

# Rivera Rivas Luis Alberto.pdf

## Resumen de fuentes

4%

SIMILITUD GENERAL

1	www.researchgate.net INTERNET	<1%
2	es.scribd.com INTERNET	<1%
3	hdl.handle.net INTERNET	<1%
4	patents.google.com INTERNET	<1%
5	bdigital.unal.edu.co INTERNET	<1%
6	bvs.sld.cu INTERNET	<1%
7	cinvestav.mx INTERNET	<1%
8	www.medigraphic.com INTERNET	<1%
9	www.redalyc.org INTERNET	<1%
10	core.ac.uk INTERNET	<1%
11	pesquisa.bvsalud.org INTERNET	<1%
12	tesis.repo.sld.cu INTERNET	<1%
13	www.lajar.cl INTERNET	<1%
14	Peggy Vieille Oyarzo, Rodrigo Cruz Choappa, Eduardo Piontelli Laforet. "Aislamiento de Aspergillus tritici desde ambiente interno (Chile)... CROSSREF	<1%

15	www.gumclinicsingapore.com INTERNET	<1%
16	Jennifer Puerta Suárez, Walter D. Cardona Maya. "Prevalencia de Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae y Ureaplasma urealyti... CROSSREF	<1%
17	es.slideshare.net INTERNET	<1%
18	www.scielo.org.co INTERNET	<1%
19	Pablo S Reineri, María S. Coria, María G. Barrionuevo, Olegario Hernández, Santiago Callejas, Gustavo A. Palma. "Gene expression of gr... CROSSREF	<1%
20	pt.scribd.com INTERNET	<1%
21	www.jove.com INTERNET	<1%
22	www.smcf.org.mx INTERNET	<1%
23	ceres.agro.unlp.edu.ar INTERNET	<1%
24	onlinelibrary.wiley.com INTERNET	<1%
25	www.google.com INTERNET	<1%
26	www.hindawi.com INTERNET	<1%
27	www.puertosycostas.com INTERNET	<1%
28	www.scielo.org.mx INTERNET	<1%
29	cd.dgb.uanl.mx INTERNET	<1%
30	eprints.uanl.mx INTERNET	<1%
31	ruc.udc.es INTERNET	<1%
32	www.cambridge.org INTERNET	<1%
33	www.med.uchile.cl INTERNET	<1%



**Se excluyeron los depósitos de búsqueda:**

- Trabajos entregados

**Excluido del Informe de Similitud:**

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

**Se excluyeron las fuentes:**

- Ninguno



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

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR**

**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA CISTEÍNA PROTEINASA TvCP2 DE  
*Trichomonas vaginalis***

**TESIS QUE PRESENTA:**

**Q.F.B. LUIS ALBERTO RIVERA RIVAS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN  
INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR**

**DIRECTORA DE TESIS**

**DRA. ROSSANA ARROYO VERÁSTEGUI**

**CIUDAD DE MÉXICO**

**JULIO, 2016**



**Asesores de tesis:**

**<sup>1</sup>Dra. Patricia Talamás Rohana**

**Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, CINVESTAV-IPN<sup>22</sup>**

**Dra. Bibiana Chávez Munguía**

**Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, CINVESTAV-IPN**



Este trabajo fue realizado en el laboratorio 11 del <sup>2</sup> Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV-IPN) bajo la dirección de la Dra. Rossana Arroyo Verástegui.

Este trabajo fue financiado parcialmente por el presupuesto del <sup>28</sup> CINVESTAV y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) donativos 523092 y 152023 (a R.A.V). L.A.R.R fue becario del CONACyT.





"Al decir que las penas son fugaces en tanto que la dicha persevera, tu cara es sugestiva y hechicera".

*Ramón López Velarde*

*Poeta Zacatecano*



## AGRADECIMIENTOS

A **Dios** primeramente, por permitirme culminar esta etapa de mi formación, con salud.

A la **Dra. Rossana Arroyo Verástegui**, por permitirme llevar a cabo el trabajo experimental en su laboratorio y bajo su asesoría, por permitirme ser parte de su grupo de investigación, por orientarme, brindarme sus enseñanzas y confiar en mí, muchas gracias.

A la **Q.F.B Leticia Ávila González**, por su apoyo técnico y la enseñanza de las técnicas del laboratorio.

Al **Biól. José Daniel Morales Mora**, por su asistencia técnica.

Al **Q.B.P. Carlos Vázquez Calzada** por su valiosa ayuda y asistencia técnica en la microscopía confocal.

A mis compañeros del laboratorio:

**Mar Sarai**, por brindarme tu amistad, por ayudarme en las técnicas que se me complicaban, por ser muy franca en tus comentarios.

**Ino**, por ayudarme a entender el proceso de hacer una PCR, por tener tanta paciencia conmigo y por poder contar con tu amistad.

**Jesús**, por apoyarme en los ensayos complicados, por siempre brindarme un buen consejo y tu amistad.

**Rosa**, por tu orientación, los consejos que me diste, las técnicas que me enseñaste y siempre tener un momento para resolverme alguna duda, gracias por todo ese apoyo.

**Diana**, por tu apoyo, tus consejos y brindarme tu amistad.



## DEDICATORIA

Dedico este trabajo, este esfuerzo a mis padres:

**J. Guadalupe Rivera Aguilar**, papá, gracias por estar conmigo siempre, por apoyarme, por creer en mí. **Zenaida Rivas Ávila**, mamá, gracias por estar conmigo siempre, por ser una guerrera, por ser mi compañera, mi confidente, mi gran aliada, por creer en mí, y aunque ahora estamos un poco lejos, siempre estaremos unidos. Gracias a los dos por el esfuerzo, por la dedicación, por el amor, por todas las risas, por todas las enseñanzas. Los amo, y esto va por ustedes.

Dedico este trabajo, a mi novia:

**Brenda Beatriz Xoconostle Morán**, pollita.... Gracias por estar conmigo en esta etapa, que nos ha tocado vivir juntos. Tú más que nadie sabe todo lo que nos ha costado llegar hasta acá, todo por lo que hemos tenido que pasar día con día, gracias por estar en los días buenos, pero sobre todo en los días malos, porque ahí es donde tú me haces fuerte, gracias por ser mi apoyo, mi brazo derecho, por ser mi aliada, por estar conmigo en esta aventura y ser parte de ella. Te amo.



## ÍNDICE

### RESUMEN

### ABSTRACT

1. Introducción	1
1.1. Tricomonosis	1
1.2. Tricomonosis en México	2
1.3. Características de <i>Trichomonas vaginalis</i>	2
1.4. Cisteína proteinasas de <i>Trichomonas vaginalis</i>	4
1.5. Mecanismos de patogenicidad	6
1.5.1. Citoadherencia	6
1.5.2. Citotoxicidad	8
1.5.3. Apoptosis	8
1.5.4. Hemólisis	9
1.5.5. Evasión de la respuesta inmune	9
1.6. <i>Trichomonas vaginalis</i> y hierro	11
1.7. <i>Trichomonas vaginalis</i> y glucosa	12
1.8. Antecedentes de la TvCP2	12





2. Justificación	17
3. Hipótesis	18
4. Objetivo general	19
4.1. Objetivos particulares	19
5. Estrategia experimental	20
6. Materiales y métodos	26
6.1. Cultivo de parásitos en distintas condiciones de hierro y glucosa	26
6.2. Extracción de DNA genómico	27
6.3. Extracción de RNA total	27
6.4. Tratamiento con DNAsa I	28
6.5. Retrotranscripción	29
6.6. Amplificación por PCR del gen <i>fvcp2</i>	29
6.7. Extracción de proteínas totales por precipitación con ácido tricloroacético (TCA) al 10%	30
6.8. Extracción de proteínas resistentes a proteasas	31
6.9. Western Blot	31
6.10. Cultivo de células HeLa	33
6.11. Ensayo de citotoxicidad	33



6.12. Ensayo de inmunofluorescencia indirecta	34
6.13. Ensayo de colocalización con LysoTracker	35
6.14. Ensayo de secreción <i>in vitro</i>	36
6.15. Inmunomarcaje para Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)	36
7. Resultados	38
7.1. Efecto de la glucosa sobre la expresión de TvCP2	38
7.2. Efecto del hierro sobre la expresión de TvCP2	59
7.3. Presencia de la TvCP2 durante la infección	73
7.4. Participación de la TvCP2 en la inducción de citotoxicidad hacia monocapas de células HeLa	84
7.5. Posible interacción de la TvCP2 con otras proteasas, inhibidores endógenos y otras proteínas de <i>T. vaginalis</i>	91
8. Discusión	103
9. Conclusiones	121
10. Perspectivas	122
11. Referencias	123
APÉNDICE	131



**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Incidencia de la tricomonosis en México	3
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Trichomonas vaginalis</i>	4
Figura 3. Procesamiento de las cisteína proteinasas del clan CA	5
Figura 4. Degradoma activo de <i>T. vaginalis</i>	7
Figura 5. Amplificación del gen <i>tvcp2</i> para clonación	13
Figura 6. Expresión y purificación de la proteína TvCP2r	14
Figura 7. Reconocimiento de la TvCP2 por WB	14
Figura 8. Localización de la TvCP2 en <i>T. vaginalis</i>	15
Figura 9. Efecto de la glucosa sobre la expresión del gen <i>tvcp2</i>	40
Figura 10. Efecto de la glucosa sobre la cantidad de TvCP2, en extractos totales de proteína	43
Figura 11. Efecto de la glucosa sobre la cantidad de TvCP2, en extractos resistentes a proteasas	46
Figura 12. Efecto de la glucosa en la localización de la TvCP2 en parásitos permeabilizados	49
Figura 13. Efecto de la glucosa en la localización de la TvCP2 en parásitos no permeabilizados	51



Figura 14. Inmunolocalización de la TvCP2 por marcaje con oro	54
Figura 15. Ensayo de colocalización de TvCP2 con lysotracker	58
Figura 16. Efecto del hierro sobre la expresión del gen <i>tvcp2</i>	61
Figura 17. Efecto del hierro sobre la cantidad de proteína TvCP2 en extractos totales de proteína	64
Figura 18. Efecto del hierro sobre la cantidad de proteína TvCP2 en extractos resistentes a proteasas	67
Figura 19. Efecto del hierro en la localización de la TvCP2, en parásitos permeabilizados	70
Figura 20. Efecto del hierro en la localización de la TvCP2, en parásitos no permeabilizados	72
Figura 21. Presencia de anticuerpos $\alpha$ -TvCP2 durante la infección	76
Figura 22. Presencia de la proteína TvCP2 en secreciones vaginales de pacientes con tricomonosis	79
Figura 23. Ensayo de secreción <i>in vitro</i> en las diferentes condiciones de hierro y glucosa	83
Figura 24. Niveles de citotoxicidad de parásitos crecidos en las diferentes condiciones de hierro	88
Figura 25. Ensayo de inhibición de la citotoxicidad en bajo hierro y baja glucosa	90





Figura 26. Interactoma entre cisteína proteinasas del tipo papaína con las del tipo legumaína	94
Figura 27. Interactoma entre la cisteína proteinasa TvCP2 con las CPs del tipo legumaína	96
Figura 28. Interactoma entre la cisteína proteinasa TvCP2 con otras CPs del tipo papaína	98
Figura 29. Predicción de posibles sitios de unión proteína-proteína tipo SH2	101
Figura 30. Análisis bioinformático de la secuencia del gen <i>tvcp2</i> comparando la secuencia codificante con la región no traducida 5'	107
Figura 31. Análisis transcriptómico de los genes que codifican para CPs del tipo legumaína	116
Figura 32. Análisis transcriptómico de los genes que codifican para CPs del tipo papaína	118



**LISTA DE TABLAS**

Tabla 1. Cantidad de partículas de oro y porcentaje de localización de la marca de TvCP2 55

Tabla 2. Datos del examen citológico de los lavados vaginales utilizados para demostrar la presencia de la TvCP2 en la infección 77



**LISTA DE ABREVIATURAS**

**aa:** Aminoácido

**AG:** Alta glucosa

**AP:** Proteína adhesina

**BG:** Baja glucosa

**cDNA:** Ácido desoxirribonucleico complementario

**CNCD:** Centro Nacional de Clínicas de Displasias del Hospital General de México

**CP:** Cisteína proteinasa

**DEPC:** Dietilpirocarbonato

**D-MEM:** Medio Eagle modificado por Dulbecco

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**DOC:** Desoxicolato de sodio

**EDTA:** Ácido etiléndiamino tetracético

**EST:** Marcador de Secuencia Expresada ("Expressed Sequence Tag")

**IgG:** Inmunoglobulina G

**IEF:** Isoelectroenfoque

**kDa:** Kilodaltones

**MS/MS:** Espectrometría de masas/masas

**NC:** Nitrocelulosa

**pb:** Pares de bases

**PBS:** Amortiguador salino de fosfatos

**PBS-T:** Amortiguador salino de fosfatos/Tween 20

**pI:** Punto isoelectrico

**RNA:** Ácido ribonucleico

**RT-PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscriptasa reversa



**SDS:** Dodecil sulfato sódico

**TA:** Temperatura Ambiente

**TBE:** Tris-Ácido Bórico-EDTA

**TBS:** Amortiguador Tris salino

**TCA:** Ácido tricloroacético

**TYG:** Medio Triptona-Extracto de levadura-Glucosa

**TYM:** Medio Triptona-Extracto de levadura-Maltosa

**TvCP1:** Cisteína proteinasa 1 de *T. vaginalis*

**TvCP2:** Cisteína proteinasa 2 de *T. vaginalis*

**TvCP3:** Cisteína proteinasa 3 de *T. vaginalis*

**TvCP4:** Cisteína proteinasa 4 de *T. vaginalis*

**TvCP12:** Cisteína proteinasa 12 de *T. vaginalis*

**TvCP39:** Cisteína <sup>12</sup>proteinasa de 39 kDa de *T. vaginalis*

**TvCP65:** Cisteína proteinasa de 65 kDa de *T. vaginalis*

**TvLEGU-1:** Cisteína proteinasa tipo legumaina 1 de *T. vaginalis*

**TvLEGU-2:** Cisteína proteinasa tipo legumaina 2 de *T. vaginalis*

**VIH:** Virus de inmunodeficiencia humana adquirida

**WB:** Western Blot

**2-DE:** Electroforesis en doble dimensión





## RESUMEN

*Trichomonas vaginalis* es el agente etiológico causante de la tricomonosis, una de las infecciones de transmisión sexual no viral más común en el mundo. Este parásito codifica diferentes tipos de proteasas, en su mayoría de tipo cisteína (CPs), como las ya reportadas: TvCP4, TvCP12, TvCP30, TvCP39, TvLEGU-1 entre otras y cuya expresión está regulada diferencialmente por concentraciones de hierro, zinc, poliaminas, glucosa, etc. Algunas de estas CPs participan en mecanismos de patogenicidad de *T. vaginalis* como adhesión, citotoxicidad, hemólisis, apoptosis, etc. Previamente, la TvCP2 se caracterizó parcialmente por Lorenzo-Benito en su trabajo de maestría. Esta CP es codificada por un gen de 945 pb que se traduce como proteasa precursora de 34.5 kDa y se procesa a una proteasa madura y activa de 27 kDa. El objetivo de este trabajo fue caracterizar funcionalmente a la TvCP2 en la patogenia de *T. vaginalis*. Los resultados que se obtuvieron muestran el efecto negativo del hierro y la glucosa en los niveles de la TvCP2, la cual se localiza en la superficie del parásito, dispersa en el citoplasma, en vesículas y lisosomas; es inmunogénica y se encuentra en las secreciones de pacientes con tricomonosis. Los ensayos funcionales muestran la participación de la TvCP2 en la citotoxicidad del parásito a monocapas de células HeLa.



## 15 ABSTRACT

*Trichomonas vaginalis* is the causative agent of trichomonosis, the most common, non-viral, sexually transmitted infection worldwide. This parasite encodes different types of protease, the most common is the cysteine type, such as the reported TvCP4, TvCP12, TvCP30, TvCP39, TvLEGU-1, among others. Their expression is differentially regulated by environmental factors such as iron, zinc, polyamines, glucose, etc. Some of the CPs participate in *T. vaginalis* as virulence factors in cytoadherence, cytotoxicity, haemolysis, apoptosis, etc. Previously, TvCP2 was partially characterized by Lorenzo-Benito in his MSc thesis work. TvCP2 is encoded by a 945 bp gene as a precursor protease of 34.5 kDa, that matures to a 27 kDa active protease when processing. The goal of this work was to characterize the TvCP2 at the functional level in the pathogenesis of *T. vaginalis*. The results obtained in this work show the negative effect of iron and glucose in the TvCP2 expression, TvCP2 localizes on the membrane, in cytoplasm, free and in vesicles and in lysosomes. It is an immunogenic protein that it is also found in vaginal secretions of patients with trichomonosis. The functional assays show the participation of TvCP2 in the trichomonal cytotoxicity to HeLa cell monolayers.



## 1. INTRODUCCIÓN

*Trichomonas vaginalis* es el protozoo flagelado responsable de la tricomonosis, la infección de transmisión sexual, no viral, más común en el mundo. Cada año se estima que ocurren ~276 millones de casos nuevos de tricomonosis globalmente y entre 7-8 millones en los Estados Unidos (Nazari y col., 2015; WHO report 2012). La prevalencia de la infección varía en los diferentes países. La tasa de infección depende de los cuidados de salud, del estado socioeconómico, del status cultural y de la promiscuidad del individuo (Hezarjaribi y col., 2015). En México, se reporta a la tricomonosis urogenital en el 12° lugar entre las "20 principales causas de enfermedades transmisibles", pero ocupa el 3° lugar entre las de transmisión sexual, con 59 232 casos notificados (Secretaría de Salud y la Dirección General de Epidemiología, 2015). Es importante resaltar que esta enfermedad no es de reporte obligatorio al sistema epidemiológico, por lo que estos datos se encuentran subestimados, aunado a que >80% de los pacientes son asintomáticos (Lord y col., 2016).

### 1.1. Tricomonosis

En mujeres, la infección por *Trichomonas vaginalis* presenta sintomatología cíclica, variable y frecuentemente empeora durante la menstruación; es causa de vaginitis que se manifiesta por ardor, mal olor y descarga vaginal abundante y espumosa (Lama y col., 2009); mientras que en el hombre casi siempre es asintomática, por lo que se les considera como portadores y transmisores potenciales de la infección (Brum-Vieira y col., 2015). La tricomonosis es un problema de salud pública, ya que incrementa la susceptibilidad y la transmisión



de la infección por el VIH (Kissinger y col., 2015). También se le asocia con partos prematuros, nacimiento de infantes con bajo peso, neumonía y problemas de infertilidad. Además, se le considera como factor de riesgo para cáncer cérvico-uterino y prostático (Nazari y col., 2015; Brum-Vieira y col., 2015; Sutcliffe y col., 2006), así como también se incrementa la susceptibilidad a la infección y transmisión del VIH (Arroyo y col., 2015).

### **1.2. Tricomonomosis en México**

En el boletín epidemiológico de la Secretaría de Salud en México, correspondiente a la semana 52 (27 de diciembre, 2015 al 02 de enero, 2016) se incluye a las enfermedades de transmisión sexual más importantes en México y la tricomonosis urogenital se ubicó en la 3ª causa, con 59 232 casos nuevos notificados, en comparación con los 52 562 casos nuevos del año 2014, cabe destacar que el grupo etario más afectado es el de 25-44 años. Los estados con mayor tasa de incidencia fueron Veracruz, Puebla, Estado de México y Chiapas. El índice de nuevos casos ha disminuido comparativamente con el año 2002, donde se registraron poco más de 200 000 nuevos casos, indicando una disminución aparente con el paso de los años (Fig. 1).

