se refleja a nivel de la cantidad de proteína, si se observan cambios en su localización de citoplasma a vacuolas que podrían secretarse, aumentando la actividad proteolítica y citotoxicidad de *T. vaginalis*. También es importante destacar que Tv posee una gran cantidad de factores de virulencia, que no se reducen exclusivamente a las analizadas en este estudio que podrían estar contribuyendo al aumento en la virulencia que observamos.

La curación de uno de los simbiosis (Mh) de *T. vaginalis* resulta en un aumento en la patogenicidad del aislado y comprueba la teoría de que la simbiosis entre estos organismos es un mutualismo bien establecido que han perfeccionado por años para beneficio de los microorganismos involucrados (Tv y Mh).



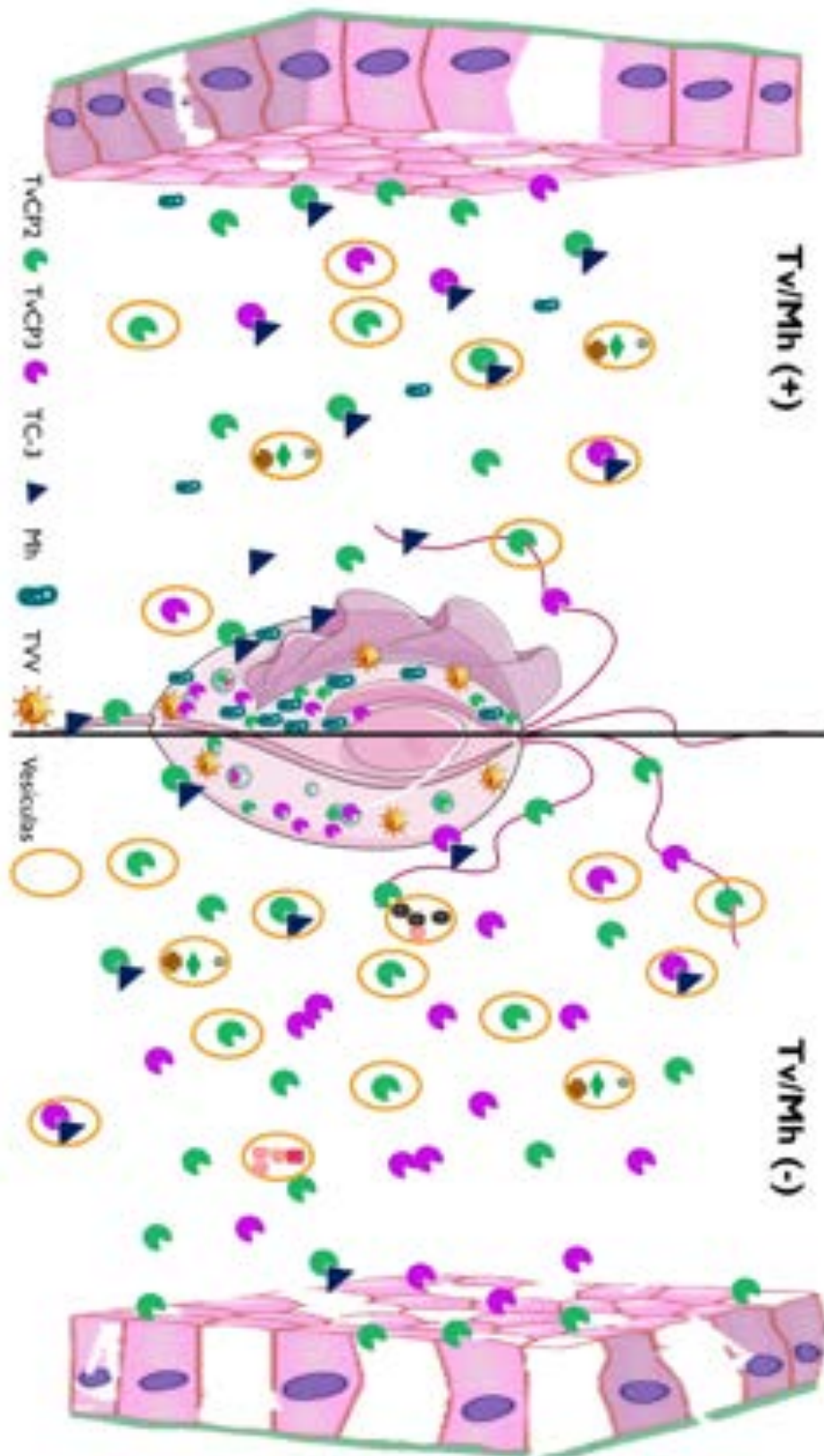




Resumen de conclusiones: comportamiento del aislado CNCD 280 Tv/Mh (+) vs Tv/Mh (-).

El aislado CNCD 280 Tv/Mh (+) alcanza una densidad parasitaria mayor en 24 h de cultivo comparado con el aislado CNCD 280 Tv/Mh (-). El comportamiento en cultivo *in vitro* continuo de los parásitos Tv/Mh (-) muestra que alcanza una densidad parasitaria máxima de  $1.5 \times 10^6$ /mL para un cultivo sano. Por arriba de esa densidad el cultivo comienza a decaer, al aumentar la vacuolización y la macroautofagia del parásito Tv/Mh (-).









Resumen de conclusiones: el aislado CNCND 280 Tv/Mh (-) es más citotóxico que el CNCND 280 Tv/Mh (+)

En el aislado CNCND 280 Tv/Mh (-) la colocalización entre TC-3 y las proteasas (TvCP2 y TvCP3) se observa más en citoplasma que en vacuolas. Estos datos sugieren la necesidad de autoprotección contra la actividad de las proteasas "libres". Las proteasas individuales se relocalizan a vacuolas y al no encontrarse asociadas a TC-3, se sugiere que podrían secretarse activas en mayor cantidad, principalmente TvCP2, junto con otros factores de virulencia del parásito, aumentando la citotoxicidad contra monocapas de células HeLa.



