



**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
del Instituto Politécnico Nacional**

Unidad Zacatenco

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular

**“Influencia de la glucosa en la citotoxicidad y en la interacción de
Trichomonas vaginalis con laminina y fibronectina mediada por la
enzima triosafosfato isomerasa (TvTIM)”**

TESIS

Que presenta

M. en C. Jesús Francisco Tadeo Miranda Ozuna

Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

en

Infectómica y Patogénesis Molecular

Directora de Tesis

Dra. Rossana Arroyo Verástegui

México, D.F.

Septiembre 2016

ASESORES DE TESIS

- **Dra. Bibiana Chávez Munguia** (DIPM, CINVESTAV-IPN).
 - **Dra. Patricia Talamás Rohana** (DIPM, CINVESTAV-IPN).
 - **Dr. Jaime Ortega Lopez** (DBB, CINVESTAV-IPN).
 - **Dr. Luis Brieba de Castro** (LANGEBIO, CINVESTAV-IPN, Unidad Irapuato)
 - **Dra. Claudia Benítez Cardoza** (Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del IPN)
-

Este trabajo se desarrolló en el laboratorio 11 del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) bajo la dirección de la Dra. Rossana Arroyo Verástegui y con el apoyo de los donativos del CONACYT 153093 y 162123. El alumno agradece al CONACYT por el apoyado de beca otorgado (No. 246628) y por el donativo FINNOVA 237937.

Índice General

	<i>Página</i>
<i>Índice de figuras</i>	V
<i>Índice de tablas</i>	Vi
<i>Glosario de abreviaturas</i>	vii
<i>Abstract</i>	1
<i>Resumen</i>	2
<i>Capítulo I. Introducción</i>	4
1.1 Epidemiología de <i>Trichomonas vaginalis</i>	4
1.2 Manifestaciones clínicas de la tricomoniasis.....	4
1.3 Diagnóstico y tratamiento.....	5
1.4 <i>Trichomonas vaginalis</i>	6
1.5 Características morfológicas.....	7
1.6 Ciclo biológico.....	7
1.7 Metabolismo de carbohidratos en <i>T. vaginalis</i>	9
1.8 Fuentes de glucosa en el tracto urogenital.....	10
1.9 Interacción parásito-hospedero de <i>T. vaginalis</i>	11
1.9.1 Lipofosfoglicano.....	12
1.9.2 Proteínas de membrana.....	12
1.9.3 Proteínas metabólicas multifuncionales.....	12
1.10 Proteínas “moonlighting”.....	13
1.11 La triosafosfato isomerasa (TIM) en la interacción parásito-hospede.....	15
<i>Capítulo II. Antecedentes directos</i>	17

	<i>Página</i>
Capítulo III. Justificación	18
Capítulo IV. Hipótesis	18
Capítulo V. Objetivo general	19
Capítulo VI. Objetivos particulares	19
Capítulo VII. Estrategias experimentales	20
Capítulo VIII. Materiales y métodos	25
8.1 Establecimiento de las condiciones de glucosa <i>in vitro</i>	25
8.2 Cultivo de <i>Trichomonas vaginalis</i>	25
8.3 Cinética de crecimiento.....	26
8.4 Oligonucleótidos.....	26
8.5 Extracción de RNA total.....	27
8.6 Retrotranscripción.....	27
8.7 Amplificación por PCR.....	28
8.8 Obtención de los extractos de proteínas totales (para adhesinas).....	28
8.9 Electrotransferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa.....	29
8.10 Western blot.....	30
8.11 Ensayo de inmunofluorescencia indirecta.....	30
8.12 Inmunomarcaje con oro coloidal.....	31
8.13 Ensayo de ligando-adhesina.....	32
8.14 Ensayo de afinidad a ligando.....	32
8.15 Ensayo de unión Dot-blot.....	33
8.16 Marcaje con “cell tracker blue”.....	34

	<i>Página</i>
8.17 Ensayos de adhesión a Lm y Fn.....	35
8.18 Inhibición de la adhesión a Lm y Fn.....	35
8.19 Ensayo de secreción <i>in vitro</i>	36
8.20 Obtención de las secreciones vaginales.....	37
8.21 Determinación de los niveles de glucosa en SV.....	38
8.22 Búsqueda de TvTIM en secreciones vaginales.....	38
8.23 Inmunofluorescencia indirecta de células VECs.....	39
8.24 Ensayos de citotoxicidad.....	40
8.25 Ensayos de actividad proteolítica.....	41
8.26 Expresión de cisteína proteinasas (CPs).....	41
8.27 Electroforesis en 2-DE.....	42
8.28 Identificación de proteínas por Maldi-Tof-MS.....	43
8.29 Análisis <i>in sillico</i>	43
8.30 Análisis estadístico.....	43
<i>Capítulo IX. Resultados</i>	45
9.1 Niveles de glucosa en secreciones vaginales de mujeres con tricomoniasis	45
9.2 Efecto de la glucosa en el crecimiento de <i>T. vaginalis</i>	49
9.3 Expresión de los genes “ <i>tvtim</i> ”	52
9.4 Expresión de las proteínas TvTIM.....	55
9.5 Localización subcelular de TvTIM en <i>T. vaginalis</i>	58
9.6 Transporte de TvTIM hacia la superficie de <i>T. vaginalis</i>	63
9.7 Análisis <i>in sillico</i> de las proteínas TvTIM.....	66
9.8 Función de TvTIM asociada a la superficie como adhesina.....	70
9.9 Función de TvTIM como receptor de MEC	74
9.10 Adhesión de <i>T. vaginalis</i> a Lm y Fn inmovilizada.....	80
9.11 Inhibición de la adhesión de <i>T. vaginalis</i> a Lm y Fn	80
9.12 Secreción <i>in vitro</i> de las proteínas TvTIM	88