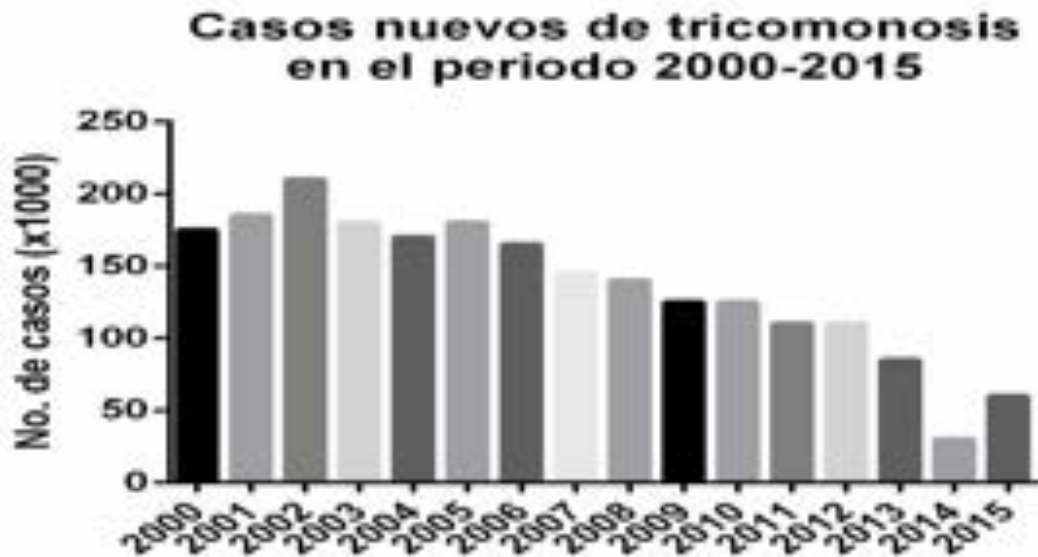
### **1.3. Características de *Trichomonas vaginalis***

*T. vaginalis* es un protozoo parásito que posee 5 flagelos, uno de los cuales se adosa a la membrana ondulante que le proporciona resistencia estructural y participa en la motilidad del parásito. Entre sus compartimentos citoplásmicos posee hidrogenosomas en lugar de mitocondrias. Esos son los





encargados de producir la fermentación de carbohidratos para la generación de energía del parásito (Santos-Diéguez, 2014). *T. vaginalis* sólo tiene el estadio de trofozoito (no tienen formas quísticas), aunque en condiciones desfavorables puede interiorizar sus flagelos y



**Figura 1.- Incidencia de tricomonosis en México.** Estadística reportada desde el año 2000 hasta el 2015. (Modificado del <sup>20</sup>Boletín Epidemiológico del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica de la Secretaría de Salud).

adoptar una forma pseudoquística (Santos-Diéguez, 2014) y en contacto con el epitelio vaginal, puede adquirir una forma ameboide (Arroyo y col., 1993). *T. vaginalis* tiene un ciclo de vida simple en comparación con otros protozoarios. Solo tiene un hospedero definitivo, no hay hospederos intermediarios ni vectores que participen en su transmisión, la cual se realiza de persona a persona, por medio

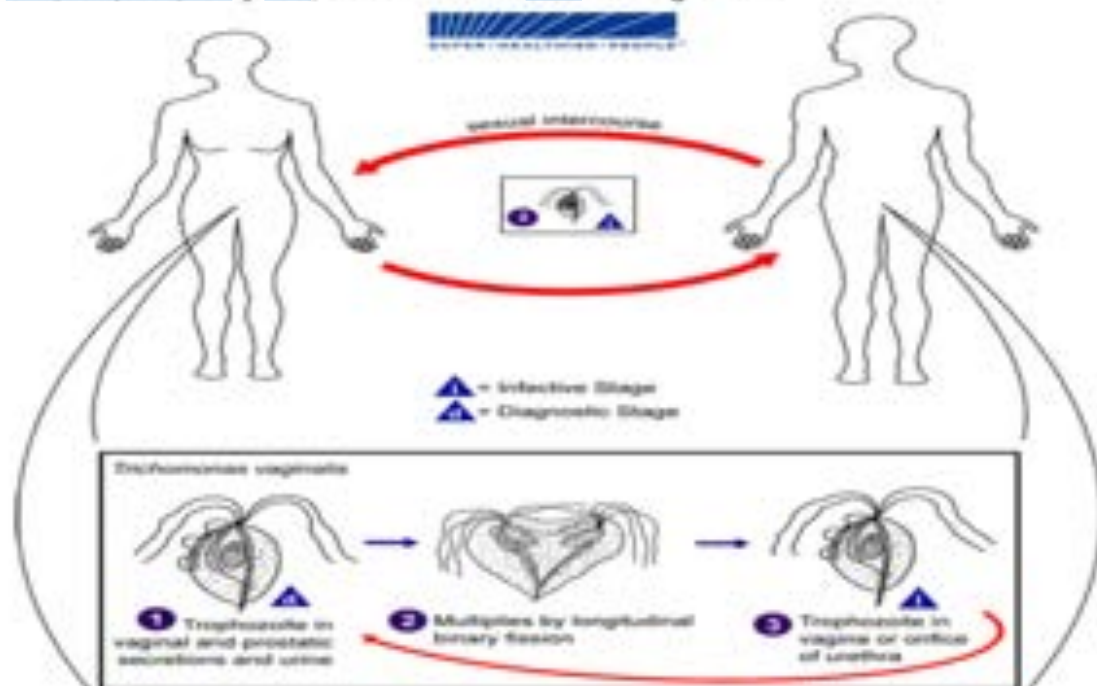


del contacto sexual, contacto con fluidos vaginales o semen. Su replicación es por fisión binaria longitudinal (Fig. 2).

**1.4. Cisteína proteinasas de *Trichomonas vaginalis***

Las proteinasas son enzimas que hidrolizan enlaces peptídicos en proteínas y péptidos. Las proteinasas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza en organismos muy variados, desde virus hasta mamíferos (Sajid y col., 2002). Las proteinasas, con base en su mecanismo catalítico y la naturaleza del residuo involucrado en la hidrólisis, se clasifican en: cisteína, serina, treonina, aspártico, glutámico y metalo- peptidasas (Rawlings y col., 2014).

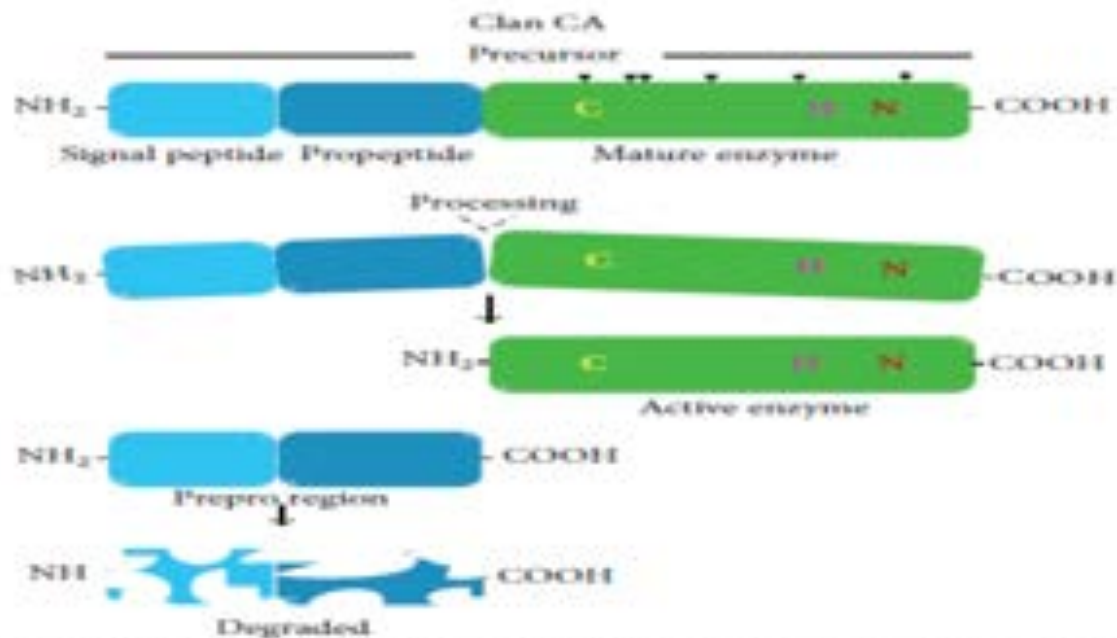
Las cisteína proteinasas (CPs) se subdividen en familias de acuerdo a la similitud de secuencia y especificidad a sustratos pequeños con secuencias similares y se engloban en clanes, entre los que destacan **CA, CD, CE, CF, CL, CM, CN, CO, CP y CQ**, además de un clan no asignado.





**Figura 2.- Ciclo de vida de *Trichomonas vaginalis*.** En el esquema se representa el ciclo de vida del parásito, el estadio de trofozoito y la reproducción por fisión binaria longitudinal. (Tomado de <http://www.cdc.gov/dpdx/trichomoniasis/>)

Las CPs se producen en forma de zimógenos; las del clan CA (también llamadas de tipo papaina), presentan un péptido señal, una región que forma el pro-péptido y la región de la enzima madura (Fig. 3). La enzima está inactiva en la forma precursora y necesita de un procesamiento que separe la región pre-pro para dejar la enzima madura y activa. Esto ocurre una vez que la enzima se encuentra en el sitio en donde debe de realizar su función (Arroyo y col., 2015).



**Figura 3.- Procesamiento de las cisteína proteinasas del clan CA.** En este esquema se muestra el procesamiento necesario para la activación de las CPs del clan CA o CPs del tipo papaina (Tomado de Arroyo, 2015).

5

El genoma de *T. vaginalis* posee múltiples genes que codifican para proteinasas (~440), la mayoría son CPs (~220) y 48 son de tipo papaina (Carlton y col., 2007). La expresión y la actividad proteolítica de algunas CPs se modula diferencialmente por hierro, zinc, glucosa y poliaminas (Figueroa-Angulo y col., 2012). La actividad proteolítica se detecta por zimografía en una y doble dimensión, en forma de 11 bandas y 23 puntos entre 23 y 110 kDa, con *pI* entre 4.5 y 7.0 (Cárdenas-Guerra y col., 2013; Ramón-Luing y col., 2010) (Fig. 4). La expresión de algunos de estos genes es modulada diferencialmente por el hierro disponible en el medio. Estas CPs tienen un papel crucial en la virulencia del parásito, participan en citoadherencia (Arroyo y Alderete, 1989; Mendoza-López y col., 2000; Rendón-Gandarilla y col., 2013), citotoxicidad (Arroyo y col., 1995; Álvarez-Sánchez y col., 2000; Ramón-Luing y col., 2011), hemólisis (Fiori y col., 1998; Cárdenas-Guerra y col., 2013), resistencia al complemento (Alderete y col., 1995) e inducción de apoptosis en células humanas (Sommer y col., 2005).

## **1.5. Mecanismos de patogenicidad**

### **1.5.1. Citoadherencia**

La adherencia del parásito a las células del tracto urogenital es un requisito indispensable para el establecimiento y mantenimiento de la infección crónica en el humano. La citoadherencia es un proceso complejo y multifactorial que involucra adhesinas (AP120, AP65, AP51, AP33 y AP23) (Arroyo y col., 1992; Moreno-Brito y col., 2005; Meza-Cervantez y col., 2011).





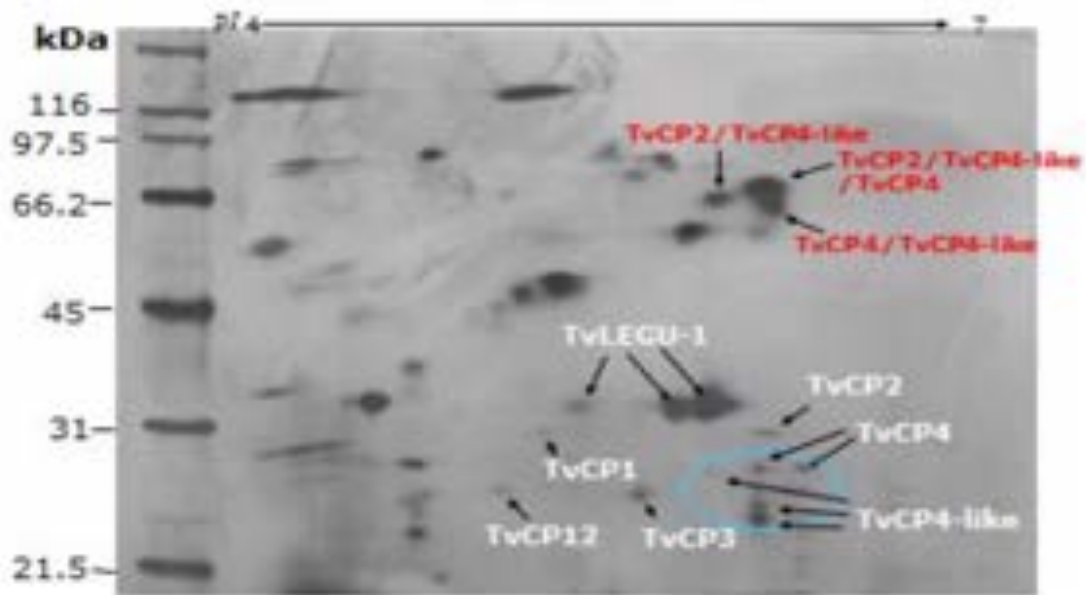


Figura 4.- Degradoma activo de *T. vaginalis*. Tomado de Ramón-Luig y col., 2010.

glucoconjugados de matriz extracelular (Crouch y Alderete, 1999), el LPG (Bastida-Corcuera y col., 2005), proteínas del citoesqueleto (principalmente microtúbulos y microfilamentos) y se requiere de la actividad de CPs (Arroyo y Alderete, 1989) como la TvLEGU-1 (Rendón-Gandarilla y col., 2013). Además, el ambiente vaginal contiene hierro como un regulador que fluctúa durante el ciclo menstrual. (Figueroa-Angulo y col., 2012).

Es interesante el hecho de que 4 de las 5 adhesinas antes mencionadas (AP120, AP65, AP51 y AP33) tienen homología en con enzimas metabólicas y la mayoría se regulan positivamente por hierro a nivel transcripcional y traduccional (Arroyo y col., 1992; Moreno-Brito y col., 2005; Meza-Cervantez y col., 2011), lo

7

cual probablemente le proporcione al parásito un mecanismo de evasión de la respuesta inmune del hospedero. Las adhesinas asociadas a la superficie de *T. vaginalis* participan en la interacción con la célula blanco, produciendo un cambio dramático en la morfología de tricomonas de ovoide a ameboide, la cual se acompaña por un aumento en la síntesis de adhesinas al contacto del parásito con la célula blanco (Arroyo y col., 1993).

### **1.5.2. Citotoxicidad**

La citotoxicidad es otro mecanismo de patogenicidad de *T. vaginalis* que puede ser dependiente o independiente de contacto. Cuando es dependiente de contacto involucra una compleja cascada de eventos que resultan en citólisis, fagocitosis y destrucción de las monocapas celulares (Figuroa-Angulo y col., 2012). Mientras que la citotoxicidad independiente de contacto involucra factores secretados al medio por parte del parásito, entre los que se destacan las CPs con afinidad por la superficie de las células cervicales y del epitelio vaginal, tales como TvCP12, TvCP39 y TvCP65 (Arroyo y col., 1995; Álvarez-Sánchez y col., 2000; Ramón-Luing y col., 2011; Figuroa-Angulo y col., 2012).

### **1.5.3. Apoptosis**

Algunas de las CPs de *T. vaginalis* contribuyen a la patogénesis cuando son secretadas hacia la mucosa vaginal. Dichas CPs participan en el rompimiento de las uniones intercelulares seguido de la destrucción celular de las monocapas de células epiteliales vaginales (VEC) *in vitro*, ocasionando apoptosis (Sommer y col., 2005). Kummer y col. en 2008 demostraron la presencia de 4 cisteína



proteinasas (TvCP2, TvCP3, TvCP4 y TvCPT) en los productos de secreción, referidas como CP30, reguladas negativamente por hierro y capaces de inducir apoptosis en cultivos primarios de células epiteliales vaginales humanas (Sommer y col., 2005). La destrucción de las células hospederas correlaciona directamente con la actividad enzimática de la CP30 que se secreta. Sin embargo, aún se desconoce el papel exacto que juegan las CPs involucradas en la inducción de apoptosis durante la infección (Kummer y col., 2008).

#### **1.5.4. Hemólisis**

La hemólisis es un mecanismo de patogenicidad que le permite a *T. vaginalis* obtener nutrientes tales como lípidos y hierro provenientes de los eritrocitos. El nivel de la actividad beta-hemolítica en aislados frescos de *T. vaginalis* se correlaciona con la sintomatología clínica (Figueroa-Angulo y col., 2012). Este mecanismo de patogenicidad es dependiente de contacto (Dailey y col., 1990; Fiori y col., 1993), requiere calcio y pH  $\leq 6.5$  a 37°C.

Las moléculas de *T. vaginalis* que se involucran en la hemólisis son proteínas formadoras de poros y la fosfolipasa-A (Fiori y col., 1999; Lubick y col., 2004), además de algunas CPs a través de un mecanismo dependiente de contacto, como la TvCP4 (Cárdenas-Guerra y col., 2013).

#### **1.5.5. Evasión de la respuesta inmune**

Durante la infección vaginal crónica causada por *T. vaginalis*, el parásito se encuentra con cambios cíclicos en el microambiente vaginal, por lo que ha desarrollado estrategias para defenderse y evadir la respuesta inmune del



hospedero, a través de varios mecanismos bien definidos que se citan a continuación:

1.- Degradación de inmunoglobulinas: Esto lo logra a través de una CP de 60 kDa que puede jugar un papel dual en la supervivencia del parásito al degradar inmunoglobulinas, además de proveerle nutrientes al parásito por medio de la degradación de hemoglobina (Lehker y col., 2000). También se ha reportado a la TvCP39 involucrada en la degradación de moléculas de IgA, IgG e IgM (Hernández-Gutiérrez y col., 2004).

2.- Degradación del complemento: En ausencia de anticuerpos específicos, el complemento es la vía más eficaz para la eliminación del parásito. No obstante, *T. vaginalis* ha desarrollado resistencia al complemento mediada por una CP regulada positivamente por hierro que degrada al componente C3b (Lehker y col., 2000); sin embargo, aún no se ha identificado a la CP responsable.

3.- Mimetismo molecular: En *T. vaginalis* el mimetismo molecular ocurre por el recubrimiento de la membrana del parásito con moléculas que tienen homología con proteínas del hospedero; como algunas adhesinas (AP65, AP51, AP33), que muestran homología a enzimas metabólicas como la enzima málica y la succinil-CoA sintetasa subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , respectivamente. También, *T. vaginalis* se puede recubrir con proteínas del hospedero como la albúmina para evitar ser reconocidas como un agente extraño por el sistema inmune (Figueroa-Angulo y col., 2012).





### **1.6. *Trichomonas vaginalis* y hierro**

*T. vaginalis* tiene un alto requerimiento de hierro exógeno en forma ferrosa (250-300  $\mu\text{M}$ ), y es esencial para su supervivencia, metabolismo y multiplicación en cultivo (Lehker y col., 1992). El hierro también es un regulador de algunos de los factores de virulencia por mecanismos conocidos y algunos otros desconocidos. El hierro lo obtiene de diversas fuentes, tales como la lactoferrina, hemoglobina o ferritina; eritrocitos y células epiteliales son otras fuentes importantes de hierro para tricomonas (Arroyo y col., 2015).

Por la gran necesidad de hierro del parásito, este elemento juega un papel muy importante en la fisiología y morfología de *T. vaginalis*; ya que el mecanismo de patogenicidad que se active depende de las condiciones de hierro, la forma de regulación de las proteinasas y su expresión diferencial. Esto se puede apreciar por medio de cambios en los patrones de proteínas dependiente de las concentraciones de hierro en las tricomonas (Arroyo y col., 2015), con el consiguiente cambio en las propiedades de virulencia, que se encuentran reguladas por hierro. Las propiedades de virulencia reguladas por la presencia de hierro son la de citoadherencia, hemólisis, resistencia al complemento y transformación morfológica, mientras que, en bajo hierro, el parásito es capaz de inducir citotoxicidad y apoptosis a las células hospederas, variación fenotípica y adquisición de hierro de las células hospederas (Figueroa-Angulo y col., 2015).



### **1.7. *Trichomonas vaginalis* y glucosa**

La principal fuente de energía para *T. vaginalis* proviene del metabolismo fermentativo de carbohidratos en condiciones aerobias y anaerobias. La restricción de glucosa es un estrés metabólico que, en otros protistas, induce la expresión de mecanismos de supervivencia y consiguiente patogenicidad (Fang y col., 2004; Huang y col., 2014). *T. vaginalis* se cultiva en un medio que contiene altos niveles de glucosa (~25 mM) (Diamond y col., 1995) que es alrededor de 10 veces mayor a la concentración que existe en sangre, lo cual no corresponde a las concentraciones de glucosa a las que se puede enfrentar el parásito en el ambiente natural de la vagina, por lo que, induciendo una restricción de glucosa, se activarán las estrategias del parásito para obtener glucosa, lo cual conlleva a la inducción de citotoxicidad y autofagia para asegurar su supervivencia (Huang y col., 2014).