### **Perspectivas**

1. Realizar ensayos de qRT-PCR para corroborar la expresión diferencial de los genes que codifican para TvCP2, TvCP3 y TC-3 entre Tv/Mh (+) y Tv/Mh (-).
2. Obtener anticuerpos anti-Mh.
3. Comparar el impacto en la patogenicidad de un aislado de Tv tipo 2 con un solo simbionte (Mh (+)) cuando se cura de Mh.
4. Determinar diferencias bioquímicas entre un aislado tipo 1 y 2 Tv/Mh (+) que puedan influenciar en la estabilidad de la simbiosis.
5. Determinar la función de la autofagia de Mh en la estabilidad de la simbiosis.
6. Realizar ensayos de secreción y western blot contra TvCP2 y TvCP3.
7. Selección de clones de Tv para evaluar la heterogenicidad de la simbiosis con Mh y TVV.



## Bibliografía

Alvarez-Sánchez, M. a. E., Avila-González, L., Becerril-García, C., Fattel-Facenda, L. V., Ortega-López, J., & Arroyo, R. (2000). A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity. *Microbial Pathogenesis*, 28(4), 193-202.

Arroyo, R., Cárdenas-Guerra, R. E., Figueroa-Angulo, E. E., Puente-Rivera, J., Zamudio-Prieto, O., & Ortega-López, J. (2015). *Trichomonas vaginalis* cysteine proteinases: iron response in gene expression and proteolytic activity. *BioMed Research International*, 2015.

Arroyo, R., Engbring, J., & Alderete, J. (1992). Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*. *Molecular Microbiology*, 6(7), 853-862.

Becerril, A. (2014). *Parasitología Médica*. Vol 1. In: España. Edit. Mc. Grawhill.

Benchimol, M. (2004). Trichomonads under microscopy. *Microscopy and Microanalysis*, 10(5), 528-550.