	<i>Página</i>
9.13 Identificación de las proteínas TvTIM en secreciones vaginales de mujeres con Tricomoniasis.....	94
9.14 Localización de las proteínas TvTIM en células epiteliales vaginales (VECs).....	101
9.15 Efecto de la glucosa sobre la citotoxicidad de <i>T. vaginalis</i>	106
9.16 Efecto de la glucosa sobre la cantidad y actividad proteolítica de cisteína proteinasas (CPs) de <i>T. vaginalis</i>	110
9.17 Identificación de CPs en los degradomas en doble dimensión de extractos resistentes a proteasas de <i>T. vaginalis</i> cultivada en diferentes condiciones de glucosa	114
 Capítulo X. Discusión	 120
 Capítulo XI. Conclusión	 130
 Capítulo XII. Perspectivas	 130
 Capítulo XIII. Referencias	 131

Índice de Figuras

		<i>Página</i>
Figura 1	Fenotipos morfológicos de <i>Trichomonas vaginalis</i>	8
Figura 2	Morfología de <i>T. vaginalis</i>	8
Figura 3	Cinética de crecimiento de <i>Trichomonas vaginalis</i> en diferentes concentraciones de glucosa.....	50
Figura 4	Expresión diferencial de los genes <i>tvtim</i> de <i>T. vaginalis</i> en diferentes condiciones de glucosa.....	53
Figura 5	Expresión de las proteínas TvTIM de <i>T. vaginalis</i> en diferentes condiciones de glucosa.....	56
Figura 6	Localización subcelular de las proteínas TvTIM de <i>T. vaginalis</i>	60
Figura 7	TvTIM muestra dos posibles vías no convencionales de tráfico celular hacia la membrana plasmática en parásitos crecidos en AG.....	64
Figura 8	Modificaciones postraduccionales de las proteínas TvTIMs.	67
Figura 9	Las proteínas TvTIM de <i>T. vaginalis</i> no presentan función de adhesinas.....	72
Figura 10	Unión de las proteínas recombinantes TvTIM a componentes de matriz extracelular (MEC).....	76
Figura 11	Unión concentración dependiente de las proteínas recombinantes TvTIM a Lm y Fn.....	78
Figura 12	La glucosa promueve la adhesión de <i>T. vaginalis</i> a Lm y Fn.....	83
Figura 13	Inhibición de la adhesión de <i>T. vaginalis</i> a Lm y Fn.....	85
Figura 14	Ensayos de secreción <i>in vitro</i> de las proteínas TvTIM de <i>T. vaginalis</i>	90
Figura 15	Identificación de las proteínas TvTIM en secreciones vaginales de mujeres con tricomoniasis.....	96
Figura 16	Localización de las proteínas TvTIM de <i>T. vaginalis</i> en células VECs de pacientes con tricomoniasis.....	102
Figura 17	Efecto de la glucosa en la citotoxicidad de <i>T. vaginalis</i> a monocapas de células HeLa.....	107
Figura 18	Efecto de la glucosa en la cantidad y actividad proteolítica de algunas cisteína proteinasas de <i>T. vaginalis</i>	112
Figura 19	Identificación de CPs de <i>T. vaginalis</i> por espectrometría de masas en los degradomas de parásitos crecidos en diferentes concentraciones de glucosa.....	116

Índice de Tablas

	<i>Página</i>
Tabla 1 Niveles de glucosa en secreciones vaginales de mujeres con microbiota normal e infección vaginal.....	47
Tabla 2 Concentrado de los datos generados del análisis <i>in silico</i> de la secuencia de aminoácidos de la TvTIM1 y de la TvTIM2.....	69
Tabla 3 Proteínas identificadas por LC MS/MS, en la región de 27 kDa, a partir de los productos de secreción <i>in vitro</i> de <i>T. vaginalis</i> en condiciones de AG.....	92
Tabla 4 Lista de péptidos obtenidos por LC MS/MS para la proteína TvTIM2 de <i>T. vaginalis</i>	93
Tabla 5 Proteínas identificadas por LC MS/MS en la región de 27 kDa de las secreciones vaginales (SV) de mujeres con tricomoniasis.....	100
Tabla 6 Identificación por LC MS/MS de proteínas en los extractos resistentes a proteasas de parásitos crecidos en AG.....	118
Tabla 7 Identificación por LC MS/MS de proteínas en los extractos resistentes a proteasas de parásitos crecidos en RG.....	119

Glosario de Abreviaturas

2-DE	Electroforesis en doble dimensión
ADN	Ácido desoxirribonucleico
α-Fn	Anticuerpo contra fibronectina
AG	Alta glucosa
α-Ln	Anticuerpo contra laminina
AP	Proteínas de adhesión
α-PIg	Anticuerpo contra plasminógeno
α-ppTvCP4r	Anticuerpo contra la región prepro de la proteína recombinante TvCP4
ATP	Adenosín trifosfato
BM	Amortiguador de muestra
BSA	Albúmina sérica bovina
Caco-2	Línea celular de adenocarcinoma de epitelio colorectal
CBB	Azul Brillante de Coomassie
cDNA	DNA complementario
CPs	Cisteína proteinasas
CTB	“Cell Tracker Blue”
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DEPC	Dietil pirocarbonato
DF-1	Línea celular de fibroblasto de pollo
DHAP	Hidroxiacetona fosfato
DIL-CM	Colorante catiónico lipofílico absorbente
D-MEM	Medio de cultivo “Eagle” modificado por Dulbecco
DOC	Desoxicolato de sodio
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilen-Diamino-Tetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima
ET	Extracto de proteína total
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Fn	Fibronectina
FWB	Far-western blot
GP63	Metaloproteasa de 63 kDa
HeLa	Línea celular de cáncer cervical humano (Henrieta Lacks)
IPG	Gradiente pH
ITS	Infecciones de transmisión sexual
kDa	Kilodaltones
LC MS/MS	Cromatografía líquida/espectrometría de masas/MS
Lm	Laminina