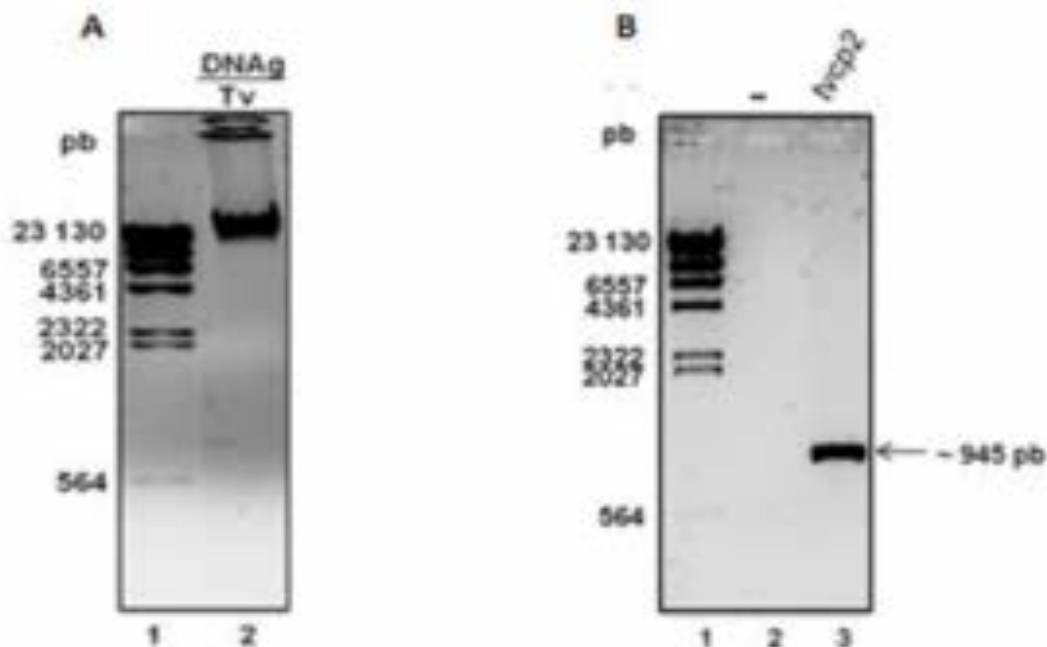
### **1.8. Antecedentes de la TvCP2**

En 1994, Malinson y col., amplificaron secuencias de cDNA que codifican CPs de *T. vaginalis*, mediante el uso de iniciadores generales para regiones muy conservadas de las CPs de tipo papaina de eucariontes. Por este método se amplificaron fragmentos de los genes que codifican para TvCP1, TvCP2, TvCP3 y TvCP4, de los cuales solo de los de TvCP1 y TvCP2 se obtuvieron secuencias completas. La comparación de las secuencias de aminoácidos predichas, mostró que la TvCP2 presenta una identidad de 60% y 65% con la TvCP1 y la TvCP4, respectivamente. También se encontró que la TvCP1, TvCP2 y TvCP3 son



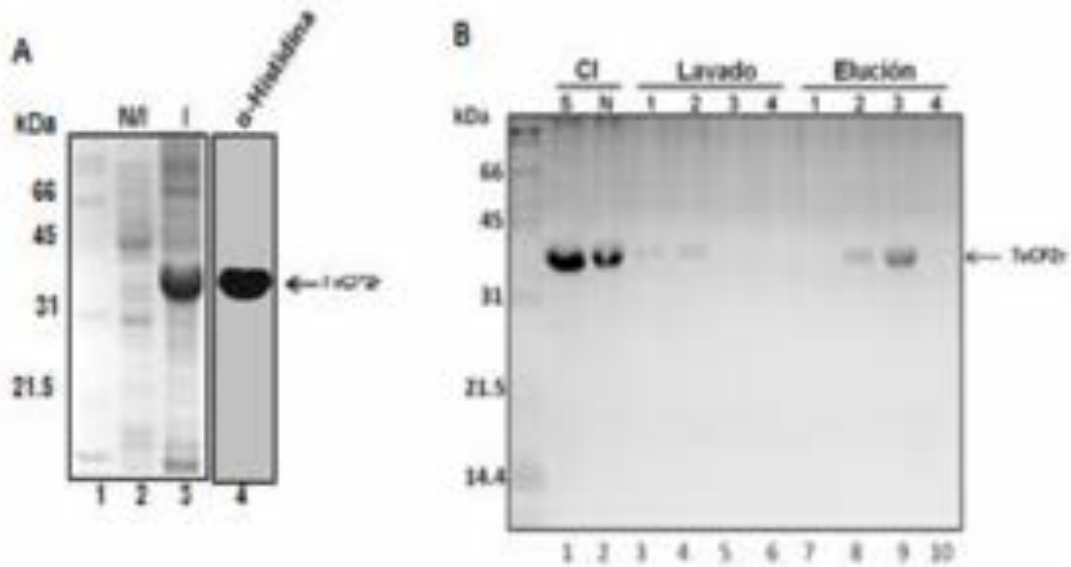
codificadas por genes unicopia, mientras que el TvCP4 es multicopia (Malinson y col., 1994; Solano-González y col., 2007).

La caracterización funcional de la TvCP2 aún no se ha realizado. Sin embargo, Lorenzo-Benito, en su proyecto de maestría (2011), clonó y expresó el gen que codifica a la TvCP2 (~945 pb) del aislado CNCD 147 (Figs. 5 y 6), purificó a la proteína recombinante TvCP2r y produjo un anticuerpo policlonal  $\alpha$ -TvCP2r que en ensayos de Western Blot, detecta una banda de 27 kDa (Fig. 7). Además, por ensayos de inmunofluorescencia indirecta, se localizó a la TvCP2 en la superficie del parásito y en vesículas citoplásmicas (probablemente lisosomas) y se colocalizó a la TvCP2 y la TvCP4 en la superficie del parásito (Fig. 8), sugiriendo que probablemente interaccionen entre ellas, formando el complejo de 65 kDa detectado por espectrometría de masas (Ramón-Luing y col., 2010), lo anterior apunta a la posible asociación entre diferentes CPs que son activas

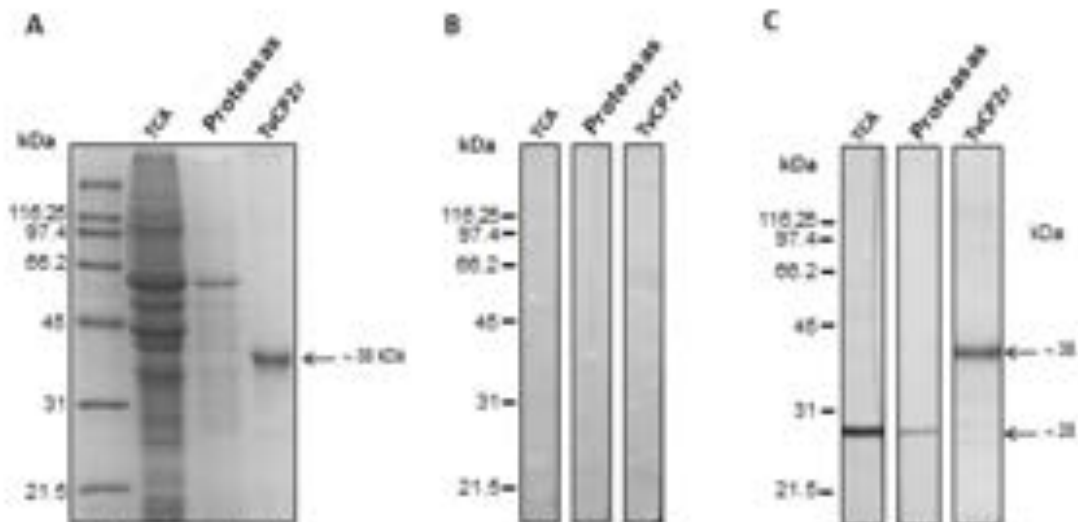




**Figura 5.- Amplificación del gen *tvcp2* para clonación.** Tomado de Lorenzo-Benito, 2011. Tesis de Maestría.



**Figura 6.- Expresión y purificación de la proteína TvCP2r.** Tomado de Lorenzo-Benito, 2011. Tesis de Maestría.





1 2 3 4

Coomassie

1 2 3

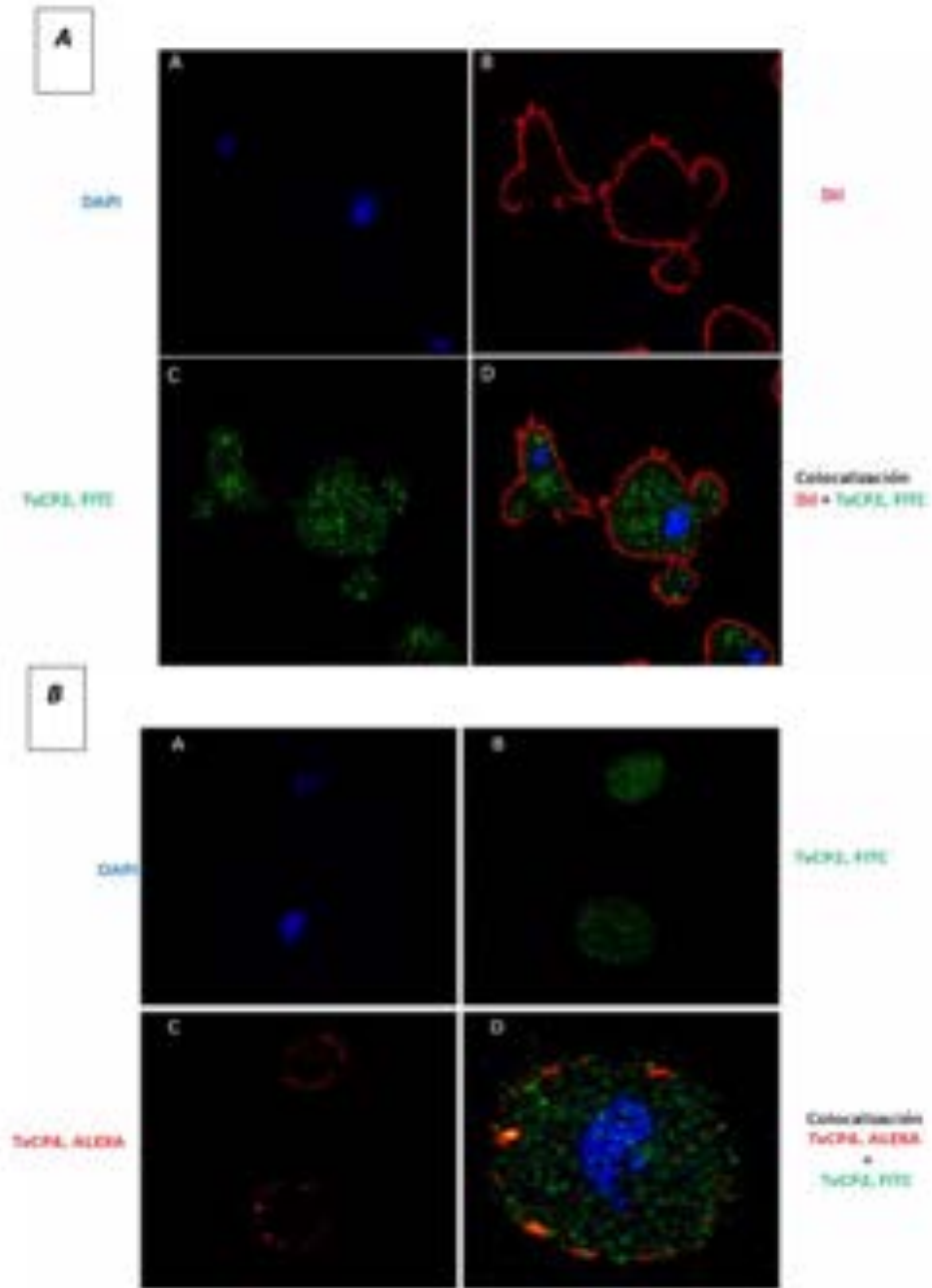
Suero preinmune

1 2 3

Suero anti-NSP2r

4

**Figura 7.- Reconocimiento de la TvCP2 por WB.** A) Perfil de proteínas de extractos totales, resistentes a proteasas y TvCP2r. Gel teñido con Azul de Coomassie. B) WB con suero preinmune. C) WB con el anticuerpo  $\alpha$ -TvCP2.





**Figura 8.- Localización de la TvCP2 en *T. vaginalis*.** A) Localización de la TvCP2 en parásitos permeabilizados. B) Colocalización entre TvCP4 y TvCP2.

enzimáticamente formando complejos de alto peso molecular y que participan en citotoxicidad (Arroyo y col., 2015).

El código de identificación del gen que codifica a la proteína TvCP2 es TVAG\_057000, y corresponde a una CP tipo papaína, perteneciente al clan CA, familia C1, subfamilia de las catepsinas L. Por medio de análisis de MALDI-TOF-MS, Huang y col., 2014, identificaron proteínas de *T. vaginalis* que se encuentran sobreexpresadas durante la adhesión del parásito a fibronectina; entre estas proteínas se encuentra la correspondiente a TVAG\_057000, en la cual se predice una masa molecular teórica de 35.2 kDa (proteína precursora) y *pI* de 8.4.

A pesar de la información encontrada en las bases de datos, no presenta más datos relevantes respecto a la TvCP2 ni al gen TVAG\_057000, más que los obtenidos por Lorenzo-Benito, 2011 en su tesis de maestría y lo ya mencionado. Sin embargo, aún se desconoce su participación en algún mecanismo de patogenicidad de *T. vaginalis*, la modulación de la expresión de la TvCP2 por hierro y glucosa, así como su presencia durante la infección, lo cual será el punto de partida para la presente investigación.



## **2. JUSTIFICACIÓN**

La cisteína proteinasa TvCP2 se relaciona con la patogenia de *T. vaginalis* hacia las células hospederas, junto con otras CPs que se encuentran en los productos de secreción, por lo que es importante demostrar su participación en la patogenia de *T. vaginalis*. Tampoco se ha descrito si el hierro y la glucosa afectan su expresión a nivel de RNA y de proteína, su localización, su expresión durante la infección y su posible asociación con otras proteínas del parásito.



### **3. HIPÓTESIS**

La cisteína proteinasa TvCP2 modulada por hierro y glucosa participa en la patogenia de *Trichomonas vaginalis*, se encuentra en las secreciones vaginales de pacientes con infección activa, es inmunogénica y se puede asociar con otras proteínas del parásito.





#### 4. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar funcionalmente a la cisteína proteinasa TvCP2 en la patogenia causada por *Trichomonas vaginalis*.

##### 4.1. Objetivos particulares

1) Determinar la expresión y localización de la TvCP2 en distintas concentraciones de hierro y glucosa.

2) Determinar la presencia de la TvCP2 durante la infección:

a) Determinar la presencia de anticuerpos anti-TvCP2 en sueros de pacientes con tricomonosis.

b) Detectar a la TvCP2 en las secreciones vaginales de pacientes con tricomonosis.

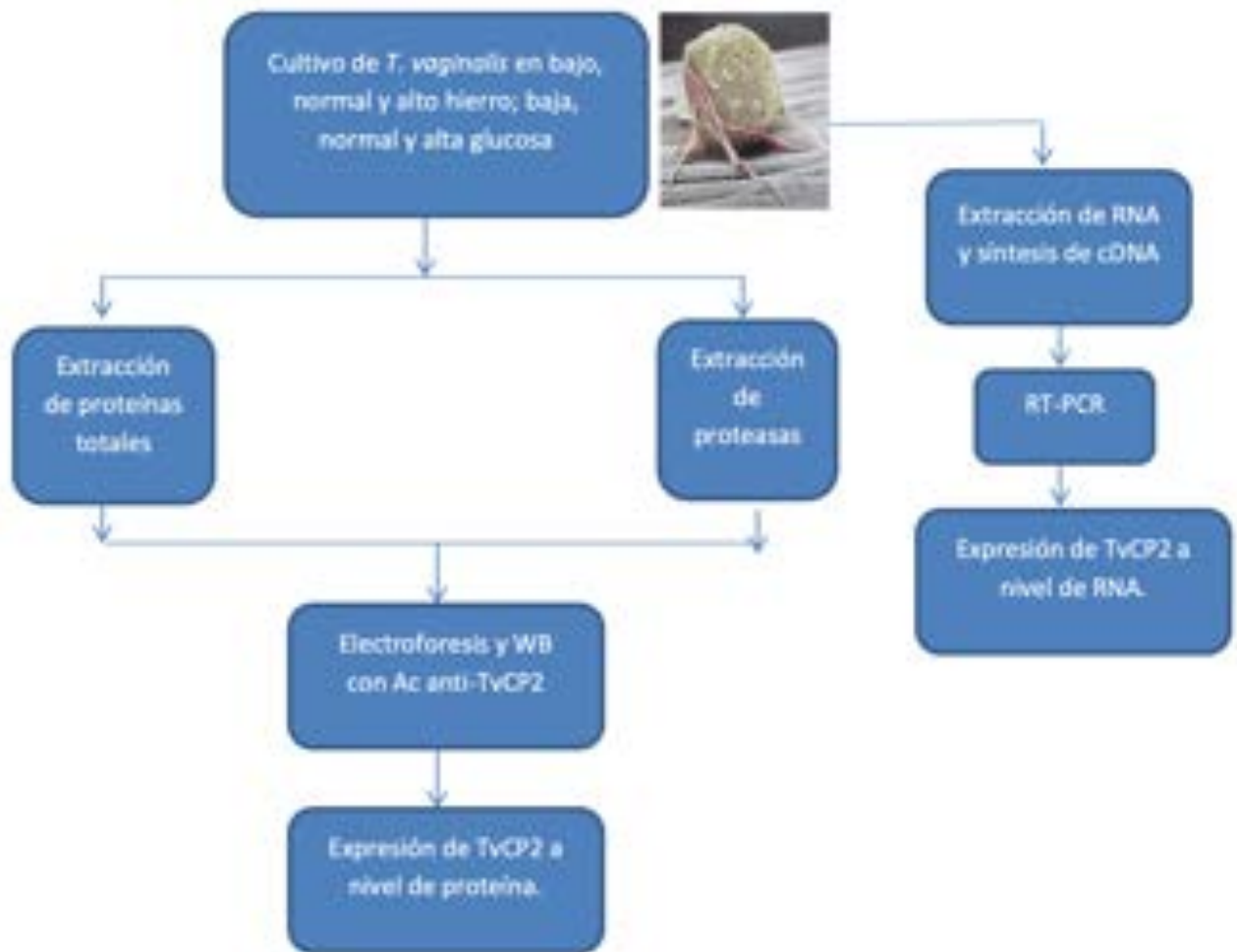
3) <sup>30</sup> Determinar la participación de la TvCP2 en la patogenia de *T. vaginalis*.

4) Analizar *in silico* las posibles interacciones de la TvCP2 con otras proteasas, inhibidores endógenos y otras proteínas de *T. vaginalis*.



## 5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Determinar la expresión de la TvCP2 en distintas condiciones de hierro y glucosa.