Arroyo, R., González-Robles, A., Martínez-Palomo, A., Alderete, J. F. (1993). Signalling of *Trichomonas vaginalis* for amoeboid transformation and adhesin synthesis follows cytoadherence. *Molecular Microbiology*, 7(2), 299-309.

Blanchard, A., Yáñez, A., Dybvig, K., Watson, H. L., Griffiths, G., Cassell, G. H. (1993). Evaluation of intraspecies genetic variation within the 16S rRNA gene of *Mycoplasma hominis* and detection by Polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(5), 1358-1361.

Brotman, R. M., Bradford, L. L., Conrad, M., Gajer, P., Ault, K., Peralta, L., Ravel, J. (2012). Association between *Trichomonas vaginalis* and vaginal bacterial community composition among reproductive-age women. *Sexually Transmitted Diseases*, 39(10), 807.

Butler, S. E., Augustini, P., & Secor, W. E. (2010). *Mycoplasma hominis* infection of *Trichomonas vaginalis* is not associated with metronidazole-resistant trichomoniasis



in clinical isolates from the United States. *Parasitology Research*, 107(4), 1023-1027.

Capoccia, R., Greub, G., & Baud, D. (2013). *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* and adverse pregnancy outcomes. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 26(3), 231-240.

Carlton, J. M., Hirt, R. P., Silva, J. C., Delcher, A. L., Schatz, M., Zhao, Q., Besteiro, S. (2007). Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science*, 315(5809), 207-212.

CDC. (2013). Incidence, prevalence, and cost of sexually transmitted infections in the United States. 40, 1-4.

Conrad, M. D., Gorman, A. W., Schillinger, J. A., Fiori, P. L., Arroyo, R., Malla, N., Lal Dubey, M., Gonzalez, J., Blank, S., Secor, W. E., Carlton, J. M. (2012). Extensive genetic diversity, unique population structure and evidence of genetic exchange in the sexually transmitted parasite *Trichomonas vaginalis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(3), e1573.

da Luz Becker, D., dos Santos, O., Frasson, A. P., de Vargas Rigo, G., Macedo, A. J., & Tasca, T. (2015). High rates of double-stranded RNA viruses and *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis* clinical isolates in South Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*, 34, 181-187.

Dessi, D., Delogu, G., Emonte, E., Catania, M. R., Fiori, P. L., & Rappelli, P. (2005). Long-term survival and intracellular replication of *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis* cells: potential role of the protozoan in transmitting bacterial infection. *Infection and Immunity*, 73(2), 1180-1186.

Diamond, L. S. (1957). The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *The Journal of Parasitology*, 43(4), 488-490.

Diaz, N., Dessi, D., Dessole, S., Fiori, P. L., & Rappelli, P. (2010). Rapid detection of coinfections by *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, and *Ureaplasma*





*urealyticum* by a new multiplex polymerase chain reaction. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 67(1), 30-36.

Dimijian, G. G. (2000). Evolving together: the biology of symbiosis, part 1. *Proceedings (Baylor University. Medical Center)*, 13(3), 217–226.

El-Gayar, E. K., Mokhtar, A. B., & Hassan, W. A. (2016). Molecular characterization of double-stranded RNA virus in *Trichomonas vaginalis* Egyptian isolates and its association with pathogenicity. *Parasitology research*, 115(10), 4027-4036.

Fichorova, R., Fraga, J., Rappelli, P., & Fiori, P. L. (2017). *Trichomonas vaginalis* infection in symbiosis with *Trichomonasvirus* and *Mycoplasma*. *Research in Microbiology*, 168(9-10), 882-891.

Figueroa-Angulo, E. E., Calla-Choque, J. S., Mancilla-Olea, M. I., & Arroyo, R. J. B. (2015). RNA-binding proteins in *trichomonas vaginalis*: atypical multifunctional proteins. *Biomolecules*, 5(4), 3354-3395.