MEC	Matriz extracelular
MET	Microscopía electrónica de transmisión
mM	Milimolar
NC	Nitrocelulosa
NET	Amortiguador Tris-EDTA-NaCl
NG	Concentración normal de glucosa
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Amortiguador de fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PI	Suero preinmune
Plg	Plasminógeno
PS	Producto de secreción
RG	Restricción de glucosa
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Ensayo de retrotranscripción y PCR
SBA	Suero bovino adulto
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
SV	Muestras de secreciones vaginales
TA	Temperatura ambiente
TBE	Amortiguador Tris-borato-EDTA
TCA	Ácido tricloroacético
TDSET	Amortiguador Tris-Cl, DOC, SDS, EDTA, Triton-X100
TLCK	p-Tosil-L-lisil clorometilcetona
TvENO-1	α -enolasa de <i>T. vaginalis</i>
TvGAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa de <i>T. vaginalis</i>
TvHk	Hexoquinasa de <i>T. vaginalis</i>
TvLPG	Lipofosfoglicano de <i>T. vaginalis</i>
TvTIM	Triosafosfato isomerasa de <i>T. vaginalis</i>
<i>tvtim</i>	Gen que codifica para la Triosafosfato isomerasa de <i>T. vaginalis</i>
TYG	Tripton-Extracto de levadura-Glucosa
URF	Unidades relativas de fluorescencia
VEC	Células epiteliales vaginales
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VSP	Proteínas variables de superficie
WB	Western blot
α-TvTIM	Anticuerpo policlonal contra TvTIM-2r de <i>T. vaginalis</i>
β-<i>tub</i>	Gen β - <i>tubulina</i>
μg	Microgramos
μl	Microlitros

μm

Micrometros

Abstract

Triosephosphate isomerase of *Trichomonas vaginalis* (TvTIM) is a 27-kDa cytoplasmic protein encoded by two genes, *tvtim1* and *tvtim2* that participates in glucose metabolism. TvTIM is also localized to the parasite surface. Thus, the goal of this study was to identify the novel functions of the surface-associated TvTIM in *T. vaginalis* and to assess the effect of glucose as an environmental factor that regulates its expression and localization. RT-PCR showed that the *tvtim* genes were differentially expressed in response to glucose concentration. *tvtim1* was over-expressed under glucose-restricted (GR) conditions, whereas *tvtim2* was over-expressed under glucose-rich (HG) conditions. Western blot and indirect immunofluorescence assays also showed that glucose positively affected the amount and surface localization of TvTIM in *T. vaginalis*. Affinity ligand assays demonstrated that the recombinant TvTIM1 and TvTIM2 proteins bound to laminin (Lm) and fibronectin (Fn) but not to plasminogen. Moreover, higher levels of adherence to Lm and Fn were detected in parasites grown under HG conditions than in those grown under GR conditions. Furthermore, pretreatment of trichomonads with an α -TvTIMr polyclonal antibody or pretreatment of Lm- or Fn-coated wells with both recombinant proteins (TvTIM1r and TvTIM2r) specifically reduced the binding of live parasites to Lm and Fn in a concentration-dependent manner. Moreover, *T. vaginalis* was exposed to different glucose concentrations (0.3-36.5 mM) during vaginal infection of women with trichomoniasis. We also investigated the effect of glucose on the virulence of *T. vaginalis*. We found that HG conditions negatively regulated cytotoxicity, proteolytic activity and expression of cysteine proteinases (CPs) that participate in cell damage during infection. TvTIM was *in vitro* secreted, found in vaginal secretions of patients with trichomoniasis and inside the vaginal epithelial cells of these patients. In conclusion, TvTIM is a surface associated protein induced by glucose that functions as a laminin- and fibronectin-binding protein. In addition, glucose negatively regulates the mechanism involved in cell damage by *T. vaginalis*.

Resumen

La triosafosfato isomerasa de *Trichomonas vaginalis* (TvTIM) es una proteína citoplásmica, codificada por dos genes, *vtim1* y *vtim2*, que participan en el metabolismo de la glucosa. TvTIM también se localiza en la superficie del parásito. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue identificar las nuevas funciones de TvTIM asociada a la superficie de *T. vaginalis* y evaluar el efecto de la glucosa como un factor ambiental que regula su expresión y localización y que puede afectar la virulencia del parásito. Ensayos de RT-PCR, mostraron que los genes *vtim* se expresan diferencialmente en respuesta a la concentración de glucosa. El gen *vtim1* se sobreexpresa en restricción de glucosa (RG), mientras que *vtim2* se sobreexpresa en alta glucosa (AG). Ensayos de Western blot e inmunofluorescencia indirecta también mostraron que la glucosa afecta positivamente la cantidad y localización de TvTIM en la superficie de *T. vaginalis*. Ensayos de afinidad a ligando demostraron que las proteínas recombinantes TvTIM1 y TvTIM2 se unen a laminina (Lm) y fibronectina (Fn), pero no a plasminógeno. Por otra parte, se detectaron altos niveles de adhesión a Lm y Fn en parásitos crecidos en AG, comparado con los parásitos crecidos en RG. Además, ensayos de inhibición con parásitos pretratados con el anticuerpo policlonal α -TvTIM o pozos recubiertos con Lm y Fn preincubados con las proteínas recombinantes TvTIM1 y TvTIM2, mostraron reducción concentración dependiente y específica en la unión de parásitos vivos a Lm y Fn. También investigamos los niveles de glucosa *in vivo* en las secreciones vaginales y encontramos que *T. vaginalis* está expuesta a diferentes concentraciones de glucosa (0.3-36.5 mM) durante la infección vaginal de mujeres con tricomoniasis. Finalmente, investigamos el efecto de la glucosa sobre la virulencia de *T. vaginalis* y encontramos que condiciones de AG regulan de manera negativa la citotoxicidad, actividad proteolítica, así como la cantidad y expresión de cisteína proteinasas (CPs) responsables del daño celular durante la infección. En conclusión, TvTIM es una proteína de *T. vaginalis* asociada a su superficie inducida por glucosa, que funciona como una proteína de unión a Lm y Fn;

además, la glucosa regula de manera negativa los mecanismos involucrados en el daño celular por *T. vaginalis*.