## Localización de la proteinasa TvCP2 en diferentes condiciones de hierro y glucosa.





## Participación de la TvCP2 en la citotoxicidad y/o apoptosis de *T. vaginalis* hacia monocapas de células HeLa





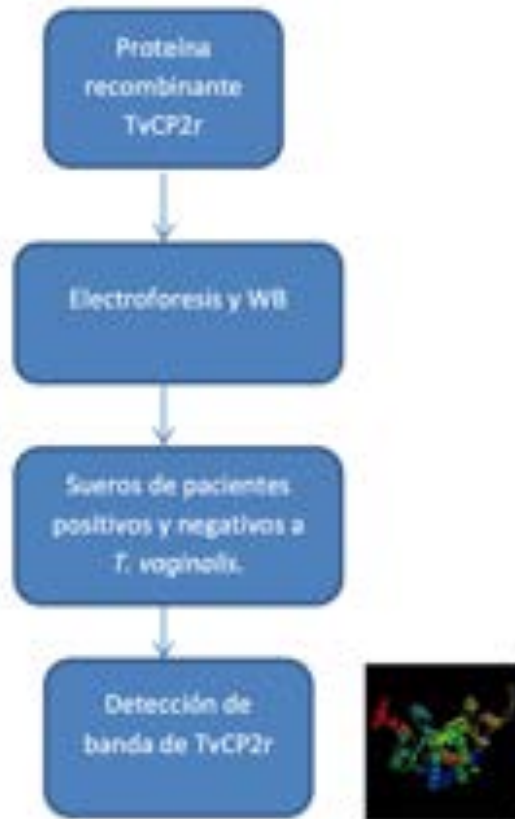


**Presencia de la TvCP2 durante la infección en lavados vaginales de pacientes con tricomonosis.**



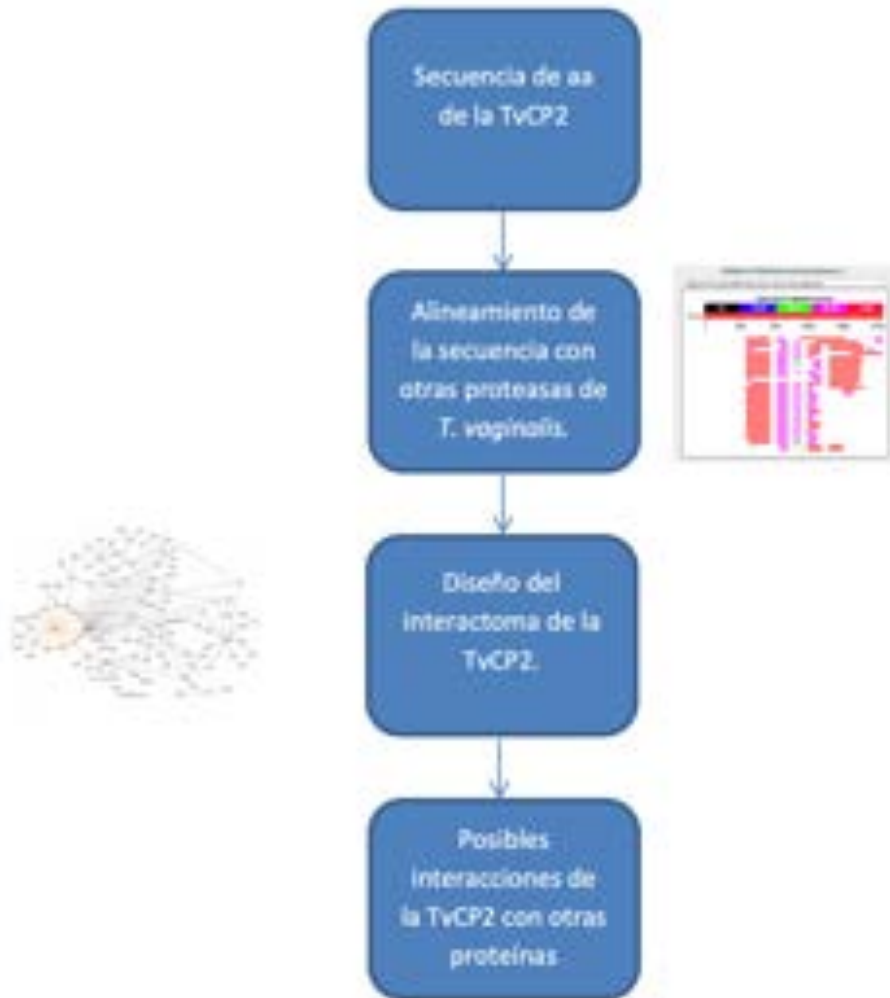


## Presencia de anticuerpos anti-TvCP2r en sueros de pacientes con tricomonosis





**Análisis *in silico* de las posibles interacciones de la TvCP2 con otras proteasas u otras proteínas de *Trichomonas vaginalis*.**





## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Cultivo de parásitos en distintas condiciones de hierro y glucosa

Los aislados CNCD 147 y CNCD 188 de *Trichomonas vaginalis* se cultivaron en condiciones estándar en 30 ml de medio TYM (Tryptona-extracto de levadura-maltosa) suplementado con 10% de suero bovino de adulto (SBA) y con un inóculo inicial de  $10 \times 10^6$  parásitos por 24 h a 37°C

Para cultivar los parásitos en distintas condiciones de glucosa, parásitos crecidos en medio TYM, se inocularon al medio TYG (Tryptona-Extracto de levadura-Glucosa) en condición normal de glucosa (25 mM) suplementado con 10% de SBA durante 3 días consecutivos. Previo a los experimentos, los parásitos se transfirieron a las condiciones de  $\leq 1$  mM (medio sin glucosa) con  $20 \times 10^6$  parásitos, 25 mM (medio normal) con  $10 \times 10^6$  parásitos y 50 mM de glucosa (alta glucosa) con  $8 \times 10^6$  parásitos y se incubaron por 24 h a 37°C.

Para el cultivo (30 ml) en distintas condiciones de hierro, se partió de un inóculo inicial de parásitos ( $10 \times 10^6$ ), crecidos en medio TYM suplementado con 10% de SBA (condición normal de hierro, 20  $\mu$ M). Para la condición de bajo hierro (0  $\mu$ M), al medio TYM se le añadieron 150  $\mu$ M de 2,2'-dipiridilo y se dejó quelando toda la noche; al día siguiente se agregó 10% de SBA, se inocularon los parásitos ( $35 \times 10^6$ ) y se incubaron durante 24 h a 37°C. Para la condición de alto hierro, al medio TYM se le añadieron 250  $\mu$ M de sulfato ferroso amoniacal, se incubó toda la noche y al día siguiente se le añadió 10% de SBA y los parásitos ( $8 \times 10^6$ ).





## 6.2. Extracción de DNA genómico

A partir de parásitos ( $20 \times 10^6$ ) de los aislados CNCD 188 y CNCD 147 crecidos en medio TYM-SBA, lavados 3 veces con PBS pH 7, se extrajo DNA genómico. Los parásitos se resuspendieron en 2 ml de PBS y se colocaron en dos tubos Eppendorf, para centrifugar a  $14\ 000 \times g$  durante 1 min, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón de células en el líquido remanente. A los parásitos se le añadió 300  $\mu$ l de amortiguador de extracción (SDS 0.2%, NaCl 100 mM, EDTA 10 mM y Tris-HCl 10 mM, pH 8.0) y 300  $\mu$ l de fenol, se agitó en vórtex 3 veces durante 30 s y se centrifugó a  $14\ 000 \times g$  por 3 min. La fase superior se transfirió a otro tubo Eppendorf con 300  $\mu$ l de fenol y 300  $\mu$ l de cloroformo, se agitó y se centrifugó a  $14\ 000 \times g$  por 3 min, nuevamente la fase superior se transfirió a otro tubo Eppendorf con 500  $\mu$ l de cloroformo, se agitó y se centrifugó de la misma manera. La fase superior se precipitó con 1 ml de etanol absoluto y 40  $\mu$ l de acetato de sodio 3 M, se incubó a  $-20^\circ\text{C}$  durante 2 h, se centrifugó a  $14\ 000 \times g$  durante 20 min a  $4^\circ\text{C}$ , se eliminó el sobrenadante y el botón de ácidos nucleicos se lavó con 1 ml de etanol al 70% frío, se dejó secar y se resuspendió con 50  $\mu$ l de agua inyectable, se le añadió 0.5  $\mu$ l de RNAsa y se incubó a  $37^\circ\text{C}$  durante 30 min y el DNA se cuantificó por densidad óptica a 260 nm y se almacenó a  $4^\circ\text{C}$  hasta su uso.

## 6.3. Extracción de RNA total

Para extraer el RNA total de parásitos ( $20 \times 10^6$ ) crecidos en diferentes condiciones de cultivo, éstos se colocaron en un tubo Eppendorf de 1.5 ml nuevo,



se centrifugaron a 1 800 rpm por 5 min a 4°C, se desechó el sobrenadante, se adicionó 1 ml de trizol y 0.2 ml de cloroformo, se mezcló 15 veces por inversión, se incubó por 3 min a 25°C (TA), se centrifugó a 8 000 × g por 20 min a 4°C, se recolectó la fase acuosa, se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 ml nuevo y se precipitó el RNA, adicionando 0.5 ml de alcohol isopropilico (2-propanol), se incubó 15 min a TA y se centrifugó a 8 000 × g 25 min a 4 °C. El sobrenadante se desechó con mucho cuidado, la pastilla se lavó con 1 ml de etanol al 75% en agua DEPC, se centrifugó a 8 000 × g por 10 min a 4°C, el sobrenadante se desechó con mucho cuidado y el tubo se dejó destapado por 10 min a TA que se evaporara el etanol. La pastilla de RNA se resuspendió en 30 µl de H<sub>2</sub>O DEPC y la muestra se cuantificó por densidad óptica a 260 nm, se hicieron alícuotas de 10 µg y se almacenaron a -70°C hasta su uso. Las muestras se analizaron en un gel de agarosa al 1% en amortiguador TBE 1x/DEPC.

#### 6.4. Tratamiento con DNAsa I

A 10 µg de RNA obtenido en cada condición de hierro o glucosa y se trató con DNAsa I (New England Biolabs), agregando 4 µl del amortiguador de reacción 10x, 1 µl de DNAsa I (2000 U/ml) y se completó el volumen a 40 µl con agua estéril; se incubó a 37°C durante 10 min, se añadió 1 µl de EDTA 0.5 mM y se completó el volumen a 100 µl con agua inyectable. Posteriormente, la enzima se inactivó a 75°C por 10 min, el RNA se precipitó con 250 µl de etanol absoluto y 10 µl de acetato de sodio 3M en agua DEPC a -70°C toda la noche.



## 6.5. Retrotranscripción

La pastilla de 10  $\mu\text{g}$  de RNA total tratado con DNasa de parásitos crecidos en concentraciones altas, normales y bajas de glucosa o hierro, se resuspendió en un volumen de 14  $\mu\text{l}$  de agua libre de RNAsas (se separaron 3  $\mu\text{l}$  para utilizarlos como control) se adicionó 1  $\mu\text{l}$  de Primer Oligo dT (Invitrogen) y las reacciones se incubaron a 65°C durante 5 min, se agregó 4  $\mu\text{l}$  de amortiguador de reacción 5 $\times$ , 2  $\mu\text{l}$  de mezcla de dNTPs 10 mM, 1  $\mu\text{l}$  de la enzima inhibidora de RNAsas "Ribolock" (200 U/ $\mu\text{l}$ ) y 1  $\mu\text{l}$  de la retrotranscriptasa Revert Aid M-MOLV RT (200 U/ $\mu\text{l}$ ) y el volumen se completó a 20  $\mu\text{l}$ . La reacción se mezcló, se dio un "spin" y se incubó durante 1 h a 42°C. Enseguida, la enzima se inactivó a 70°C durante 10 min, se colocó en hielo y el cDNA obtenido se cuantificó en Nanodrop a 260 nm.

## 6.6. Amplificación por PCR del gen *tvcp2*

Se colocó a una reacción de amplificación en un tubo Eppendorf nuevo para PCR, se le agregó 500 ng de cDNA de parásitos crecidos en las diferentes condiciones de hierro o glucosa, 0.2  $\mu\text{l}$  de la enzima Taq polimerasa, 5  $\mu\text{l}$  de amortiguador para PCR 10 $\times$ , 5  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgCl}_2$  50 mM, 1  $\mu\text{l}$  de desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTP's) 0.2 mM y 1  $\mu\text{l}$  de cada uno de los oligos (directo y reverso) para el gen *tvcp2*. El Oligo directo fue 5'-GCCGGTACCATGTTTGCTTTCTTGCTTTCTGGCGCT-3'; el oligo reverso fue 5'-GGCGAATTCTTAGAGAGCCTTTGGAAGGATAGTTCAG-3'. La reacción se llevó a un volumen final de 50  $\mu\text{l}$ . Como control positivo se preparó una reacción de 50  $\mu\text{l}$  que se le añadió 500 ng de DNAg. Como controles negativos se preparó una



reacción de 50  $\mu$ l, con RNA tratado con DNAsa I como molde y otra reacción sin DNA. Las condiciones de PCR que se utilizaron para amplificar el gen *fvcp2* fueron: 95 °C por 2 min y 20 ciclos de 95 °C por 1 min, 55 °C por 35 s, 72 °C por 1:20 min y 1 ciclo de 72 °C por 7 min. La reacción de PCR se almacenó a -20°C hasta su análisis. Como control de carga se amplificó el gen  $\beta$ -tubulina. Los productos de amplificación se analizaron en geles de agarosa al 1% con bromuro de etidio (0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l) en amortiguador TBE 1x a 80 V durante 45 min.

#### **6.7. Extracción de proteínas totales por precipitación con ácido tricloroacético (TCA) al 10%**

Esta técnica nos permitió extraer las proteínas totales del parásito para realizar metodologías subsecuentes, como el corrimiento electroforético, transferencia de proteínas, WB, etc.

A parásitos ( $20 \times 10^6$ ) en fase logarítmica de crecimiento en diferentes condiciones de cultivo se les hicieron 3 lavados con PBS pH 7 frío y se resuspendieron en 900  $\mu$ l de PBS pH 7 frío al cual se le añadieron 100  $\mu$ l de TCA al 100%, se mezcló bien y se incubó por 18 h a 4 °C. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 13 000  $\times$  g por 5 min a 4 °C, la pastilla se lavó 5 veces con PBS y se centrifugó a 13 000  $\times$  g por 5 min a 4 °C. Las paredes del tubo se secaron con un hisopo estéril después de los lavados. La pastilla se resuspendió en 400  $\mu$ l de amortiguador de muestra 1x, la muestra se hirvió por 5 min y se centrifugó a 13 000  $\times$  g por 5 min y se cargó en geles de poli(acrilamida), dependiendo de la concentración requerida en cada ensayo. Las proteínas se analizaron por SDS-





PAGE en geles de poliacrilamida, los cuales se tiñeron con Azul de Coomassie o se transfirieron a membrana de NC de 0.45  $\mu\text{m}$  (BIO-RAD) para los ensayos de WB.

#### **6.8. Extracción de proteínas resistentes a proteasas**

Por medio de esta técnica se obtuvieron extractos de proteínas resistentes a proteasas de *T. vaginalis* para realizar la detección por WB de las proteasas de interés, como la TvCP2.

Parásitos ( $20 \times 10^6$ ) crecidos en diferentes condiciones de cultivo, se les hicieron 3 lavados con PBS pH 7 frío y se resuspendieron en 450  $\mu\text{l}$  de PBS pH 8, al cual se le adicionó 50  $\mu\text{l}$  de DOC al 10% y se incubó por 20 min a 4 °C. Posteriormente se le añadió 450  $\mu\text{l}$  de PBS pH 8 y se mezcló bien. Después se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de sacarosa con rojo fenol al fondo del tubo (colchón de sacarosa) y se centrifugaron a  $13\ 000 \times g$  por 30 min. El sobrenadante se analizó por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida estándar o copolimerizada con gelatina al 0.2%.

#### **6.9. Western blot**

Esta técnica permitió la identificación de proteínas la banda de la proteinasa TvCP2 por WB en una dimensión, lo cual nos permitió seguir el comportamiento de esta proteína en respuesta a diferentes condiciones de hierro y de glucosa en el medio.



En una charola se colocó amortiguador de transferencia donde se preparó el "sándwich" en el siguiente orden: lado oscuro de la unidad de transferencia, esponja, papel filtro Whatman No 3, gel de poliacrilamida que se transfirió (colocando marcadores a la derecha), membrana de nitrocelulosa (NC) de 0.45  $\mu\text{m}$ , papel filtro Whatman No. 3, esponja y lado transparente de la unidad. Enseguida, se colocó el lado negro de la unidad de transferencia de tal manera que coincidiera con la cara negra de la cámara de transferencia, la cual se colocó en la unidad de transferencia y en baño de hielo. La transferencia se realizó con agitación suave en frío a 40 V por 20 min y posteriormente 1 h a 100 V.

Posteriormente por tinción de las membranas con Rojo de Ponceau al 100%, se verificó la transferencia se capturó la imagen en el fotodocumentador, se destifieron con PBS pH 7 y las membranas se bloquearon con leche al 10% en PBS-T 0.1% toda la noche en agitación constante a 4°C.

Las membranas bloqueadas se lavaron 5x con PBS-Tween 20 al 0.1% (PBS-T) durante 10 min por lavado a TA. Las membranas de NC se incubaron 18 h con el anticuerpo primario diluido en PBS-T al 0.05%. Las diluciones de los anticuerpos primarios dependen del tipo de revelado, por color o por quimioluminiscencia. Para el anticuerpo  $\alpha$ -TvCP2 se usó una dilución 1:3000. Las membranas se lavaron 5x con PBS-T y se les adicionó el anticuerpo secundario (cabra  $\alpha$ -conejo) acoplado a HRP diluido 1:3000 en PBS-T al 0.05% con leche al 2.5% a 37 °C por 1 h. Las membranas se lavaron 3x con PBS-T en agitación a TA durante 10 min y 2x con PBS pH 7. La reacción se reveló por color o por



quimioluminiscencia. En el revelado por color, las membranas se sumergieron 30 min a TA en la solución de revelado que contiene 7.5 mg de 4-cloro-naftol (BIO-RAD), 2.5 ml de metanol frío, 12.5 ml de TBS y 7.5  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%. Para el revelado por quimioluminiscencia se utilizó el kit de revelado SuperSignal (West Pico Substrate de ThermoScientific) mezclando justo antes de utilizar las soluciones A y B en relación 1:1 el revelador se colocó en la membrana de NC y se reveló en el fotodocumentador utilizando el software ChemiDoc-XRS de Bio-Rad para la captura de las imágenes.

#### 6.10. Cultivo de células HeLa

A placas de 96 pozos se agregaron  $\sim 3.5 \times 10^4$  células/pozo (100  $\mu$ l/pozo) y se <sup>29</sup>incubaron durante 20 h a 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% para obtener monocapas confluentes de células HeLa ( $\sim 5 \times 10^4$  células/pozo). Las monocapas confluentes se lavaron 3x con PBS pH 7 frío para eliminar las células no adheridas y se utilizaron para los ensayos de citotoxicidad como se describe a continuación.

#### 6.11. Ensayo de citotoxicidad

Estos ensayos permitieron conocer si la TvCP2 es parte del proceso de citotoxicidad hacia células HeLa inducida por *T. vaginalis* mediante la inhibición de la función con el anticuerpo policlonal  $\alpha$ -TvCP2r.

Para los ensayos de citotoxicidad  $\sim 2 \times 10^5$  parásitos/pozo, se depositaron sobre monocapas confluentes de células HeLa ( $\sim 5 \times 10^4$  células/pozo), obteniendo una relación 4:1 (parásito/HeLa). La interacción se realizó en medio D-MEM-TYM o TY en una relación 2:1, sin suero bovino. Adicionalmente, el medio DMEM-TYM



se suplementó con 150  $\mu\text{M}$  de 2-2'-dipiridilo, o se eliminó la glucosa del medio DMEM-TY, según correspondiera. La interacción parásito-HeLa se incubó durante 1 h a 37 °C, en atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5%. Al finalizar el tiempo de incubación, se retiró el medio de los pozos y las monocapas se lavaron 3x con PBS pH 7 frío, para eliminar los parásitos. Posteriormente, las monocapas de HeLa se fijaron con formaldehído al 2% en PBS pH 7, durante 10 min a TA, se lavaron 2x con PBS pH7 y se tiñeron con 50  $\mu\text{l}$  de cristal violeta, durante 10 min a TA. Finalmente, los pozos se lavaron 3x con PBS para eliminar el exceso de colorante y la integridad de las monocapas se analizó por microscopía óptica y la imagen se capturó. Para determinar el % de citotoxicidad, el colorante cristal violeta retenido por las monocapas fue eluido con 50  $\mu\text{l}$  de SDS al 1% en etanol al 50% y la absorbancia a 570 nm se cuantificó en el lector de ELISA Multiskan. Los valores de las absorbancias se graficaron utilizando el software GraphPad Prism 6. El % de citotoxicidad se calculó comparando la absorbancia correspondiente a las monocapas de HeLa que interaccionaron con *T. vaginalis*, contra la absorbancia de células HeLa sin tratamiento la cual se tomó como el 100% de monocapa.