Figueroa-Angulo, E. E., Rendón-Gandarilla, F. J., Puente-Rivera, J., Calla-Choque, J. S., Cárdenas-Guerra, R. E., Ortega-López, J., Arroyo, R. (2012). The effects of environmental factors on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. *Microbes and Infection*, 14(15), 1411-1427.

Fiori, P. L., Diaz, N., Cocco, A. R., Rappelli, P., & Dessì, D. (2013). Association of *Trichomonas vaginalis* with its symbiont *Mycoplasma hominis* synergistically upregulates the in vitro proinflammatory response of human monocytes. *Sexually Transmitted Infections*, 89,449–454.

Fürnkranz, U., Henrich, B., & Walochnik, J. (2018). *Mycoplasma hominis* impacts gene expression in *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology Research*, 117(3), 841-847.

Graves, K. J., Ghosh, A. P., Kissinger, P. J., & Muzny, C. A. (2019). *Trichomonas vaginalis* virus: a review of the literature. *International journal of STD & AIDS*, 30(5), 496-504.

Guenther, P. C., Secor, W. E., & Dezzutti, C. (2005). *Trichomonas vaginalis*-induced epithelial monolayer disruption and human immunodeficiency virus type 1



(HIV-1) replication: implications for the sexual transmission of HIV-1. *Infection and Immunity*, 73(7), 4155-4160.

Huang, C., Zhu, H., Xu, K., Wang, S., Fan, L., & Zhu, W. J. A. (2015). *Mycoplasma* and *Ureaplasma* infection and male infertility: a systematic review and meta-analysis. *Andrology*, 3(5), 809-816.

Huang, K.-Y., Chen, Y.-Y. M., Fang, Y.-K., Cheng, W.-H., Cheng, C.-C., Chen, Y.-C., Lin, R., Tang, P. (2014). Adaptive responses to glucose restriction enhance cell survival, antioxidant capability, and autophagy of the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1840(1), 53-64.

Krieger, J. N., Jenny, C., Verdon, M., Siegel, N., Springwater, R., Critchlow, C. W., & Holmes, K. K. (1993). Clinical manifestations of trichomoniasis in men. *Annals of Internal Medicine*, 118(11), 844-849.

Kummer, S., Hayes, G. R., Gilbert, R. O., Beach, D. H., Lucas, J. J., & Singh, B. N. (2008). Induction of human host cell apoptosis by *Trichomonas vaginalis* cysteine proteases is modulated by parasite exposure to iron. *Microbial Pathogenesis*, 44(3), 197-203.

Lee, K. E., Kim, J. H., Jung, M. K., Arii, T., Ryu, J.-S., & Han, S. S. (2009). Three-dimensional structure of the cytoskeleton in *Trichomonas vaginalis* revealed new features. *Journal of Electron Microscopy*, 58(5), 305-313.

López-García, P., Erme, L., Moreira, D. (2017). Symbiosis in eucaryotic evolution. *Journal of Theoretical Biology*, 434, 20-33.

Macilla-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., 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.



Madico, G., Quinn, T. C., Rompalo, A., Mckee, K. T., Gaydos, C. A. (1998). Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection by PCR using vaginal swabs samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(11), 3205-3210.

Margarita, V., Rappelli, P., Dessì, D., Pintus, G., Hirt, R. P., & Fiori, P. L. (2016). Symbiotic association with *Mycoplasma hominis* can influence growth rate, ATP production, cytolysis and inflammatory response of *Trichomonas vaginalis*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 953.

McClelland, R. S., Sangaré, L., Hassan, W. M., Lavreys, L., Mandaliya, K., Kiarie, J., Ndinya-Anchola, J., Jaoko, W., Baeten, J. M., (2007). Infection with *Trichomonas vaginalis* increases the risk of HIV-1 acquisition. *The Journal of Infectious Diseases*, 195(5), 698-702.