Capítulo I

Introducción

1.1 Epidemiología de *Trichomonas vaginalis*.

Trichomonas vaginalis es un protozooario parásito flagelado que infecta el tracto genitourinario humano y es el agente causal de la tricomoniasis, la cual ocupa el primer lugar entre las infecciones de transmisión sexual (ITS) de origen no viral, con una incidencia mundial de ~276.4 millones de casos por año (1). La Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta que la mayor prevalencia de tricomoniasis se encuentra en los países de América (57.8 millones), seguido por los países africanos (42.8 millones) y los países de la región poniente del pacífico (30.1 millones) (WHO, 2012). En México, el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica de la Secretaría de Salud, reportó para el año 2015 una incidencia de tricomoniasis de 54,322 casos, superando a otros patógenos responsables de ITS como *Treponema pallidum* (3,242 casos), *Chlamydia trachomatis* (181 casos) y *Neisseria gonorrhoeae* (1,913 casos).

Actualmente la epidemiología global de la tricomoniasis se encuentra subestimada debido a que un 80% de las infecciones cursan de manera asintomática, sumado a un mal diagnóstico de la enfermedad, debido a que los síntomas clínicos se asemejan a los de otras ITSs. La tricomoniasis es una infección crónica no mortal para el humano; sin embargo, es considerada un problema de salud pública con repercusiones sociales y económicas a nivel mundial (2).

1.2 Manifestaciones clínicas de la Tricomoniasis.

T. vaginalis es un parásito extracelular que coloniza el epitelio del tracto genitourinario (vagina, cérvix, pene, próstata y uretra) para sobrevivir (3). La

infección con *T. vaginalis* está relacionada con el género, afectando principalmente a mujeres con vida sexual activa en las que se reportan desde casos asintomáticos (25-50%) hasta infecciones agudas o crónicas (4). Las mujeres con tricomoniasis pueden presentar un amplio rango de síntomas y complicaciones de salud, entre los que se incluyen: vaginitis, infertilidad y embarazos de alto riesgo por la ruptura prematura de las membranas amnióticas. También se considera un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer cérvico-uterino, además de aumentar la susceptibilidad a la infección y transmisión del virus de inmunodeficiencia humana o VIH (3, 4). En el hombre la prevalencia y el espectro clínico de la tricomoniasis son poco conocidos debido a que ~70% de las infecciones cursan de manera asintomática. Sin embargo, en casos de tricomoniasis aguda, se pueden presentar diversas complicaciones de salud entre las que se incluyen: uretritis, balanopostitis, prostatitis, epididimitis, además de ser considerada un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de próstata e incrementar el riesgo de transmisión del VIH (3, 4).

La baja prevalencia de la infección con *T. vaginalis* en el hombre, puede estar relacionada a diferencias en los microambientes urogenitales. Por ejemplo, la naturaleza oxidativa de los fluidos genitales del hombre sumado a la presencia de Zinc en las secreciones prostáticas actúan como factores citotóxicos para *T. vaginalis*. En contraste, el microambiente reductor de la vagina, además de altas concentraciones de hierro en el flujo menstrual contribuyen a la activación de una variedad de mecanismos patogénicos de *T. vaginalis* (3, 4).

1.3 Diagnóstico y tratamiento.

El diagnóstico oportuno de la tricomoniasis es esencial, ya que permitirá un tratamiento adecuado y facilitará el control de la transmisión de *T. vaginalis*. Actualmente existen varias pruebas útiles para el diagnóstico de la tricomoniasis, entre las que se incluyen, la observación microscópica en fresco para la detección de parásitos vivos y móviles, a partir de muestras obtenidas de secreciones vaginales o cervicales (5, 6). El método de cultivo en caldo (sistema InPouch TV)

es el “estándar de oro” para el diagnóstico de la tricomoniasis ya que es fácil de interpretar y requiere poco inóculo (~300-500 tricomonas/ml) (7). Otras pruebas se basan en la detección rápida de marcadores antigénicos de *T. vaginalis* mediante el uso de anticuerpos (OSOM TV-test, Kalon Tv látex agglutination test). También se han desarrollado pruebas con alta sensibilidad y especificidad que consisten en la amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR y RT-PCR (8, 9).

A la fecha, el tratamiento estándar de la tricomoniasis se basa en el uso de drogas derivadas del 5-nitroimidazol como el metronidazol (α , β -hidroxietil-2-metil-5-nitroimidazol). Esta droga entra a la célula por difusión y se activa en los hidrogenosomas de *T. vaginalis*; una vez dentro el grupo nitro de la droga es reducido por la enzima piruvato ferredoxina oxidorreductasa (PFO) resultando en un radical nitro citotóxico que se une y rompe las cadenas de ADN, provocando la muerte de los parásitos (10). Otros nitroimidazoles como el tinidazol, ornidazol y secnidazol, también son utilizados en la clínica para el tratamiento de la tricomoniasis (3).

1.4 *Trichomonas vaginalis*.

T. vaginalis es un protozoo parásito descubierto en 1836 por Alfred Donné, que según el orden taxonómico se posiciona de acuerdo a la siguiente clasificación:

Reino	Protista
Phylum	Protozoo
Subphylum	Sarcomastigophora
Clase	Zoomastogophorea
Subclase	Zoomastigia
Orden	Trichomonadida
Género	Trichomonas
Especie	<i>Trichomonas vaginalis</i>

Donné, 1836; NCBI taxonomy

1.5 Características morfológicas.

A diferencia de otros protozoarios, *T. vaginalis* presenta únicamente la forma de trofozoíto el cual varía en tamaño con una longitud de 9-23 μm y diámetro de 7-15 μm (11). Las condiciones fisiológicas pueden alterar el fenotipo de los parásitos. Por ejemplo, en cultivos axénicos y secreciones vaginales este protozoario muestra una forma piriforme u ovoide. Sin embargo, adopta una forma amoeboide al entrar en contacto con el epitelio escamoso estratificado, o con monocapas de células epiteliales vaginales (VECs) (Figura 1) (12).