### 6.12. Ensayo de inmunofluorescencia indirecta

Para determinar el efecto del hierro y de la glucosa en la localización de la TvCP2 en este ensayo se crecieron  $4 \times 10^6$  parásitos en distintas condiciones de hierro y glucosa, adheridos a cubreobjetos por 18 h a 37 °C. Enseguida, se lavaron con PBS pH 7 filtrado tibio y se fijaron con paraformaldehído al 2% en PBS, tibio, durante 30 min a TA. Después se lavaron 5x con PBS y 5x con PBS-albúmina al 1%. Los parásitos se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.2% por 10





min, otra parte de los parásitos no se permeabilizaron y solo se incubaron con PBS por 10 min, luego los parásitos en ambas condiciones se bloquearon con glicina 0.5 M durante 1 h a TA y se lavaron 5× con PBS-glicina 0.5 M. Las muestras se incubaron por 2 h con 20  $\mu$ l del anticuerpo primario  $\alpha$ -TvCP2 diluido 1:100 en PBS. El anticuerpo secundario cabra  $\alpha$ -conejo conjugado a FITC se diluyó en PBS (1:100), se agregó a las laminillas (20  $\mu$ l) y se incubó durante 2 h a TA. Los parásitos no permeabilizados se incubaron con DIL 1:2 000 (en agua miliQ filtrada) para tefir los lípidos de la membrana plasmática durante 30 min, mientras que los permeabilizados se incubaron solo con PBS. A las laminillas se les agregó 7  $\mu$ l de la resina Vectashield + DAPI para tefir los núcleos (Vector Laboratories), se montaron en portaobjetos y se observaron por microscopía de epifluorescencia (Nikon) y confocal (Zeiss).

### **6.13. Ensayo de colocalización con "Lysotracker"**

Para determinar la localización subcelular de la TvCP2, los parásitos se crecieron en las condiciones de bajo y alto, hierro o glucosa sobre cubreobjetos estériles en placas de 6 pozos, en los cuales se colocó el "Lysotracker Red-DND 99" a una concentración final de 1  $\mu$ M en medio TYM o TYG suplementado con SBA al 10% (2 ml), con los parásitos vivos, se incubó 12 h a 37°C. A partir de aquí todo el procedimiento se realizó protegiendo a las laminillas de la luz. El medio se retiró y los parásitos adheridos a las laminillas se enjuagaron con solución de Hank balanceada en sales 1x tibia. Se fijaron con 1 ml de paraformaldehído al 2% (preparado en PBS pH 7) filtrado a temperatura ambiente, se lavaron 5× con solución de Hank 1× y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.2% en solución de



Hank 1×, las laminillas se lavaron 5× con solución de Hank y se incubaron con 1 ml de suero fetal bovino al 1% en solución de Hank 1×, para posteriormente bloquear las laminillas con glicina 0.5 M en PBS. Las laminillas se lavaron 5× con glicina 0.5 M en PBS y se incubaron con 20  $\mu$ l de anticuerpo anti-TvCP2 diluido 1:100 en solución de Hank 1× durante 2 h, se lavaron 5× con solución de Hank 1× y se incubaron con 20  $\mu$ l de anticuerpo secundario cabra  $\alpha$ -conejo conjugado a FITC diluido 1:100 en solución de Hank 1×. Las laminillas se lavaron 5× con solución de Hank 1× y se montaron en portaobjetos limpios y desengrasados con 7  $\mu$ l de Vectashield + DAPI, se sellaron las laminillas con barniz encapsulador transparente y se analizaron por microscopía confocal (Zeiss).

#### **6.14. Ensayos de secreción *in vitro***

Estos ensayos permitieron saber si la TvCP2 se encuentra en los productos de secreción activa de *T. vaginalis*.

A parásitos ( $25 \times 10^6$ ) crecidos en diferentes condiciones de cultivo se le añadieron 25 ml de PBS-Maltosa 0.5% y se incubaron a 37°C durante 90 min y se recuperó el sobrenadante, para analizar los productos de secreción. Éstos se filtraron por membrana de 0.22  $\mu$ m y el filtrado se precipitó con TCA al 10% durante 18 h, se centrifugó a 4 000  $\times$  g durante 15 min y a la pastilla se le dieron 5 lavados con acetona fría. Después, la pastilla que quedó en las paredes del tubo se resuspendió en 80  $\mu$ l de amortiguador de muestra 1×, se hirvió 5 min y se centrifugó a 13 000  $\times$  g durante 5 min; el sobrenadante se analizó por SDS-PAGE y WB en geles de poliacrilamida al 12%.



### 6.15. Inmunomarcaje para Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

Para realizar inmunomarcaje con oro, cultivos de *T. vaginalis* crecidos en condiciones de alta glucosa (50 mM de glucosa) y restricción de glucosa ( $\leq 1$  mM de glucosa), se fijaron con paraformaldehído al 4% y con glutaraldehído al 0.5% en PBS durante 1 h a TA y después toda la noche a 4°C, se lavó 2x con PBS para eliminar el exceso de fijador y una vez con etanol al 25% para eliminar las sales, seguido de un proceso de deshidratación con etanol al 70%, 90% y 100% por 30 min cada uno. Posteriormente, se realizó la preinclusión con una relación 2:1 de etanol al 100% y resina LR-White (SPI SUPPLIES) durante 1 h en movimiento, luego con una relación 1:1 de etanol al 100% y resina LR-White durante 1.5 h, se dejó en resina pura toda la noche a TA y en movimiento, se hicieron tres cambios de resina pura para dejar en polimerización durante 3 días con luz ultravioleta a TA. Se bloqueó 1 h con SFB al 10%, se realizó el marcaje incubando con el anticuerpo primario  $\alpha$ -TvCP2 dilución 1:40 toda la noche a 4°C, se lavó con amortiguador salino de fosfatos pH 7 para lavar el exceso del anticuerpo primario e incubar con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a partículas de oro de 30 nm durante 1 h a TA en cámara húmeda, se lavó con amortiguador de fosfatos y agua filtrada para quitar las posibles sales residuales. Por último, se realizó el contraste con acetato de uranilo durante 15 min y citrato de sodio durante 1 min, lavando el exceso con agua filtrada.



## **7.-RESULTADOS**

### **7.1. Efecto de la glucosa sobre la expresión de TvCP2**

Para evaluar el efecto de la glucosa sobre la expresión del gen *tvcp2* se realizaron ensayos de RT-PCR semicuantitativa a partir de RNA total de parásitos del aislado CNCD 188 de *T. vaginalis* crecidos en diferentes concentraciones de glucosa (51 mM, 25 y 50 mM) en el cultivo, referidas posteriormente como condiciones de baja, normal y alta glucosa, respectivamente, se sintetizó cDNA de cada condición de glucosa, que se utilizó como molde para amplificar el gen *tvcp2* y el gen  $\beta$ -*tub* como control de carga. El DNA genómico del aislado CNCD 188 se utilizó como molde para el control positivo de amplificación y como controles negativos, se utilizaron RNA tratado con DNasa I, para corroborar que la reacción que observamos efectivamente sea por el cDNA y no por trazas de DNA genómico, así como una reacción sin DNA. En la figura 9 se observa un amplicón de 945 pb en las tres condiciones de glucosa probadas que no muestra cambios en la expresión del gen *tvcp2* debido al estímulo de glucosa, comparado con el amplicón de  $\beta$ -tubulina, de 112 pb, control.

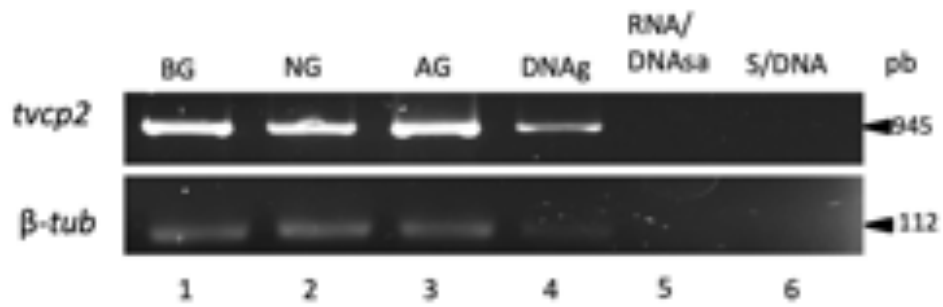
Una vez que observamos que la glucosa no tiene efecto sobre la expresión del gen *tvcp2*, revisamos si había algún efecto de la glucosa al nivel de cantidad de proteína TvCP2. Por lo que, se realizaron ensayos de WB, utilizando extractos de proteínas totales de parásitos del aislado CNCD 188 crecidos en las tres condiciones de glucosa y el anticuerpo policlonal  $\alpha$ -TvCP2r.





**Figura 9.- Efecto de la glucosa sobre la expresión del gen *fvcp2*.** En gel de agarosa al 1% se separó el amplicón obtenido para el gen *fvcp2* en las tres condiciones de glucosa (panel superior) y el amplicón del gen de la  $\beta$ -tubulina como control de carga (panel inferior). Como control positivo de amplificación se usó DNA genómico como molde, como controles negativos de la RT-PCR se usó como molde al RNA tratado con DNAsa I o una reacción sin DNA.







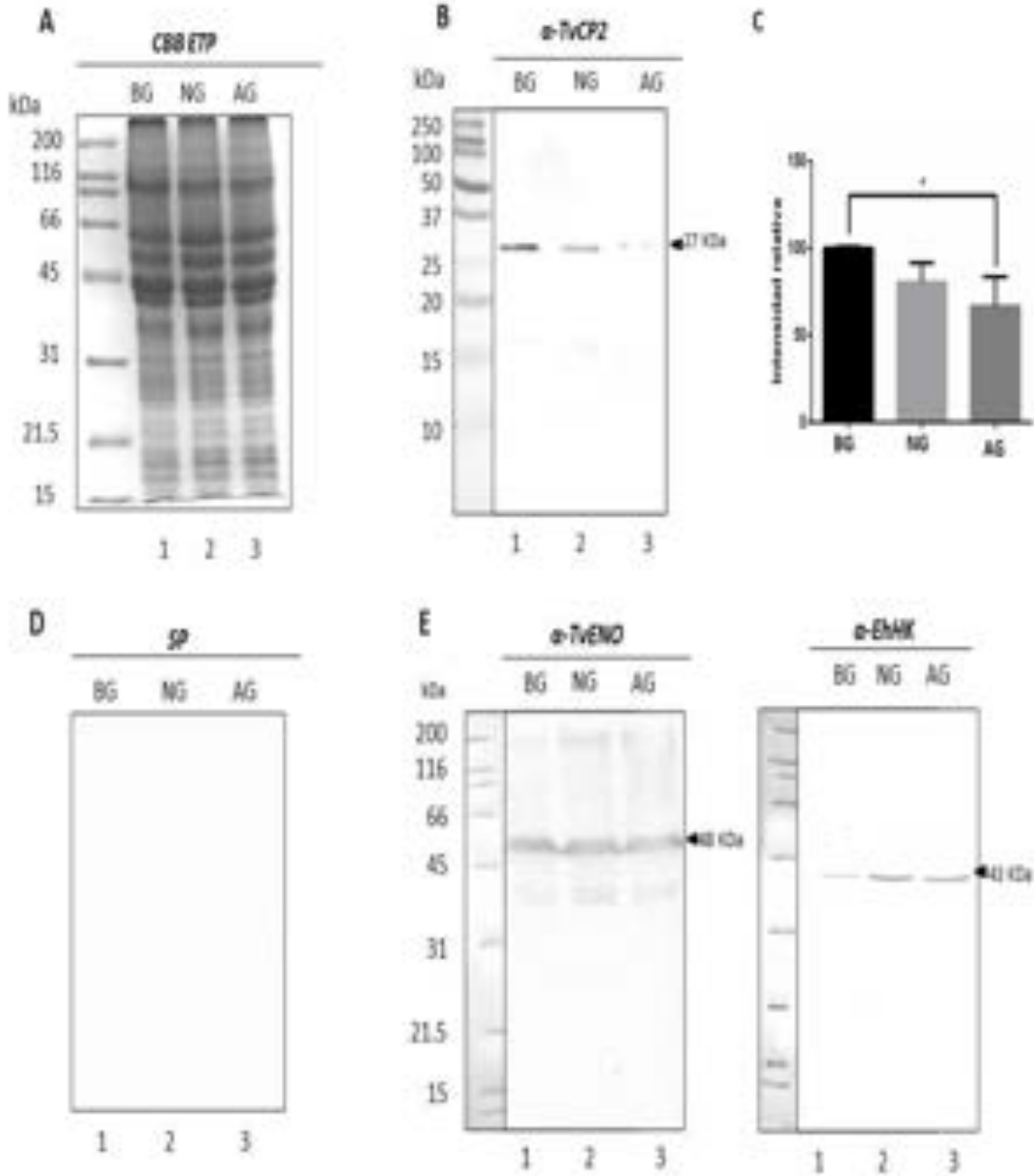
En la figura 10 se muestra el resultado del ensayo de WB con el anticuerpo  $\alpha$ -TvCP2 que reconoció de una banda de 27 kDa, en mayor cantidad en la condición de baja glucosa que en normal y alta glucosa que por el tamaño podría corresponder a la proteasa madura. Con el control de carga ( $\alpha$ -TvENO), se detectó una banda de 48 kDa de la TvENO que no muestra cambios en la cantidad de proteína en las tres condiciones de glucosa, mientras que con el control de respuesta positiva a glucosa ( $\alpha$ -EhHK), se observó una banda de 43 kDa de la TvHK cuya cantidad se incrementó al aumentar la concentración de glucosa en el cultivo. Como era de esperarse, el suero preinmune no mostró reacción (Fig. 10). Del mismo modo se realizó el ensayo de WB utilizando extractos resistentes a proteasas obtenidos de parásitos crecidos en las tres condiciones de glucosa y diferentes anticuerpos primarios. En la figura 11 se muestra el resultado obtenido con los extractos resistentes a proteasas, en el que se puede observar el perfil de proteínas del extracto resistente a proteasas (panel A).



**Figura 10.- Efecto de la glucosa sobre la cantidad de TvCP2, en extractos totales de proteínas.** A) Perfil de proteínas totales de parásitos crecidos en las tres condiciones de glucosa, utilizando un extracto total de proteínas precipitado con TCA al 10%. B) WB con el anticuerpo  $\alpha$ -TvCP2, que muestra una mayor cantidad de proteína en la condición de baja glucosa. C) Análisis densitométrico de la cantidad de proteína TvCP2 en las diferentes condiciones de glucosa. D) Control de suero preinmune que no muestra reacción. E) Control de carga, utilizando el anticuerpo  $\alpha$ -TvE<sub>no</sub>, que no responde a las condiciones de glucosa. F) Control de respuesta positiva a glucosa, con el anticuerpo  $\alpha$ -EhHK, que muestra mayor cantidad de proteína TvHK en la condición de alta glucosa.









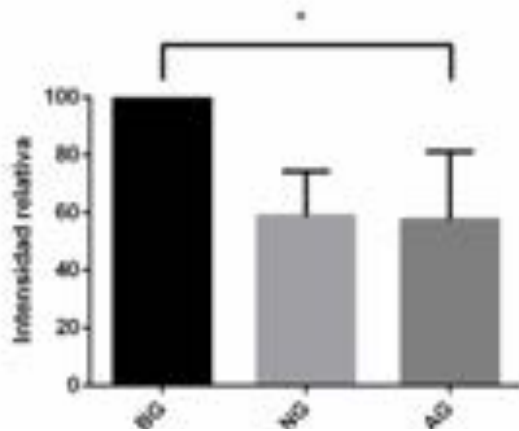
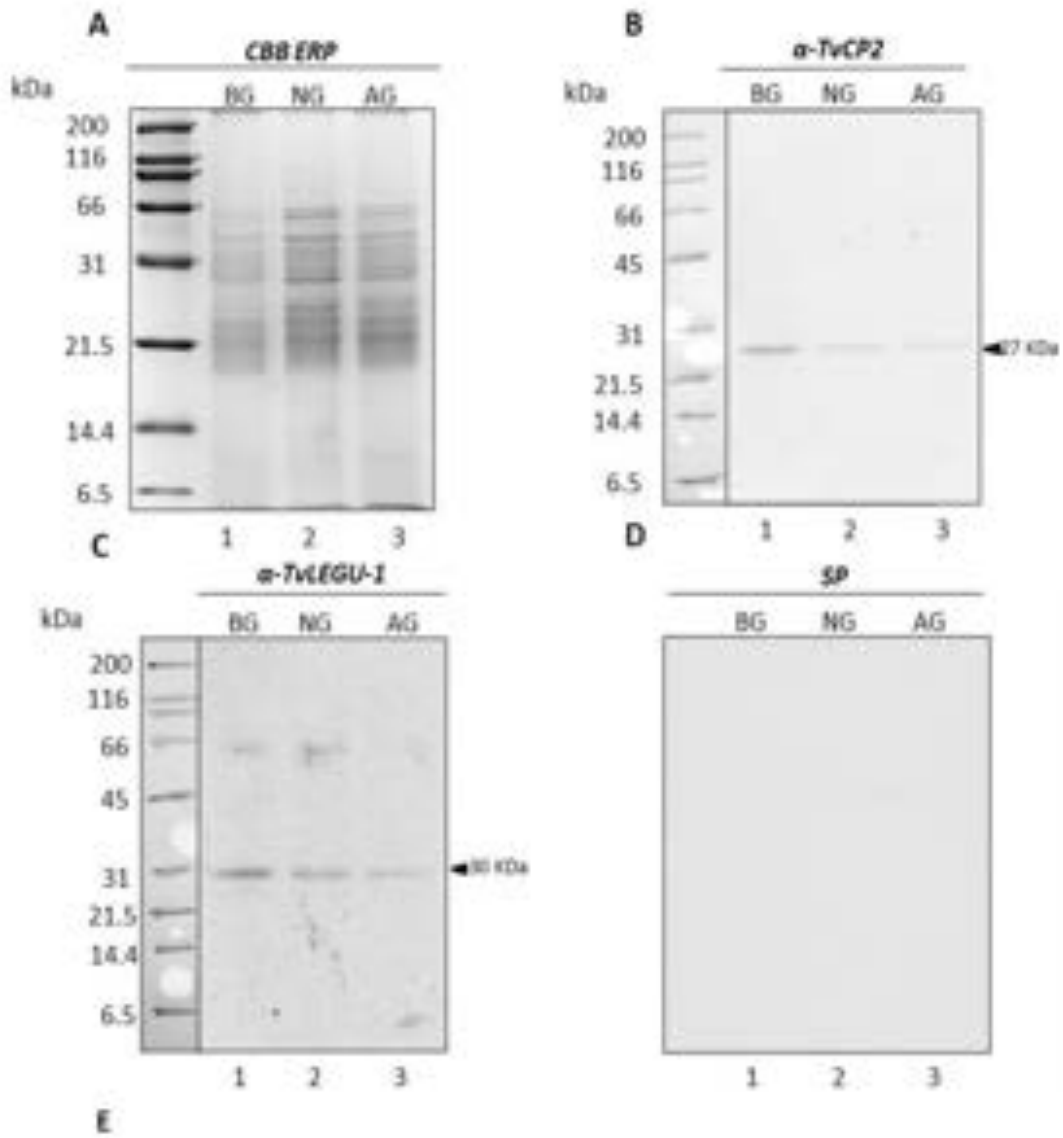
de parásitos crecidos en las diferentes condiciones de glucosa. Los resultados de los ensayos de WB con el anticuerpo  $\alpha$ -TvCP2 mostraron una mayor cantidad de proteína en la condición de baja glucosa en el peso esperado de 27 kDa, respecto a las condiciones de normal y alta glucosa (panel B), similar a lo observado con el anticuerpo  $\alpha$ -TvLEGU-1 utilizado como el control de respuesta a glucosa, que también respondió negativamente a la glucosa, ya que se observó una mayor cantidad de proteína en el peso esperado de 30 kDa, en la condición de baja glucosa, comparando con normal y alta glucosa (panel C). El suero preinmune utilizado como control negativo, no mostró reacción (panel D). Para los extractos resistentes a proteasas no se tiene un control de carga para los ensayos de WB debido a que las proteínas que son clásicamente usadas como control de carga son susceptibles a degradación por proteasas. Estos ensayos fueron realizados por triplicado, con resultados similares que muestran diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Con estos datos, se puede concluir que la glucosa tiene un efecto negativo en la cantidad de proteína TvCP2.