Mercer, F., Diala, F. G. I., Chen, Y.-P., Molgora, B. M., Ng, S. H., & Johnson, P. J. (2016). Leukocyte lysis and cytokine induction by the human sexually transmitted parasite *Trichomonas vaginalis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(8), e0004913.

Mercer, F., & Johnson, P. J. (2018). *Trichomonas vaginalis*: Pathogenesis, Symbiont Interactions, and Host Cell Immune Responses. *Trends in Parasitology*.

Miranda-Ozuna, J. F., Hernández-García, M. S., Briebe, L. G., Benítez-Cardoza, C. G., Ortega-López, J., González-Robles, A., & Arroyo, R. (2016). The Glycolytic Enzyme Triosephosphate Isomerase of *Trichomonas vaginalis* (TvTIM) is a Surface-Associated Protein Induced by Glucose that Functions as a Laminin-and Fibronectin-Binding Protein. *Infection and Immunity*, IAI. 00538-00516.

Miranda-Ozuna, J. F., Rivera-Rivas, L. A., Cárdenas-Guerra, R. E., Hernández-García, M. S., Rodríguez-Cruz, S., González-Robles, A., ... & Arroyo, R. (2019). Glucose-restriction increases *Trichomonas vaginalis* cellular damage towards HeLa cells and proteolytic activity of cysteine proteinases (CPs), such as TvCP2. *Parasitology*, 1-11.



Morada, M., Manzur, M., Lam, B., Tan, C., Tachezy, J., Rappelli, P., Dessì, D., Fiori, P. L., Yariett, N. (2010). Arginine metabolism in *Trichomonas vaginalis* infected with *Mycoplasma hominis*. *Microbiology* 156(12), 3734-3743.

Moran, N. A. (2006). Symbiosis. *Current Biology*, 16(20), 1.

Nielsen, M. H., & Nielsen, R. (1975). Electron microscopy of *Trichomonas vaginalis* Donne: interaction with vaginal epithelium in human trichomoniasis. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology*, 83(4), 305-320.

Noël, C. J., Diaz, N., Sicheritz-Ponten, T., Safarikova, L., Tachezy, J., Tang, P., Fiori, P. L., Hirt, R. P. (2010). *Trichomonas vaginalis* vast BspA-like gene family: evidence for functional diversity from structural organisation and transcriptomics. *BMC Genomics*, 11, 99.

Oliveira, A. S., Xavier-Filho, J., Sales, M. P. (2003). Cysteine proteinases and cystatins. *Brazilian Archives of Biology and Technology: An International Journal*, 46(1), 91-104.

Paterson, G. N., Ritting, M., Siddiqui, R., Khan, N. A. (2011). Is *Acanthamoeba* pathogenicity associated with intracellular bacteria?. *Experimental Parasitology*. 129, 207-210.

Petrin, D., Delgaty, K., Bhatt, R., & Garber, G. (1998). Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(2), 300-317.

Poole, D. N., & McClelland, R. S. (2013). Global epidemiology of *Trichomonas vaginalis*. *Sexually Transmitted Infections*, 89(6), 418-422.

Puente-Rivera, J., Ramón-Luing, L. de los Ángeles, Figueroa-Angulo, E. E., Ortega-López, J., 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 & Cell Biology* 54, 255-265.

Puente-Rivera, J., Villalpando, J. L., Villalobos-Osnaya, A., Vázquez-Carrillo, L. I., León-Ávila, G., Ponce-Regalado, M. D., López-Camarillo, C., Elizalde-Contreras, J. M., Ruiz-May, E., Arroyo, R., Álvarez-Sánchez, M. E. (2017). The 50 kDa





metalloproteinase TvMP50 is a zinc-mediated *Trichomonas vaginalis* virulence factor. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 217, 32-41.

Ramón-Luing, L. de los Ángeles, Rendón-Gandarilla, F. J., Puente-Rivera, J., Ávila-González, L., & Arroyo, R. (2011). Identification and characterization of the immunogenic cytotoxic TvCP39 proteinase gene of *Trichomonas vaginalis*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 43(10), 1500-1511.