Las tricomonas presentan una morfología compuesta de 4 flagelos libres en la parte anterior y un quinto flagelo adosado a la membrana ondulante. Paralelo a dicha membrana se dispone una cadena de microtúbulos llamada costa, que en conjunto se encargan de generar la movilidad de los parásitos (4). Otras estructuras internas como el axostilo, conformado de cadenas organizadas de microtúbulos que atraviesan en dirección longitudinal el citoplasma y sobresalen por el extremo posterior, funciona como estructura de anclaje a células VECs. Conectada al axostilo se encuentra la pelta, que recubre la estructura basal de los flagelos (Figura 2) (13). En el citoplasma del parásito están contenidos varios organelos, un núcleo localizado en la parte anterior, un retículo endoplasmático rodeando al núcleo, un complejo de Golgi, lisosomas e hidrogenosomas que son los organelos productores de ATP (13).

1.6 Ciclo biológico

T. vaginalis habita exclusivamente en el tracto genitourinario del humano y su ciclo de vida es relativamente sencillo comparado al de otros protozoarios patógenos, ya que se presenta únicamente en la forma de trofozoíto y no tiene hospederos intermediarios ni vectores. Los trofozoítos pueden establecerse en la mucosa vaginal, uretral y prostática, donde se multiplican de manera asexual por fisión binaria longitudinal dando origen a dos células hijas. La transmisión de los

trofozoítos ocurre de persona a persona a través del contacto sexual con personas infectadas (4).

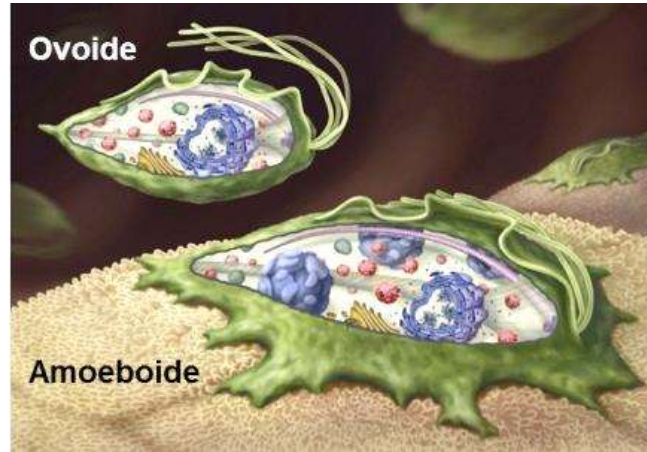


Figura 1. Fenotipos morfológicos de *Trichomonas vaginalis*.

La imagen muestra los dos principales fenotipos ovoide y amoebode de *T. vaginalis*. Después del contacto de los parásitos ovoides con el epitelio urogenital, estos se transforman en amoeboides, incrementando la superficie de contacto con el epitelio del hospedero (obtenida de Gould, 2013).

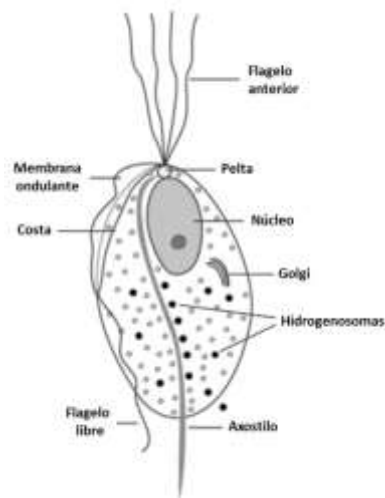


Figura 2. Morfología de *T. vaginalis* (Obtenida y modificada de Harp, 2011).

1.7 Metabolismo de carbohidratos en *T. vaginalis*.

T. vaginalis es un organismo eucarionte primitivo que muestra mucha similitud a bacterias anaerobias. Este parásito depende en gran medida de nutrientes exógenos como el hierro y la glucosa, que son vitales para el crecimiento, la generación de energía y el mantenimiento de una infección crónica. Para *T. vaginalis* los carbohidratos (CHO) son la principal fuente de energía bajo condiciones aerobias y anaerobias (15). Estudios *in vitro* muestran que *T. vaginalis* adapta su metabolismo de carbono a la naturaleza y disponibilidad de la fuente de carbohidratos. Por ejemplo, puede utilizar glucosa, maltosa o glucógeno como fuentes de carbono y energía (16). La maltosa y el glucógeno son hidrolizados a monómeros de glucosa por la actividad enzimática de una α -glucosidasa secretada al medio de crecimiento (17). La glucosa atraviesa la membrana del parásito mediante un transporte de difusión facilitada (18, 19). Una vez dentro del parásito la glucosa es metabolizada en dos compartimentos: el citoplasma y los hidrogenosomas, que son organelos análogos a las mitocondrias, presentes en otros parásitos anaerobios (15). En el citoplasma la glucosa es convertida a fosfoenolpiruvato y subsecuentemente a piruvato por la vía clásica de la glucólisis Embden-Meyerhoff-Parnas y por la actividad de enzimas glucolíticas (20). El piruvato generado a través de la glucólisis es metabolizado por fermentación oxidativa en los hidrogenosomas por la actividad de varias enzimas hidrogenosomales (21). Finalmente, los productos metabólicos incluyen: acetato, lactato, malato, glicerol, CO₂, hidrogeno molecular y ATP (20, 21).