Después que determinamos el efecto de la glucosa sobre la expresión del gen *tvcp2* y la cantidad de proteína TvCP2, se revisó el efecto de la glucosa en la localización de la TvCP2. Por lo que se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta utilizando parásitos del aislado CNCD 188 crecidos sobre laminillas en las condiciones de baja, normal y alta glucosa, los cuales se probaron con el anticuerpo  $\alpha$ -TvCP2 y se analizaron por microscopía confocal



**Figura 11.- Efecto de la glucosa sobre la cantidad de TvCP2, en extractos de proteínas resistentes a proteasas.** A) Se muestra el perfil de proteínas obtenidas a partir de extractos resistentes a proteasas de parásitos crecidos en las condiciones de baja, normal y alta glucosa. B) WB con el anticuerpo  $\alpha$ -TvCP2, que muestra una mayor cantidad de proteína en la condición de baja glucosa. C) Control de respuesta negativa a glucosa con el anticuerpo  $\alpha$ -TvLegu-1. D) Control negativo utilizando suero preimmune. E) Análisis densitométrico de la cantidad de proteína TvCP2 en las distintas condiciones de glucosa.









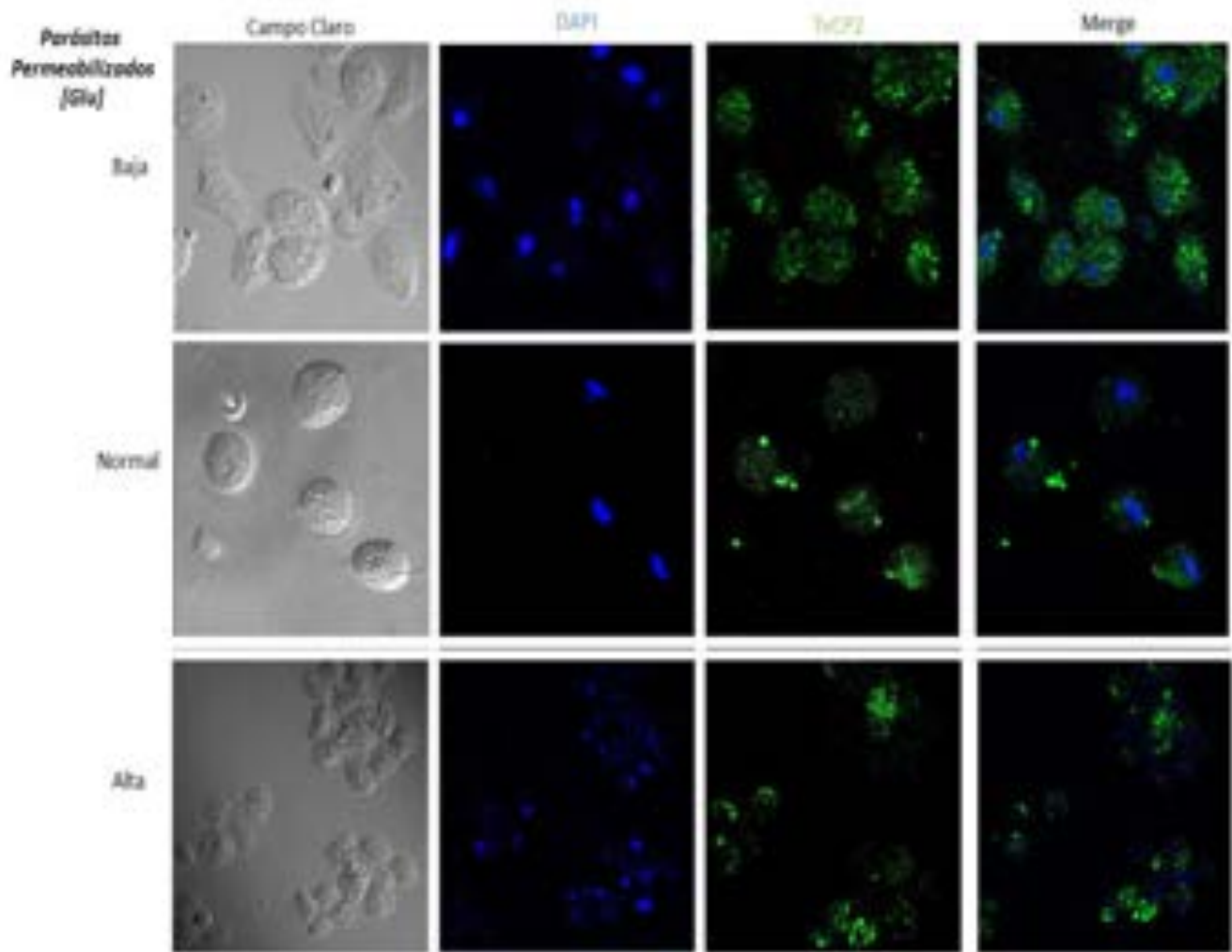
para detectar la localización de la proteína en el parásito. Por ensayos realizados por Lorenzo-Benito, 2011 en su trabajo de maestría, se tiene el antecedente que al utilizar parásitos crecidos en condiciones normales (medio TYM) la TvCP2 presenta localización dispersa en el citoplasma, así como localización de superficie. Por lo que nuestro objetivo fue ver si la glucosa tenía un efecto en la localización de la TvCP2 en el parásito. En la figura 12 se muestran las imágenes de microscopía confocal obtenidas de parásitos permeabilizados, en los cuales la marca de TvCP2 efectivamente presenta una localización citoplásmica, difusa, cercana a la membrana, de aspecto punteado y que podría corresponder a vesículas. El análisis comparativo entre las diferentes condiciones de glucosa, se observa una mayor cantidad de marca en los parásitos de baja glucosa, comparados con los de glucosa normal y alta, aunque el patrón de distribución se mantiene en las tres condiciones de glucosa. En la figura 13 se muestran las imágenes de microscopía confocal obtenidas de parásitos no permeabilizados, en los cuales la marca de la TvCP2 tiene localización citoplásmica, difusa, con algunos puntos de colocalización con el marcador DIL de membrana que disminuyó con el estímulo de glucosa.

Resulta interesante el patrón de distribución de la marca de TvCP2 en los parásitos, sobre todo el aspecto punteado que presentan, que semejan a vesículas, por lo que, para corroborar esta distribución, se realizaron ensayos de inmunolocalización con partículas de oro y microscopía electrónica de transmisión (MET), utilizando parásitos del aislado CNCD 188 crecidos en condiciones de baja y alta glucosa incubados con el anticuerpo  $\alpha$ -TvCP2. En la figura 14, del panel A al



**Figura 12.- Efecto de la glucosa en la localización de la TvCP2 en parásitos permeabilizados.** En la parte superior se muestran las imágenes obtenidas a partir de parásitos crecidos en las tres condiciones de glucosa. Se muestra el campo claro, la marca de DAPI en azul, que es un marcador de núcleo, la marca de TvCP2 en verde utilizando FITC como marcador y el traslape entre la marca de DAPI y FITC el cual muestra la localización citoplásmica de la TvCP2.



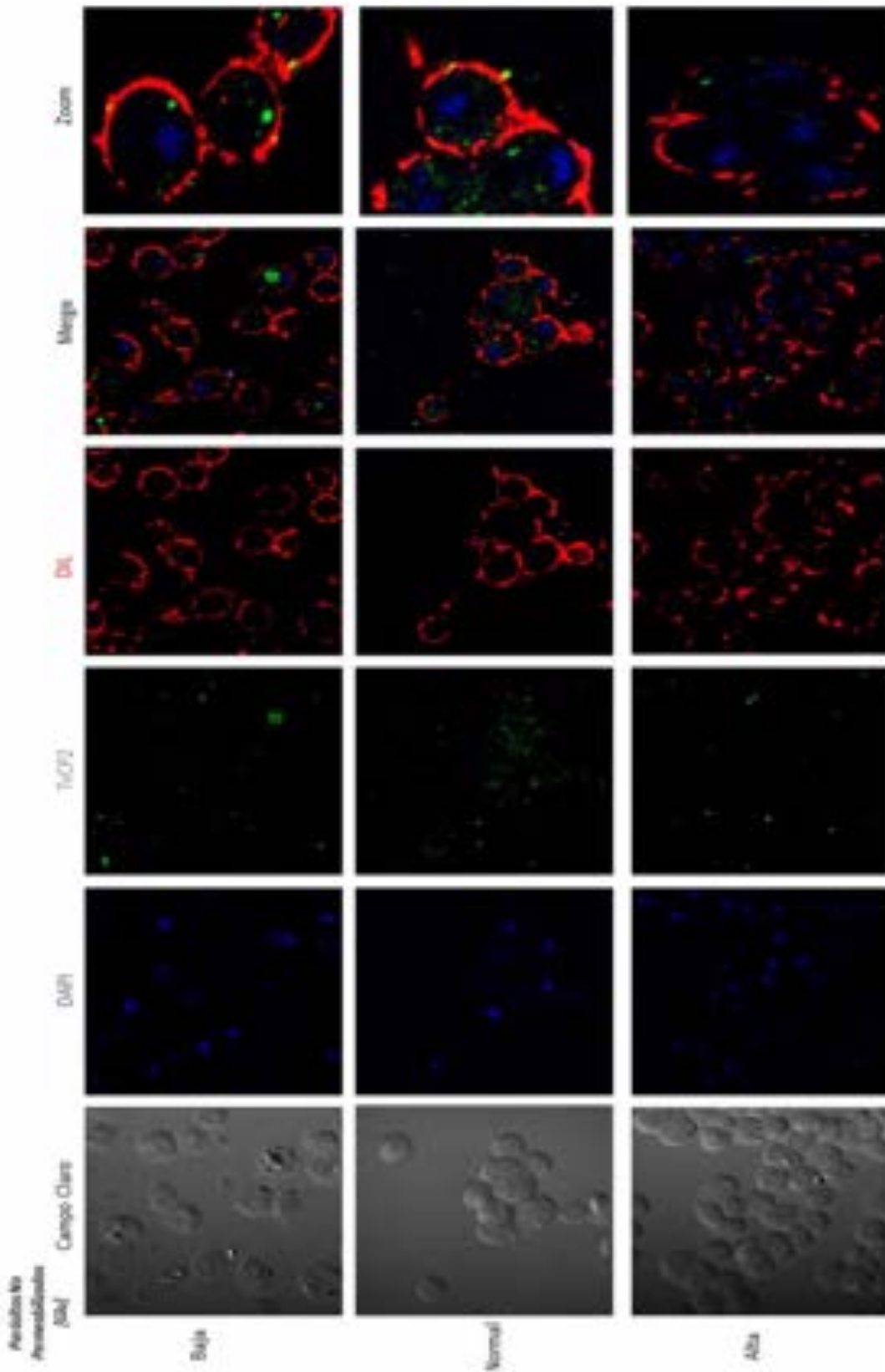




**Figura 13.- Efecto de la glucosa en la localización de la TvCP2 en parásitos no permeabilizados.** En la parte superior se muestran las imágenes obtenidas a partir de parásitos crecidos en las tres condiciones de glucosa. Se muestra el campo claro, la marca de DAPI **en azul**, que es un marcador de núcleo, la marca de TvCP2 **en verde** utilizando FITC como marcador, la marca de DIL **en rojo**, que es un marcador de membrana, el traslape entre la marca de DAPI y FITC el cual muestra la localización citoplásmica de la TvCP2 y un acercamiento que muestra las zonas de colocación entre la marca de TvCP2 y DIL.







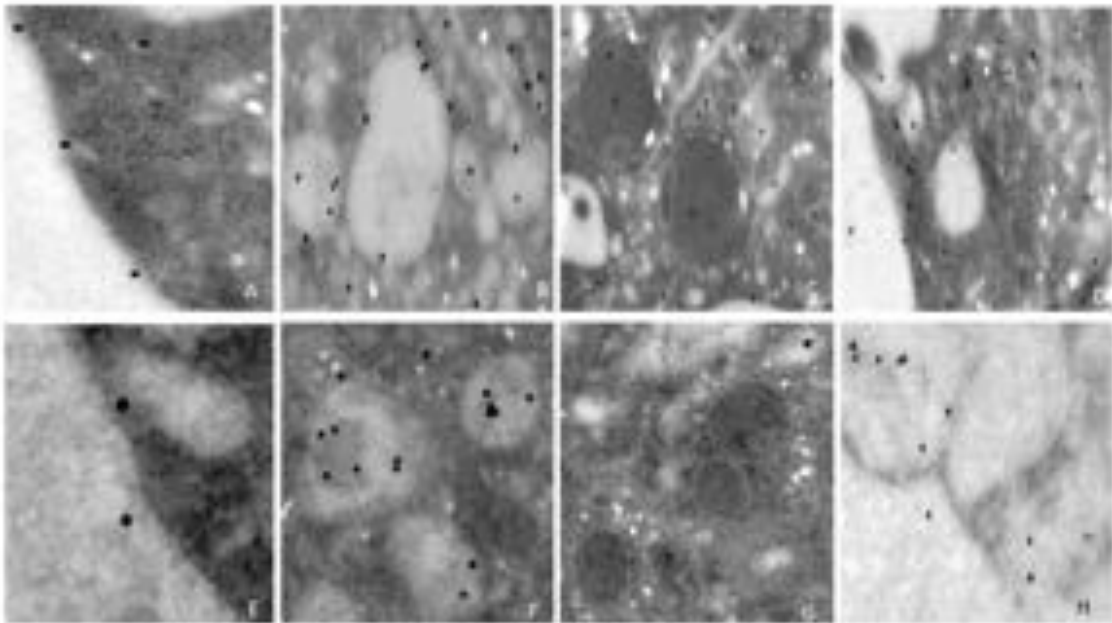


D se muestran las imágenes obtenidas de parásitos crecidos en condición de restricción de glucosa, en los que se puede apreciar marca de la TvCP2 dispersa en el parásito (61.7%), asociada a organelos como en la membrana de hidrogenosomas (1.77%), y en menor medida en el interior, así como también asociada a la superficie de vesículas o en el interior de las mismas (30.09%). La marca de oro de TvCP2 también se encontró libre en el citoplasma, asociada a la membrana del parásito (6.07%) posiblemente a través de una vía dependiente de vesículas. Además, se encontró marca de TvCP2 en el exterior del parásito, como si fuera un producto de secreción (4.05%). Del panel E al H, se muestran imágenes obtenidas de parásitos crecidos en alta glucosa, en los que se observa una menor cantidad de marca, con respecto a la condición de baja glucosa, lo que es consistente con lo obtenido por WB en cuanto a la cantidad de proteína en estas condiciones de glucosa; se observa que hay marca que se encuentra asociada a vesículas (54.15%), ya sea en membrana o en el interior de las mismas, también se observa marca asociada a la membrana del parásito (3.99%) la cual posiblemente se movilice a través de un mecanismo dependiente de vesículas. En esta condición se encontró marca de la TvCP2 asociada a hidrogenosomas (1.00%), lo que nos indica que posiblemente en la condición de restricción de glucosa tenga una participación, aunque en estos momentos es difícil dilucidar cuál sería esa función en hidrogenosomas. %). El porcentaje de marca se obtuvo a partir del conteo de partículas de oro en 8 imágenes de cada condición de glucosa. En la tabla 2 se muestra el porcentaje de localización de la marca de TvCP2 por compartimento celular, encontrando que hay cambios en la cantidad de marca localizada debido a la concentración de glucosa.



**Figura 14.- Inmunolocalización de la TvCP2 por marcaje con oro.** En la fila A-D se muestran imágenes de la marca con oro de TvCP2 en parásitos crecidos en condiciones de restricción de glucosa. En estas imágenes se puede apreciar que la marca de TvCP2 se encuentra en distintas localizaciones, como son hidrogenosomas, vesículas, membrana del parásito, así como producto de secreción. En la fila E-H, se muestran imágenes de parásitos crecidos en altas concentraciones de glucosa, que muestran localización de TvCP2 en vesículas, membrana del parásito, así como secretada.









**Tabla 1. A. Cantidad de partículas de oro y % de localización de la marca de TvCP2 en baja glucosa**

Imagen	Cantidad de partículas de oro	Membrana	Vesículas	Hidrogenosomas	Libre en citoplasma	Secreción	Núcleo
1	207	5	79	5	118	0	0
2	181	17	46	3	115	6	0
3	45	2	10	0	30	3	3
4	30	2	17	1	10	10	0
5	122	6	39	0	77	3	0
6	162	10	40	5	107	5	0
7	44	6	7	0	31	5	0
Promedio	113	6.86	34	2	69.71	4.57	0.43
% localización		6.07	30.09	1.77	61.69	4.05	0.38

**B. Cantidad de partículas de oro y % de localización de la marca de TvCP2 en alta glucosa**

Imagen	Cantidad de partículas de oro	Membrana	Vesículas	Hidrogenosomas	Libre en citoplasma	Secreción	Núcleo
1	46	1	28	0	15	2	0
2	26	1	7	0	14	4	0
3	41	1	24	0	14	2	0
4	49	1	28	1	13	6	0
5	36	1	28	2	4	1	0
6	46	2	18	0	21	5	0
7	20	1	11	0	7	1	0
8	37	4	19	0	12	2	0
Promedio	37.63	1.50	20.38	0.38	12.50	2.88	0
% localización		3.99	54.15	1.00	33.22	7.64	0



La localización en vesículas, en ambas condiciones de glucosa, aunado a los datos que se tienen por microscopía confocal, sugieren que posiblemente parte de las vesículas a las cuales se encuentra anclada la TvCP2 sean lisosomas. Para comprobarlo, se realizaron ensayos de colocalización con un marcador de lisosomas. Este experimento se realizó utilizando parásitos del aislado CNCD 188 crecidos en condición de baja y alta glucosa en presencia de LysoTracker Red 1  $\mu\text{M}$  durante 12 h.

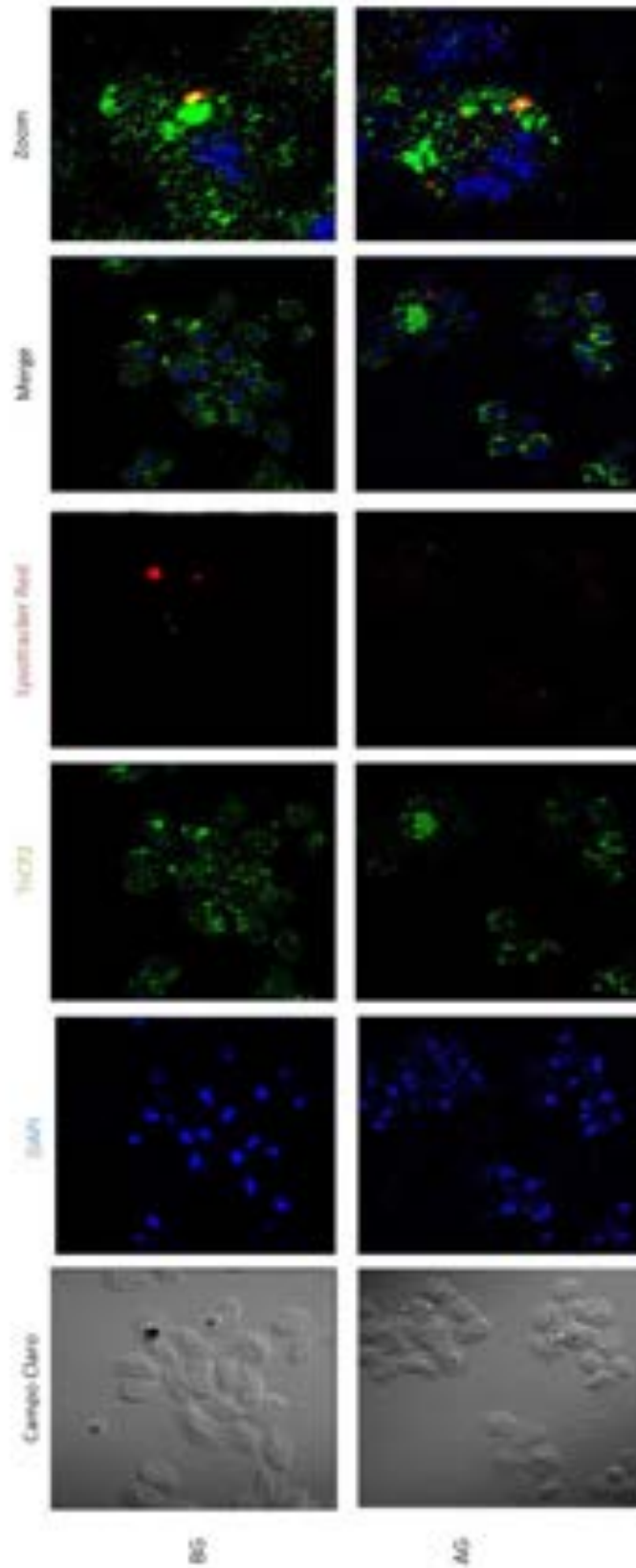
<sup>27</sup> En la figura 15 se muestra el resultado de los ensayos de colocalización con LysoTracker, en los cuales se observa en la fila A-E el resultado correspondiente a parásitos en baja glucosa, en los que podemos observar colocalización (en amarillo) entre algunas de las marcas de la TvCP2 (verde) con la marca de LysoTracker (rojo). En la fila F-J se muestra lo obtenido con parásitos crecidos en alta glucosa, en los que se observa que también existen puntos de colocalización (amarillo) entre la marca de TvCP2 y la de LysoTracker. Con esto, podemos decir que parte de la asociación de la marca de TvCP2 a vesículas, es porque a la TvCP2 se le encuentra en lisosomas, pudiendo tener una función degradativa en el lisosoma o que la vesícula actúe como transporte de la proteasa.