Rappelli, P., Addis, M. F., Carta, F., Fiori, P. L. (1998). *Mycoplasma hominis* parasitism of *Trichomonas vaginalis*. *The Lancet*, 352, 1286.

Rappelli, P., Carta, F., Delogu, G., Addis, M. F., Dessì, D., Cappuccinelli, P., & Fiori, P. L. (2001). *Mycoplasma hominis* and *Trichomonas vaginalis* symbiosis: multiplicity of infection and transmissibility of *M. hominis* to human cells. *Archives of Microbiology*, 175(1), 70-74.

Ravel, J., Gajer, P., Abdo, Z., Schneider, G. M., Koenig, S. S. K., McCulle, S. L., Karlebach, S., Gorle, R., Russel, J., Tacket, C. O., Brotman, R. M., Davis, C. C., Ault, K., Peralta., Forney, L. J. (2011). Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(Suppl 1), 4680–4687.

Razin, S (1978). The Mycoplasmas. *Microbiological Reviews*, 42(2), 414-470.

Rendón-Gandarilla, F. J., Ramón-Luing, L. d. I. A., Ortega-López, J., Rosa de Andrade, I., Benchimol, M., & Arroyo, R. (2013). The TvLEGU-1, a legumain-like cysteine proteinase, plays a key role in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *BioMed Research International*, 2013.

Rivera-Tapia, J.-A., Cedillo-Ramirez, M.-L., Gill Juarez, C (2002). Some biological features of Mollicutes. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 44(2), 53-57.

Roachford, O.-St.E., Nelson, K.-E., Mohapatra, B.-R (2017). Comparative genomics of four *Mycoplasma* species of the human urogenital tract: Analysis of their core genomes and virulence genes. *International Journal of Medical Microbiology*, 307(8), 508-520.



Rowley, J., Vander Hoorn, S., Korenromp, E., Low, N., Unemo, M., Abu-Raddad, L. J., & Thwin, S. (2019). Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: global prevalence and incidence estimates, 2016. *Bull World Health Organ*.

Sajid, M., McKerrow, J. H. (2002). Cysteine proteases of parasitic organisms. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 120, 1-21.

Sommer, U., Costello, C. E., Hayes, G. R., Beach, D. H., Gilbert, R. O., Lucas, J. J., & Singh, B. N. (2005). Identification of *Trichomonas vaginalis* cysteine proteases that induce apoptosis in human vaginal epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280(25), 23853-23860.

Soper, D. (2004). Trichomoniasis: under control or undercontrolled? *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 190(1), 281-290.

Sorvillo, F., Smith, L., Kerndt, P., & Ash, L. (2001). *Trichomonas vaginalis*, HIV, and African-Americans. *Emerging Infectious Diseases*, 7(6), 927.

Sutton, M., Sternberg, M., Koumans, E. H., McQuillan, G., Berman, S., & Markowitz, L. (2007). The prevalence of *Trichomonas vaginalis* infection among reproductive-age women in the United States, 2001–2004. *Clinical Infectious Diseases: an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 45(10), 1319-1326.

Swygard, H., Sena, A., Hobbs, M., & Cohen, M. (2004). Trichomoniasis: clinical manifestations, diagnosis and management. *Sexually Transmitted Diseases*, 80(2), 91-95.

Sánchez-Rodríguez, D. B., Ortega-López, J., Cárdenas-Guerra, R. E., Reséndiz-Cardiel, G., Chávez-Munguía, B., Lagunes-Guillen, A., Arroyo, R. (2018). Characterization of a novel endogenous cysteine proteinase inhibitor, trichocystatin-3 (TC-3), localized on the surface of *Trichomonas vaginalis*. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 102, 87-100.