Aunque los CHO son la principal fuente de nutrientes para la generación de energía por *T. vaginalis* en condiciones de restricción de CHO, los aminoácidos se convierten en una fuente alternativa de nutrientes para el crecimiento y sobrevivencia de las tricomonas (22). Estudios *in vitro* han demostrado que el crecimiento de *T. vaginalis* bajo condiciones de restricción de CHO induce el consumo de grandes cantidades de aminoácidos especialmente arginina, treonina y leucina, los cuales son utilizados para la generación de energía (22-24).

1.8 Fuentes de glucosa en el tracto urogenital.

T. vaginalis es un parásito humano obligado que carece de la capacidad para sintetizar un gran número de macromoléculas de *novo*, por lo tanto, depende de su hospedero como fuente de metabolitos y nutrientes esenciales (25). Los nutrientes son adquiridos principalmente a través de los componentes solubles en las secreciones vaginales, sin embargo, los nutrientes son escasos y varían durante la infección (3). Estudios sobre la composición de carbohidratos en los fluidos y secreciones vaginales han reportado que la mayor parte (~90%) de los carbohidratos totales se presentan en forma de oligosacáridos de glucosa posiblemente derivados de la degradación del glucógeno (26-30). Otras formas de carbohidratos como la glucosa, maltosa, maltotriosa y glucosamina conforman el 90% de los monosacáridos libres (29, 30). El glucógeno se ha sugerido como una fuente importantes de glucosa para *T. vaginalis* durante la infección, ya que es uno de los componentes más abundantes en las paredes del epitelio vaginal (27). Estudios *in vitro*, han demostrado que *T. vaginalis* tiene una alta capacidad para degradar glucógeno exógeno y transformarlo en azúcares simples como glucosa o maltosa (25). Los niveles medios de glucosa y glucógeno libre en secreciones vaginales de mujeres sanas han sido reportados en 5 mM (con un rango de 0.2-149 mM) y 1 µg/µl, respectivamente (30, 33).

Además de las secreciones vaginales *T. vaginalis* emplea una combinación de mecanismo para la adquisición de nutrientes como son: la citotoxicidad, fagocitosis, hemólisis y apoptosis de la célula blanco (34). Estos mecanismos son activados por estímulos ambientales (hierro, zinc, poliaminas, entre otros) o tras el contacto celular, desencadenando una cascada de eventos que van a contribuir en la degradación y muerte de la célula blanco (34). *T. vaginalis* tiene una alta capacidad para ingerir y degradar una variedad de células residentes del tracto urogenital, como bacilos de Döderlein, células epiteliales vaginales y cervicales, leucocitos, eritrocitos, espermatozoides, células prostáticas y levaduras (30, 34). Una importante fuente de glucosa y glucógeno para las tricomonas son las células epiteliales vaginales, en las cuales se ha reportado un alto contenido de gránulos de glucógeno que pueden ser adquiridos durante la descamación del epitelio

vaginal ó a través de mecanismo como la citotoxicidad (27). Por otra parte, mediante la hemólisis de eritrocitos las tricomonas obtienen una importante fuente de hierro, lípidos y glucosa, que además se incrementa durante el periodo menstrual (32).

Como se mencionó en el capítulo anterior la glucosa es la principal fuente para la generación de energía en *T. vaginalis*, sin embargo, la disponibilidad de glucosa y otros nutrientes pueden variar durante la infección. Esta idea nos llevó a generar dos de las preguntas que tratamos de contestar en este trabajo ¿Cuáles son los niveles de glucosa en el tracto vaginal de mujeres con tricomoniasis? y ¿Es la glucosa otro factor ambiental que modula la actividad citotóxica y el daño a la células blanco?

1.9 Interacción parásito-hospedero de T. vaginalis.

La interacción parásito-hospedero de *T. vaginalis* es un proceso multifactorial en el que intervienen factores del hospedero (receptores), del parásito (proteínas de superficie y proteinasas) y del microambiente vaginal (pH, temperatura, nutrientes, hierro, hormonas, etc) (34). Para sobrevivir como un parásito extracelular y establecer una infección crónica en la vagina *T. vaginalis* debe atravesar el moco vaginal y adherirse al epitelio vaginal o cervical, para multiplicarse y colonizar el tracto urogenital (4).

T. vaginalis puede adherirse directamente a las células del epitelio o a componentes de matriz extracelular en tracto urogenital. En ambos eventos participan por lo menos tres clases de moléculas de superficie, entre las que se incluyen: **1)** Lipofosfoglicanos (TvLPG-like). **2)** Una colección de proteínas de membrana, recientemente identificadas a través de la genómica y proteómica. **3)** Un grupo controversial de proteínas metabólicas asociadas a la superficie del parásito con funciones alternativas en la citoadherencia (35).

1.9.1. Lipofosfoglicano (TvLPG-like)

El TvLPG-like, es un glicoconjugado constituido principalmente de galactosa y N-acetilglucosamina que recubre la superficie de *T. vaginalis* y que participa en la interacción parásito-hospedero. TvLPG-like se une de manera específica a su receptor Galectina-1, expresado en la superficie de células epiteliales cervicales humanas (36, 37).

1.9.2. Proteínas de membrana

Con la reciente búsqueda de proteínas de superficie en el genoma de *T. vaginalis* (38), por comparación de secuencias con proteínas de superficie implicadas en la patogénesis de otros organismos, se han identificado al menos 4 familias de proteínas de superficie con posible participación en la interacción parásito-hospedero. **1)** Metaloproteasas (GP63). **2)** Cisteína proteinasas (CPs). Ambas responsables de la citotoxicidad de *T. vaginalis*, un mecanismo importante para la interacción parásito-hospedero. **3)** Familia TvBspA-like, implicada en la regulación de la respuesta inmune. **4)** Familia VSP-like, implicada en la adhesión a la célula blanco (34, 39).