Con los datos anteriormente descritos, podemos decir que la glucosa tiene un efecto global sobre la TvCP2, a pesar de que no afecta la expresión del gen *tvcp2*, si muestra un efecto negativo tanto a nivel de cantidad de proteína como en la localización en el parásito, al tener una mayor cantidad de proteína en la



**Figura 15.- Ensayo de colocación de TvCP2 con lysotracker.** En la parte superior se muestran las imágenes obtenidas a partir de parásitos crecidos en las tres condiciones de glucosa. Se muestra el campo claro, la marca de DAPI **en azul**, que es un marcador de núcleo, la marca de TvCP2 **en verde** utilizando FITC como marcador, la marca de lisosomas **en rojo**, utilizando Lysotracker Red, el traslape entre la marca de DAPI, FITC Y Lysotracker Red, el cual muestra la localización citoplásmica de la TvCP2 y que colocaliza en algunos puntos con la marca de lisosomas.









condición de baja glucosa, y que esta condición podría favorecer la aparición de la TvCP2 en la membrana del parásito, así como en otros organelos, desconociendo por el momento la posible función de la TvCP2 en dichos organelos, como en los hidrogenosomas.

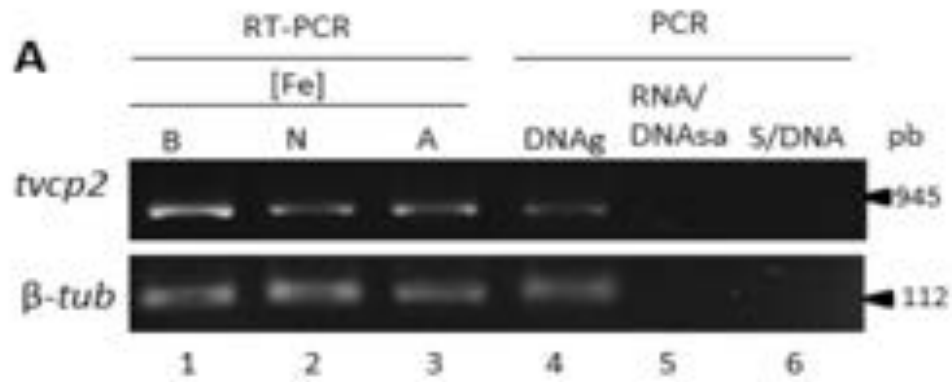
## **7.2. Efecto del hierro sobre la expresión de TvCP2**

Una vez que se determinó el efecto de la glucosa sobre la TvCP2, se estudió el efecto del hierro, otro factor ambiental al que se enfrenta *T. vaginalis* en su ambiente natural cuyos niveles fluctúan durante el ciclo menstrual. Por lo que se inició con la determinación del efecto del hierro sobre la expresión del gen *tvcp2* por ensayos de RT-PCR semicuantitativa. Para los ensayos de RT-PCR se utilizó cDNA de parásitos del aislado CNCD 147 crecidos en condiciones de bajo, normal y alto hierro, como molde el DNA genómico del aislado CNCD 147 se utilizó como control positivo, y como controles negativos se utilizó RNA tratado con DNAsa I, para demostrar que el amplificado a partir de cDNA no se deba a trazas de DNA genómico y una reacción sin DNA. El gen de la beta-tubulina ( $\beta$ -*tub*) también se amplificó como control de carga, ya que este gen no muestra cambios en su expresión por las diferentes condiciones de hierro. En la figura 15 se muestra el amplicón de 945 pb del tamaño esperado para el gen *tvcp2* que es más abundante en la condición de bajo hierro comparado con las condiciones normales y de alto hierro mientras que el amplicón de 112 pb de la  $\beta$ -tubulina no muestra



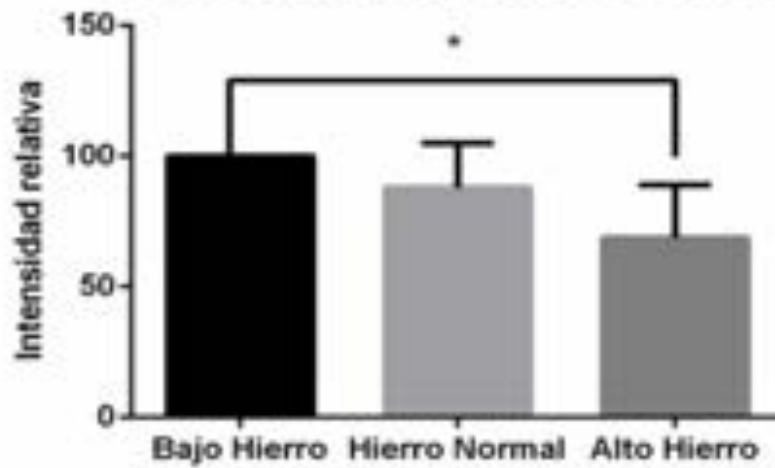
**Figura 16.- Efecto del hierro sobre la expresión del gen *hvp2*.** En la parte superior se muestra un gel de agarosa al 1%, que presenta el amplicón de 945 pb esperado para el gen *hvp2* en las condiciones de bajo, normal y alto hierro, así como el amplicón de  $\beta$ -tubulina, como control de carga. El control positivo fue DNA genómico de CNCV 147, los controles negativos fueron RNA tratado con DNAsa I y una reacción de PCR sin DNA. Estos resultados se hicieron por triplicado en experimentos independientes y las diferencias encontradas en el análisis densitométrico fueron significativas  $p < 0.05$ .





**B**

**Análisis densitométrico de RT-PCR del gen *tvcp2* en diferentes condiciones de hierro**





cambios en las condiciones de hierro probadas. Estos resultados indican que el hierro afecta de manera negativa la expresión del gen *tvcp2*.

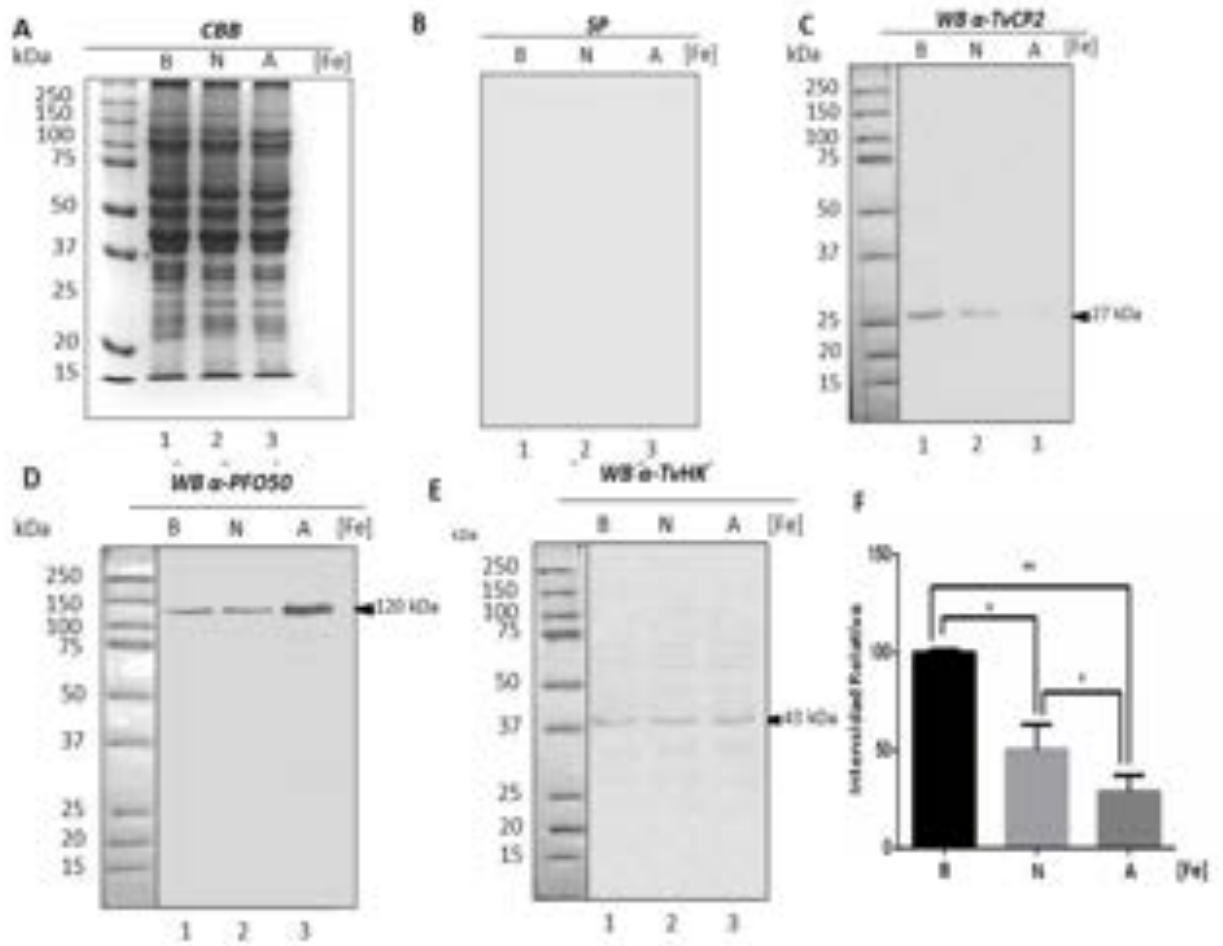
Después de determinar <sup>2</sup> que el hierro tiene un efecto negativo en la expresión del gen *tvcp2*, se analizó si presentaba el mismo efecto a nivel de cantidad de proteína. Para esto se realizaron ensayos de WB con extractos totales de proteínas de parásitos crecidos en las condiciones de bajo, normal y alto hierro y se probaron con diferentes anticuerpos primarios: el anticuerpo  $\alpha$ -EhHK como control de carga, ya que la hexoquinasa de *T. vaginalis* (TvHK) es una proteína que no cambia su cantidad de proteína en diferentes condiciones de hierro; el anticuerpo  $\alpha$ -TvPFO, como control de respuesta positiva a hierro, ya que la PFO se modula positivamente por hierro y como control negativo se usó suero preinmune. La figura 16 muestra que el anticuerpo  $\alpha$ -TvCP2 presentó mayor reconocimiento de la banda de 27 kDa en bajo hierro, comparado con condiciones normales y de alto hierro; mientras que el anticuerpo  $\alpha$ -TvPFO mostró mayor reconocimiento de la proteína PFO de 120 kDa en alto hierro que en condiciones normales y de bajo hierro y el anticuerpo  $\alpha$ -EhHK mostró cantidades similares de la banda de 45 kDa de la TvHK, en las tres condiciones de hierro probadas. Estos resultados coinciden con el efecto obtenido a nivel de transcrito con las variaciones de hierro en el cultivo.





**Figura 17.- Efecto del hierro sobre la cantidad de proteína TvCP2 en extractos totales de proteínas.** A) Perfil de proteínas de parásitos crecidos en las condiciones de bajo, normal y alto hierro en un <sup>3</sup>gel de poliacrilamida al 12% teñido con Azul de Coomassie. B) Ensayo de WB con el suero preinmune que no muestra reconocimiento. C) Ensayo de WB con el anticuerpo  $\alpha$ -TvCP2. D) Ensayo de WB con el anticuerpo  $\alpha$ -TvPFO. E) Ensayo de WB con el anticuerpo  $\alpha$ -EhHK como control de carga, ya que la cantidad de proteína TvHK no cambia por hierro. F) Análisis densitométrico de la cantidad de proteína TvCP2 en las distintas condiciones de hierro.







del mismo modo, se probó a la TvCP2 por WB en parásitos crecidos en las diferentes condiciones de hierro utilizando un extracto resistente a proteasas y diferentes anticuerpos primarios: el anticuerpo  $\alpha$ -TvCP2, el anticuerpo  $\alpha$ -TvLegu-1 usado como control carga y como control negativo se usó el suero preinmune. En la figura 18 se muestra el perfil de proteínas resistentes a proteasas de parásitos crecidos en las tres condiciones de hierro teñidas con Azul de Coomassie (panel A). Por WB con el anticuerpo  $\alpha$ -TvCP2 se observó una mayor cantidad de la proteína de 27 kDa en la condición de bajo hierro que en normal y alto hierro (panel B) comparado con los controles con el anticuerpo  $\alpha$ -TvLEGU-1, que reconoció una banda de ~30 kDa pero no muestra cambios en la cantidad de proteína en las diferentes condiciones de hierro (panel C) y con el suero preinmune, que no muestra reacción en ninguna condición (panel D). El análisis densitométrico de las bandas detectadas con el anticuerpo  $\alpha$ -TvCP2 confirma las diferencias observadas (panel E) que son significativas entre bajo y alto hierro  $P < 0.05$ .

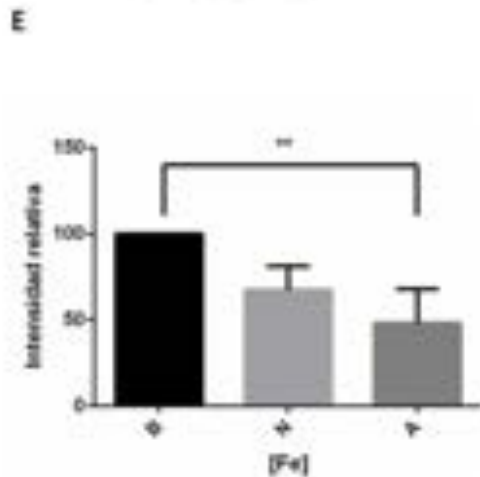
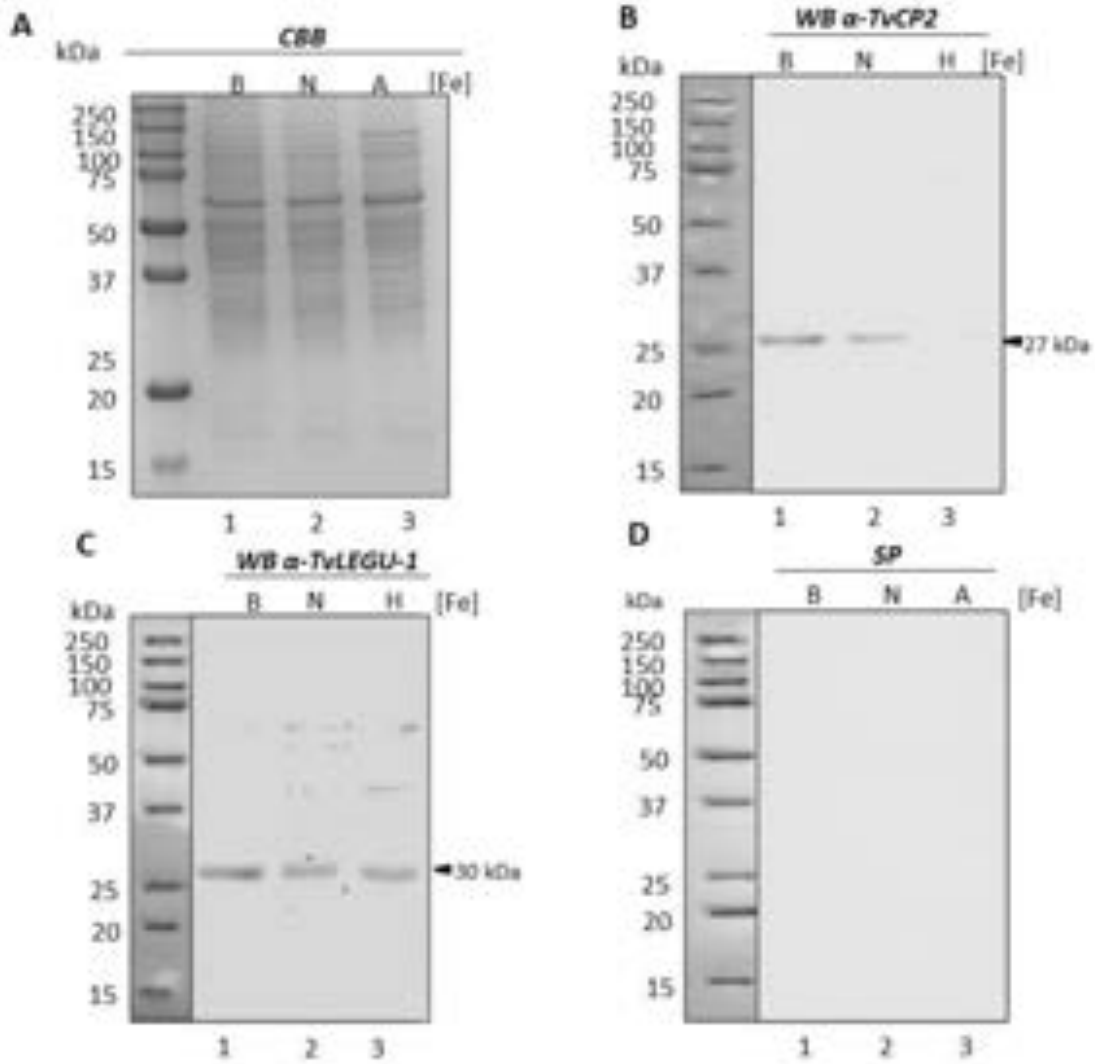
Una vez que determinamos <sup>2</sup> que el hierro tiene un efecto en la expresión del gen *tvcp2*, así como en la cantidad de proteína, se analizó si el hierro también puede modular la localización de la proteína TvCP2 en el parásito. Para esto parásitos del aislado CNC D 147 se crecieron sobre laminillas en las condiciones de bajo, normal y alto hierro, se fijaron, se permeabilizaron, y se incubaron con el anticuerpo  $\alpha$ -TvCP2, para detectar la localización de la proteína en las diferentes condiciones de hierro. En la figura 19 se puede observar una mayor cantidad de marca (verde) en bajo hierro comparado con alto hierro; la marca se encuentra



**Figura 18.- Efecto del hierro sobre la cantidad de proteína TvCP2 en extractos resistentes a proteasas.** A) Perfil de proteínas obtenidas a partir de extractos resistentes a proteasas de parásitos crecidos en las condiciones de bajo, normal y alto hierro teñido con azul de Coomassie; B) WB con el anticuerpo  $\alpha$ -TvCP2; C) Control de carga con el anticuerpo  $\alpha$ -TvLegu-1. D) Control negativo con el suero preimmune. E) Análisis densitométrico de la cantidad de proteína TvCP2 en las diferentes concentraciones de hierro.