Seo, J. H., Yang, H. W., Joo, S. Y., Song, S. M., Lee, Y. R., Ryu, J. S., ... Hong, Y. (2014). Prevalence of *Trichomonas vaginalis* by PCR in men attending a primary



care urology clinic in South Korea. *The Korean journal of parasitology*, 52(5), 551–555. doi:10.3347/kjp.2014.52.5.551

Taylor-Robinson, D. (1998). *Mycoplasma hominis* parasitism of *Trichomonas vaginalis*. *The Lancet*, 352(9145), 2022-2023.

Taylor-Robinson, D., Lamont, R. (2011). Mycoplasmas in pregnancy. *BJOG An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 118(2), 164-174.

Torres-Romero, J., & Arroyo, R. (2009). Responsiveness of *Trichomonas vaginalis* to iron concentrations: evidence for a post-transcriptional iron regulation by an IRE/IRP-like system. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(6), 1065-1074.

Thi Trung Thu, T., Margarita, V., Cocco, A. R., Marongiu, A., Dessi, D., Rappelli, P., & Fiori, P. L. (2018). *Trichomonas vaginalis* transports virulent *Mycoplasma hominis* and transmits the infection to human cells after metronidazole treatment: a potential role in bacterial invasion of fetal membranes and amniotic fluid. *Journal of pregnancy*, 2018.

Van Der Pol, B. (2007). *Trichomonas vaginalis* infection: the most prevalent nonviral sexually transmitted infection receives the least public health attention. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 44(2), 366-373.

van der Schee, C., Sluiters, H. J., van der Meijden, W. I., van Beek, P., Peerbooms, P., Verbrugh, H., & van Belkum, A. (2001). Host and pathogen interaction during vaginal infection by *Trichomonas vaginalis* and *Mycoplasma hominis* or *Ureaplasma urealyticum*. *Journal of Microbiological Methods*, 45(1), 61-67.

Vancini, R., Pereira-Neves, A., Borojevic, R., Benchimol, M. (2008). *Trichomonas vaginalis* harboring *Mycoplasma hominis* increases cytopathogenicity in vitro. *Archives of Microbiology*, 27(4), 259.

Vancini, R. G., & Benchimol, M. (2008). Entry and intracellular location of *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis*. *European Journal of Clinical*



*Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 189(1), 7-18.

Vikki, M. (2000). Gynaecological infections as risk determinants of subsequent cervical neoplasia. *Acta Oncológica*, 39(1), 71-75.

Waites, K.-B., Xiao, L (2015). Mycoplasmas and Ureaplasmas of Humans. *Molecular Medical Microbiology (second edition)*, Vol. 3, 1587-1609.

P., Krieger, J. N., Stevens, C. E., Kiviat, N. B., Koutsky, L., Critchlow, C., DeRouen, T., Hillier, S., Holmes, K. K. (1989). Clinical manifestations of vaginal trichomoniasis. *Journal of the American Medical Association*, 263, 1936-1941.

Xiao, J., Xie, L., Fang, S., Gao, M., Zhu, Y., Song, L., Zhong, H. M., Lun, Z. (2006). Symbiosis of *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis* may link metronidazole resistance in vitro. *Parasitology Research*, 100(1), 123-130.

Zhang, Z.-F., Graham, S., Yu, S.-Z., Marshall, J., Zielesny, M., Chen, Y.-X., Sun, M., Tang, S.-L., Jiao, C.-S., Xu, J.-L. J., Yang, X.-Z (1995). *Trichomonas vaginalis* and cervical cancer: a prospective study in China. *Anales de Epidemiología*, 5(4), 325-332.