1.9.3 Proteínas metabólicas multifuncionales

A la fecha se han identificado al menos 5 proteínas de adhesión (AP), nombradas en base a sus masas moleculares como AP120, AP65, AP51, AP33 y AP23. Estas son las moléculas de adhesión más controversiales debido a varias razones: **1)** A excepción de AP23, las demás muestran una alta homología con enzimas metabólicas (Piruvato ferredoxina oxidoreductasa/AP120, enzima málica/AP65, succinil-coenzima A sintetasa (sub. β)/AP51, succinil-coenzima A sintetasa (sub. α)/AP33). **2)** Estas enzimas originalmente están involucradas en el metabolismo de carbohidratos. **3)** Se localizan en los hidrogenosomas de *T. vaginalis* donde realizan su función metabólica. Sin embargo, muestran una segunda localización en la superficie del parásito, donde exhiben nuevas

funciones alternativas no enzimáticas como adhesinas que se unen a receptores en la superficie de la célula blanco (40, 41) en presencia de altas concentraciones de hierro y al contacto con la célula blanco (42).

Otras enzimas citoplasmáticas de *T. vaginalis*, tales como, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (TvGAPDH) y alfa-enolasa (TvENO-1), son proteínas implicadas en el metabolismo de la glucosa. Sin embargo, también se localizan en la superficie del parásito donde adquieren nuevas funciones mediando la unión de *T. vaginalis* a componentes de matriz extracelular (MEC), como laminina (Lm) y fibronectina (Fn) en el caso de TvGAPDH, o a plasminógeno (Plg) en el caso de TvENO-1 (43, 44).

Estos datos sugieren la importante participación de proteínas metabólicas en la interacción parásito-hospedero de *T. vaginalis*. Sin embargo, a la fecha no se han identificado las vías de transporte de estas proteínas desde los hidrogenosomas o citoplasma, hacia la superficie del parásito. Tampoco se conocen los mecanismos a través de los cuales se anclan a la superficie del parásito, ya que no poseen dominios transmembranales, ni secuencia señal de exporte. Según la clasificación propuesta por Constance J. Jeffery (2014), estas proteínas entran en la categoría de proteínas “moonlighting” (45, 46).

1.10 Proteínas “moonlighting”

Las proteínas “moonlighting” o multifuncionales son, como su nombre lo indica, una clase de proteínas que realizan dos o más funciones, no relacionadas, a partir de una única cadena polipeptídica. La segunda función no implica en ningún caso la pérdida de la función canónica y suele ser fisiológicamente relevante para la célula (46). A la fecha, cerca de 200 proteínas han sido experimentalmente identificadas como proteínas moonlighting, estas se han incluido en la base de datos MoonProt (<http://www.moonlightingproteins.org>) (47). Las proteínas moonlighting se han encontrado expresadas en muchos tipos de células, incluidas, células de mamífero, hongos, parásitos, bacterias, plantas, virus y arqueas (48).

La aparición de funciones moonlighting suele estar asociada a los siguientes mecanismos:

- **Localización celular:** La proteína puede cambiar su localización entre los diferentes compartimentos celulares, tales como, núcleo, citoplasma, vesículas, membrana celular, etc. También puede adquirir una localización extracelular, mediante su secreción (45).
- **Oligomerización:** La proteína puede sufrir cambios en su estado de oligomerización, alterando su función. Por ejemplo, la proteína gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), realiza su función canónica como enzima glucolítica citoplasmática, bajo una conformación de tetrámero, sin embargo, como un monómero, se localiza en el núcleo y exhibe una segunda función como uracil-DNA glicosilasa (45, 49).
- **Expresión diferencial:** Una misma proteína puede realizar dos funciones diferentes cuando se expresa en diferentes tipos de células (45).
- **Cambios en estructura:** Pequeños cambios o diferencias en las estructuras covalentes de proteínas puede resultar en diferentes funciones. Por ejemplo, proteínas que cambian su función después de someterse a modificaciones postraduccionales, o proteínas donde la mutación de un único aminoácido resulta en la aparición de una nueva función (50).
- **Factores ambientales:** La función de una proteína puede ser activada por la cantidad de sustrato, ligando o cofactor disponible. Por ejemplo, la proteína PutA (flavin deshidrogenasa), es una proteína bifuncional, que en concentraciones altas de sustrato (prolina) se une a la membrana para realizar su función canónica, sin embargo, en condiciones de restricción de prolina es una proteína de unión a ADN, funcionando como un represor transcripcional (45, 51).
- **Sitios de unión:** Una proteína puede realizar distintas funciones utilizando diferentes sitios de unión. Por ejemplo, el receptor de aspartato (Tar) de *E. coli* media la respuesta quimiotáctica a una variedad de moléculas, por medio de

sitios específicos de unión a ligando, sin embargo, también es una proteína que funciona como receptor de maltosa (45, 52, 53).

Según Jeffery el término “moonlighting” estaría restringido a proteínas multifuncionales en que la segunda función no proviene de la fusión de genes, splicing alternativo, múltiples fragmentos proteolíticos con diferentes funciones, o actividades enzimáticas promiscuas (45, 46).

Un grupo particular de proteínas “moonlighting” incluye a enzimas intracelulares que realizan una segunda función bioquímica diferente sobre la superficie celular. Estas enzimas se encuentran con frecuencia en la superficie celular durante experimentos proteómicos y ensayos de localización subcelular. Un ejemplo clásico de proteínas moonlighting son las enzimas metabólicas, localizadas sobre la superficie de patógenos como bacterias, protozoarios y hongos, donde tienen un papel clave durante la infección y la virulencia (54, 55). Algunas de las funciones reportadas para estas proteínas incluyen la colonización de los tejidos del hospedero al unirse a proteínas de matriz extracelular, o directamente a la célula blanco (56).