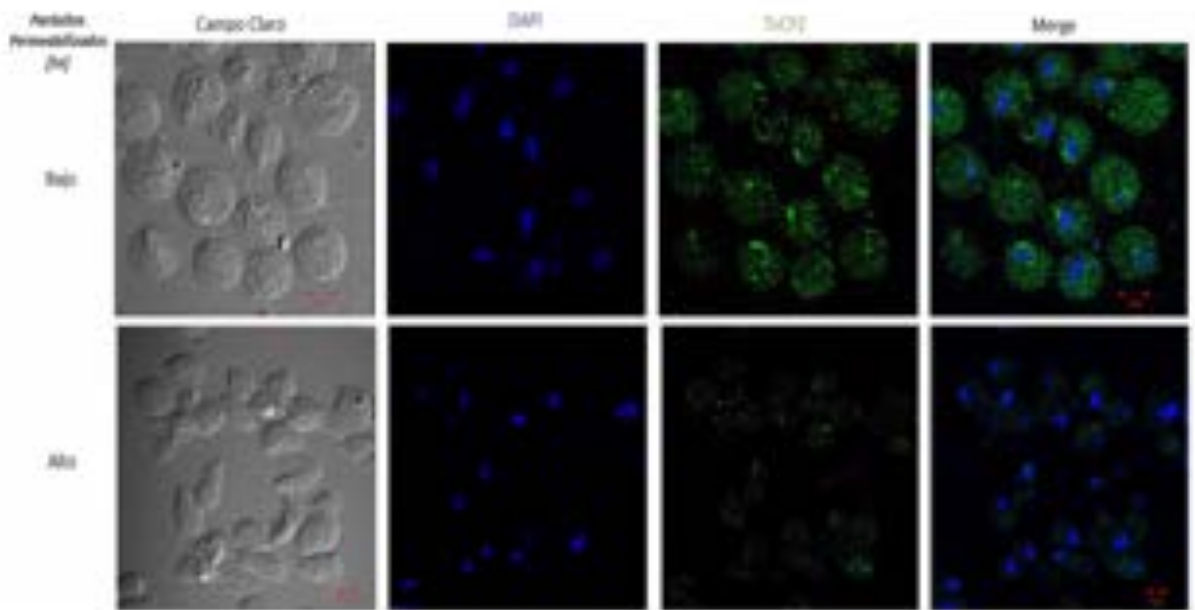
dispersa en el citoplasma de aspecto punteado, que parecieran ser vesículas y también localizada en ciertas regiones de manera focalizada o en acúmulos o cercana a la membrana. En la figura 20 se muestran imágenes de microscopia confocal en parásitos no permeabilizados crecidos en las tres condiciones de hierro en las que se observa la marca de TvCP2 dispersa en citoplasma, con algunos puntos de localización con el marcador DIL. Es interesante observar que la cantidad de marca de TvCP2 en la membrana se incrementa en la condición de alto hierro, mientras que la citoplásmica se incrementa en la condición de bajo hierro.

Con estos resultados podemos concluir que el hierro tiene un efecto negativo sobre la TvCP2, tanto a nivel de transcrito como de cantidad de proteína, que se confirma con la cantidad de marca observada por ensayos de inmunofluorescencia indirecta en parásitos crecidos en condición de bajo hierro, comparados con alto hierro y además se observa un cambio en la localización que es dependiente de la concentración de hierro, ya que el perfil de distribución de la marca de TvCP2 en la membrana aumenta en la condición de alto hierro.



**Figura 19.- Efecto del hierro en la localización de la TvCP2 en parásitos permeabilizados.** En la parte superior se muestra la marca de TvCP2 en parásitos crecidos en condiciones de bajo hierro. En la parte inferior se muestra la marca de TvCP2 crecidos en condiciones de alto hierro. También se muestra el campo claro, los núcleos teñidos con DAPI en azul, la marca de TvCP2 utilizando FITC en verde y el traslape entre la marca de DAPI y FITC el cual muestra la localización citoplásmica de la TvCP2.



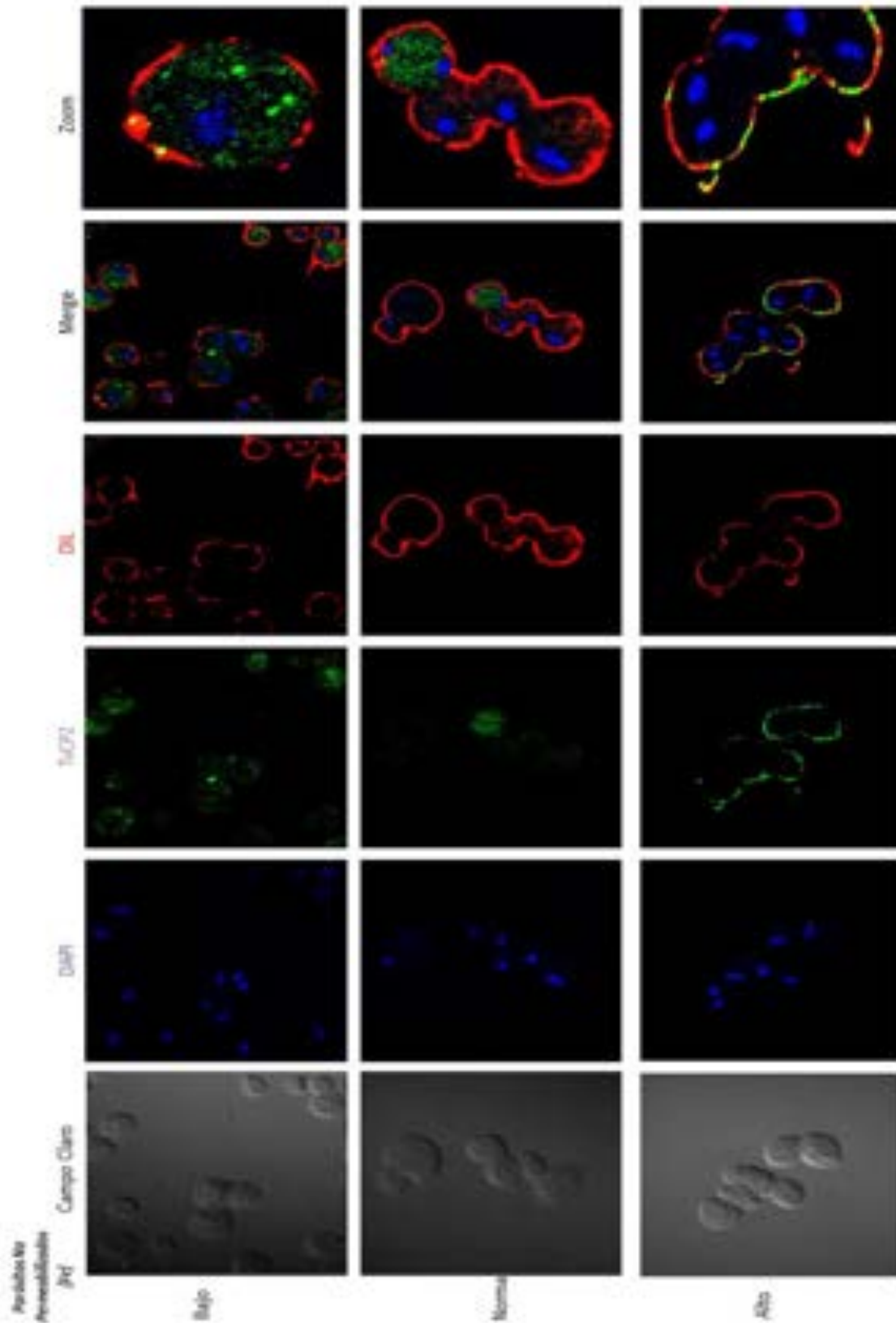






*Figura 20.- Efecto del hierro en la localización de la TvCP2 en parásitos no permeabilizados.* En la parte superior se muestra la marca de TvCP2 en parásitos crecidos en condiciones de bajo hierro. En la parte media se muestra la marca de TvCP2 en parásitos crecidos en condiciones estándar de hierro. En la parte inferior se muestra la marca de TvCP2 en parásitos crecidos en condiciones de alto hierro. También se muestra el campo claro, la marca núcleos teñidos con DAPI en azul, la marca de TvCP2 utilizando FITC verde, la marca de DIL en rojo y el traslape entre la marca de DAPI, FITC y DIL el cual muestra la localización citoplásmica y de membrana de la TvCP2. Al final se muestra un acercamiento en el que se aprecian las zonas de colocalización entre la marca de TvCP2 con la marca de membrana.











23

10

















3

3









































































































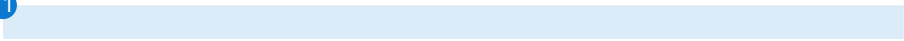








11





3







9

A horizontal green bar is positioned below the number 9, extending across the width of the page.





















































































- Figueroa-Angulo, E. E., Rendón-Gandarilla, F. J., Puente-Rivera, J., Calla-Choque, J. S., Cárdenas-Guerra, R. E., et.al. (2012). The effects of environmental factor son the virulence of *Trichomonas vaginalis*. *Microbes and Infection* 14: 1411-27.
- Figueroa-Angulo, E.E., Calla-Choque J. S., Mancilla-Olea, M.I., Arroyo, R. (2015). RNA-Binding Proteins in *Trichomonas vaginalis*: Atypical Multifunctional Proteins Involved in a Posttranscriptional Iron Regulatory Mechanism. *Biomolecules*, 5: 3354-95.
- Fiori, P. L., Rappelli, P., Addis, M. F., Sechi, A., Cappuccinelli, P. (1996). *Trichomonas vaginalis* haemolysis: pH regulates a contact-independent mechanism based on pore-forming proteins. *Microb. Pathog.* 20; 109e118.
- Fiori, P. L., Rappelli, P., Addis, M.F. (1999). The flagellated parasite *Trichomonas vaginalis*: new insights into cytopathogenicity mechanisms. *Microb Pathog.* 1; 149e156.
- Fiori, P. L., Rappelli, P., Rocchigiani, A. M., Cappuccinelli, P. (1993) *Trichomonas vaginalis* haemolysis: evidence of functional pores formation on red cell membranes, *FEMS Microbiol.* 109; 13e18.
- Hernández-Gutiérrez, R., Ortega-López, J., Arroyo, R. (2003). A 39-kDa cysteine proteinase CP39 from *Trichomonas vaginalis*, which is negatively affected by iron may be involved in trichomonal cytotoxicity. *J Eukaryot Microbiol*; 50 Suppl: 696-8.
- Hernández-Gutiérrez, R., Ávila-González, L., Ortega-López, J., Cruz-Talonia, F., Gómez-Gutiérrez, G., Arroyo, R. (2004). *Trichomonas vaginalis*:



- characterization of a 39-kDa cysteine proteinase found in patient vaginal secretions, *Exp. Parasitol.* 107: 125e135
- Horváthová, L., Šafaříková, L., Basler, M., Hrdý, Campo, N. B., Shin, J-W., Huang, K-Y, Huang, P-J., Lin, R., Tang, P., Tachezy J. (2012). Transcriptomic Identification of Iron-Regulated and Iron-Independent Gene Copies within the Heavily Duplicated *Trichomonas vaginalis* Genome. *Genome Biol Evol.* 4(10): 1017-29.
  - Huang, K-Y., Huang, P-J., Ku, F-M., Lin, R., Alderete, J. F., Tang, P. (2012). Comparative transcriptomic and proteomic analyses of *Trichomonas vaginalis* following adherence to fibronectin. *Infect Immun*; 80(11): 3900-11. doi: 10.1128/IAI.00611-12
  - Huang, K-Y., Margaret-Chen, Y-Y., Fang, Y-K, Cheng, W-H., Cheng, C-C., et.al. (2014). Adaptative responses to glucose restriction enhance cell survival, antioxidant capability, and autophagy of the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. *Biochim et Biophys Acta* 1840: 53-64.
  - Kissinger, P. (2015). Epidemiology and Treatment of Trichomoniasis. *Curr Infect Dis Rep*; 17(6):484. doi: 10.1007/s11908-015-0484-7.
  - Lama, A., Kucknoor, A., Mundondi, V., Alderete, J. F. (2009). Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Is a Surface-Associated, Fibronectin-Binding Protein of *Trichomonas vaginalis*. *Infect and Immun.* 77(7): 2703-11.
  - Lehker M. W., Alderete, J. F. (1992). Iron regulates growth of *Trichomonas vaginalis* and the expression of immunogenic trichomonad proteins. *Molecular Microbiology*, 6(1): 123–32.





- Lord, E., Newnham, T., Dorrell, L., Jesuthasan, G., Clarke, L., Jeffery, K., Sherrard, J. (2016). Detecting asymptomatic *Trichomonas vaginalis* in females using the BD ProbeTec *Trichomonas vaginalis* Qx nucleic acid amplification test. *Int J STD AIDS*. pii: 0956462416649888
- Lubick, K. J., Burgess, D.E. (2004). Purification and analysis of a phospholipase A2-like lytic factor of *Trichomonas vaginalis*. *Infect. Immun.* 72; 1284e1290
- Madico, G., Quinn, T. C., Rompalo, A., McKee, K. T., Gaydos, C. A. (1998). Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection by PCR using vaginal swab samples. *J Clin Microbiol*; 36(11): 3205-10.
- Mallinson, D. J., Lockwood, B. C., Coombs, G. H., North, M. J. (1994). Identification and molecular cloning of four cysteine proteinase genes from the pathogenic protozoon *Trichomonas vaginalis*. *Microbiology*, 140: 2725-35.
- Mendoza-López, M., R. Becerril-García, C., Fattel-Facenda, L., V., Ávila-González, L. et.al. (2000). CP30, a cysteine proteinase involved in *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun.* 68(9): 4907-12.
- Meng, W., Sawasdikosol, S., Burakoff, S.J., Eck, M.J. (1999). Structure of the amino-terminal domain of Cbl complexed to its binding site on ZAP-70 kinase. *Nature* 398:84-90.
- Meza-Cervantez, P., González-Robles, A., Cárdenas-Guerra, R. E., Ortega-López, J., Saavedra, E. et.al. (2011). Pyruvate: ferredoxin oxidoreductase (PFO) is a surface-associated cell-binding protein in *Trichomonas vaginalis*



and is involved in trichomonad adherence to host cells. *Microbiol.* 157(12): 3469:82.

- Moreno-Brito, V., Yáñez-Gómez, C., Meza-Cervantez, P., Ávila-González, L., Rodríguez, M. A., Ortega-López, J., González-Robles, A., Arroyo, R. (2005). A *Trichomonas vaginalis* 120 kDa protein with identity to hydrogenosome pyruvate:ferredoxin oxidoreductase is a surface adhesin induced by iron. *Cell Microbiol*; 7(2): 245-58.
- Nazari, N., Zangeneh, M., Moradi, F., Bozorgomid, A. (2015). Prevalence of Trichomoniasis Among Women in Kermanshah, Iran. *Iran Red Crescent Med J.* 17(3): e23617.
- Puente-Rivera, J., Ramón-Luing, L. de L., 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. *Int J Biochem Cell Biol*; 54: 255-65.
- Ramón-Luing, L. A., Rendón-Gandarilla, F. J., Cárdenas-Guerra, R. E., Rodríguez-Cabrera, N. A., Ortega-López, J. et al. (2010). Immunoproteomics of the active degradome to identify biomarkers for *Trichomonas vaginalis*, *Proteomics.* 10(3): 435–44.
- Ramón-Luing, L. A., 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: 1500-11.



- Rawlings, N., D., Waller, M., Barrett, A., J. and Bateman, A. (2014). MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors, *Nucl Ac Res.* 42: 503–9.
- Rendón-Gandarilla, F. J., Ramón-Luig, L de L., 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 Res Int*; 2013:561979. Doi: 10.1155/2013/561979.
- Rolland, F., Winderickx, J., Thevelein, J.M. (2002). Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Research* 2: 183-201.
- Scott, D. A., North, M. J. Coombs, G. H. (1995). The Pathway of Secretion of Proteinases in *Trichomonas vaginalis*. *Int J Parasitol* 25(6): 657:66.
- Safi-Oz, Z., Dogan-Gun, B., Ozkan-Gun, M., Oguz-Ozdamar, S. (2015). Cytomorphometric and Morphological Analysis in Women with *Trichomonas vaginalis* Infection: Micronucleus Frequency in Exfoliated Cervical Epithelial Cells. *Acta Cytol.* 59(3): 258-64
- Sajid, M., McKerrow J. H. (2002). Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol and Biochem Parasitol*, vol. 120 (1): 1-21.
- Santos Diéguez, I. (2014). Tricomoniasis: una visión amplia. *Iatreia*, 27(2): 198-205.
- Sommer, U., Costello, C. E., Hayes, G. R., Beach, D. H., Gilbert, D. O. et.al. (2005). Identification of *Trichomonas vaginalis* cysteine proteases that induce apoptosis in human vaginal epithelial cells, *J Biol Chem.* 280; 23853e23860



- Solano-González, E., Burrola-Barraza, E., León-Sicalros, C., Ávila-González, L., Gutiérrez-Escolano, L., Ortega-López, J., Arroyo, R. (2007). The trichomonad cysteine proteinase TvCP4 transcript contains an iron-responsive element. *FEBS Lett*; 581(16): 2912-28.
- Songyang, Z., Shoelson, S.E., Chaudhuri, M., Gish, G., Pawson, T., Haser, W.G., King, F., Roberts, T., Ratnofsky, S., Lechleider, R.J. (1993) SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* 72: 767-78
- Sutcliffe, S., Giovanucci, E., Alderete, J. F., Chang, T. H., Gaydos, C. A. et.al. (2006) Plasma antibodies against *Trichomonas vaginalis* and subsequent risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiological Biomarkers Prevention*; 15: 244-58.
- Treitel, M.A, Kuchin, S., Carlson, M. (1998). Snf1 protein kinase regulates phosphorylation of the Mig1 repressor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 18: 6373-80.
- Tovy, A., Hertz, R., Siman-Tov, R., Syan, S., Faust, D., Guillen, N., Ankri, S. (2011). Glucose starvation boosts *Entamoeba histolytica* virulence. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5: e1247.
- Uemura, H., Koshio, M., Inoue, Y., López, M.C., Baker, H.V. (1997) The role of Gcr1p in the transcriptional activation of glycolytic genes in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 147, 521-32.
- Wagner, M. J., Stacey, M. M., Liu, B. A. Pawson, T. (2013). Molecular Mechanisms of SH2- and PTB-Domain-Containing Proteins in Receptor Tyrosine Kinase Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*; 5 (12): a008987. doi: 10.1101/chspect.a008987





**APÉNDICE****Solución de 2-2'-Dipiridilo 15 mM (Sigma)**

Pesar 0.02343 gr de 2-2'-dipiridilo y disolver en 10 ml de agua bidestilada. Esterilizar por filtración por 0.22  $\mu$ m. Almacenar a 4°C protegido de la luz.

**Solución de Ácido sulfosalicílico 50 mM (Sigma)**

Pesar 0.1271 gr de ácido sulfosalicílico y disolver en 10 ml de agua miliQ.

**Solución de Sulfato Ferroso Amoniacal 25 mM (Sigma)**

Pesar 0.09803 gr de sulfato ferroso amoniacal hexahidratado y disolver en 10 ml de ácido sulfosalicílico 50 mM. Esterilizar por autoclave y se almacena a 4°C protegido de la luz.

**Amortiguador Salino de Fosfatos**

NaCl.....8 gr

KCl.....0.2 gr

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....8.52 gr

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....0.27 gr

Ajustar el pH a 7 con HCl concentrado y aforar a 1 L.

**Amortiguador de corrida 10x**

Trizma Base.....30.2 gr

Glicina.....144 gr



SDS.....10 gr

Aforar a 1 L con agua destilada. El pH final queda en 8.3 cuando se hace  
1x.

#### **Amortiguador de transferencia**

Trizma Base.....4.84 gr

Glicina.....22.52 gr

H<sub>2</sub>O destilada.....1600 ml

Metanol.....400 ml

Volumen final 2 L. Almacenar a 4°C protegido de la luz.

#### **Tris-HCl/SDS pH 6.8**

Tris Base.....6.055 gr

SDS.....0.4 gr

Ajustar a pH 6.8 con HCl y posteriormente aforar a 100 ml con agua  
destilada y luego filtrar por 0.45 µm. Almacenar a TA.

#### **Tris-HCl/SDS pH 8.8**

Tris Base.....18.165 gr

SDS.....0.4 gr



Ajustar a pH 8.8 con HCl y posteriormente aforar a 100 ml con agua destilada y luego filtrar por 0.45  $\mu$ m. Almacenar a TA.

#### **Acrilamida 30%**

Acrilamida.....29.2 gr

Bisacrilamida.....0.8 gr

Disolver en 40 ml de agua destilada y una vez disuelto aforar a 100 ml. Almacenar a 4°C protegido de la luz.

#### **Amortiguador TBE 10x**

Tris Base.....108 gr

Ácido Bórico.....27.5 gr

EDTA.....9.3 gr

Aforar a 1 L con agua destilada. Almacenar a TA.

#### **Amortiguador de carga 6x para DNA/RNA**

Adicionar 1 volumen de solución de Azul de Bromofenol: Xilene-Xianol reconstituido y 4 volúmenes de formamida.

Azul de bromo fenol: xilene-xianol.....100  $\mu$ l

Formamida.....400  $\mu$ l

Volumen final.....500  $\mu$ l













21