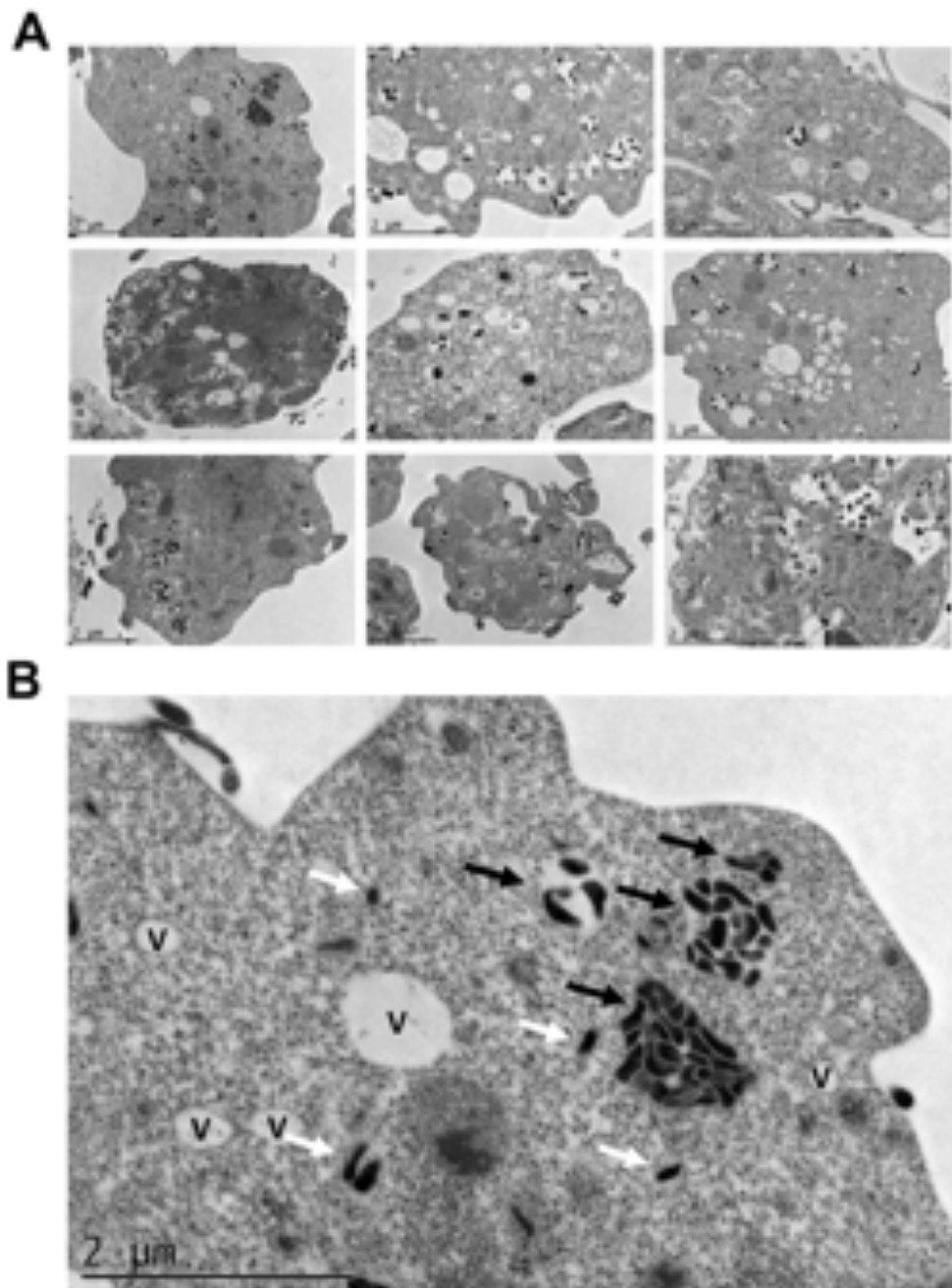


**Anexos**

**Tabla suplementaria 1.** Porcentaje de infección de Tv/Mh (+) en condiciones de hierro.

Condición	% de infección
Alto hierro	50.4%
Bajo hierro	31.5%
Normal	63.7%





**Figura suplementaria 1. Localización de *M. hominis* en *T. vaginalis*. A. Flechas blancas indican a Mh en el citoplasma de Tv. B. Flechas negras indican a Mh dentro de vacuolas.**