1.11 La triosafosfato isomerasa (TIM) en la interacción Parásito-Hospedero.

La triosafosfato isomerasa (TIM) es una enzima glucolítica citoplásmica que cataliza la isomerización entre hidroxiacetona fosfato (DHAP) y gliceraldehído-3-fosfato (G3P) desempeñando un rol esencial en la vía de la glucólisis (Embden-Meyerhof-Parnas), gluconeogénesis y pentosa fosfato (57). Además de su función metabólica, a la TIM se le ha descrito como una proteína “moonlighting” cuando se localiza en la superficie de microorganismos patógenos. Por ejemplo, la TIM funciona como una proteína de unión a Lm y Fn, durante la fase infectiva de *Paracoccidioides brasiliensis*; mientras que en *Staphylococcus aureus*, media la unión de la bacteria con Plg (58, 59). Funciones similares de adhesina se han identificado para la TIM localizada en la superficie de *Lactobacillus plantarum* y *Mycoplasma gallisepticum*, mediando la adhesión a células Caco-2 y células DF-1,

respectivamente (60, 61). En el hongo *Candida albicans*, la TIM de superficie media la unión a componentes del plasma humano y también participa junto con otras proteínas de superficie, confiriendo protección contra estrés oxidativo (62, 63). Estudios proteómicos también han identificado a la proteína TIM en la superficie de *Entamoeba histolytica*; sin embargo, aún no ha sido descrita su función en este patógeno (64). Por otra parte, TIM exhibe funciones extracelulares en parásitos helmintos. Por ejemplo, en *Brugia malayi* y *Schistosoma mansoni* TIM es una de las proteínas más abundantes en los productos de secreción y funciona como blanco de anticuerpos durante la infección, además de ser considerada como un blanco potencial terapéutico y/o para el desarrollo de vacunas (65-67).

La proteína TIM también puede adquirir diversidad funcional como resultado de la duplicación de genes. En la mayoría de los organismos TIM es codificada por un gen único; sin embargo, en plantas es codificada por dos genes “*tim*” que son diferencialmente expresados en el citosol y los cloroplastos (68). De manera similar, la TIM es codificada por genes duplicados en la bacteria *Sinorhizobium meliloti*, donde uno de ellos está involucrado en el catabolismo del eritritol y el otro participa en la gluconeogénesis (69). Estos datos sugieren que la proteína TIM es una proteína “moonlighting” y un factor de virulencia en microorganismos patógenos.

Capítulo II

Antecedentes directos

Como parte de la colaboración con nuestro laboratorio, Figueroa-Angulo y col., en el 2012 identifican que la enzima triosafosfato isomerasa de *T. vaginalis* (TvTIM) es codificada por dos genes *tvtim* (*tvtimi1* y *tvtim2*) que se traducen en dos proteínas funcionales de 27 kDa (TvTIM1 y TvTIM2). Ambas proteínas TvTIM fueron caracterizadas como proteínas recombinantes, se cristalizaron y se obtuvieron sus estructuras cristalinas (70, 71). Entre las evidencias que sugerían que TvTIM podría tener funciones “moonlighting” en *T. vaginalis*, se encontraban los análisis de su estabilidad estructural. Por ejemplo, ambas son proteínas diméricas de 254 aminoácidos en longitud; sin embargo, difieren únicamente en 4 aa, que afectan significativamente su estabilidad estructural, observando que el dímero TvTIM1r es más estable y poco dissociable comparado con el dímero TvTIM2r, que es fácilmente dissociable, sugiriendo que estos cambios podrían estar afectando directamente la función de la proteína (71). Además, por ensayos de inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo anti-TvTIM2r se mostró que las TvTIMs exhibían doble localización celular (en el citoplasma y en la superficie de *T. vaginalis*) en condiciones regulares de crecimiento, sugiriendo que estas proteínas podrían tener nuevas funciones alternativas cuando se localizan en la superficie de los parásitos (71). Adicionalmente, análisis transcriptómicos recientes reportaron un incremento significativo en la expresión del gen *tvtim2* en parásitos amoeboides adheridos a fibronectina (72), en parásitos adheridos a células VECs (14), así como en parásitos crecidos en alta glucosa (AG) (73), comparado con el gen *tvtim1*, sugiriendo que los genes *tvtim* de *T. vaginalis* se expresan de manera diferencial, lo cual podría estar relacionado a funciones alternativas. Conjuntando estas evidencias surgió el interés para la realización de trabajo que se enfocó en estudiar la posible participación de TvTIM como otra proteína “moonlighting” en *T. vaginalis*.

Capítulo III

Justificación

La glucosa es la principal fuente de energía para *Trichomonas vaginalis*; sin embargo, los niveles de glucosa en el tracto urogenital durante la infección y su contribución en la biología del parásito aún no se han documentado completamente. Por otra parte, varias enzimas glucolíticas se han reportado como proteínas “multifuncionales” con funciones de adhesinas o como receptores de matriz extracelular en la superficie de *T. vaginalis*. Estas nuevas funciones se han asociado a eventos de duplicación de genes, sumado a cambios en la localización celular de estas proteínas y regulados por factores ambientales como el hierro y la glucosa.

Con la reciente caracterización de dos enzimas triosafosfato isomerasa de *T. vaginalis* (TvTIM) codificadas por genes duplicados, con diferentes niveles de expresión que codifican para dos proteínas con diferente estabilidad estructural y que además presentan una doble localización en el citoplasma y en la superficie del parásito; nos surgió el interés de identificar las funciones alternativas para la TvTIM de superficie y caracterizarla como un nuevo factor de virulencia de *T. vaginalis* modulada por glucosa.

Capítulo IV

Hipótesis

La glucosa es otro factor ambiental que modula la virulencia de *Trichomonas vaginalis* así como la relocalización de las proteínas TvTIM hacia la superficie de los parásitos durante la interacción parásito-hospedero donde presentan una nueva función como receptor de matriz extracelular.

Capítulo V

Objetivo general

Demostrar el efecto de la glucosa en la citotoxicidad y en la interacción de *Trichomonas vaginalis* con laminina y fibronectina mediada por la enzima triosafosfato isomerasa (TvTIM).

Capítulo VI

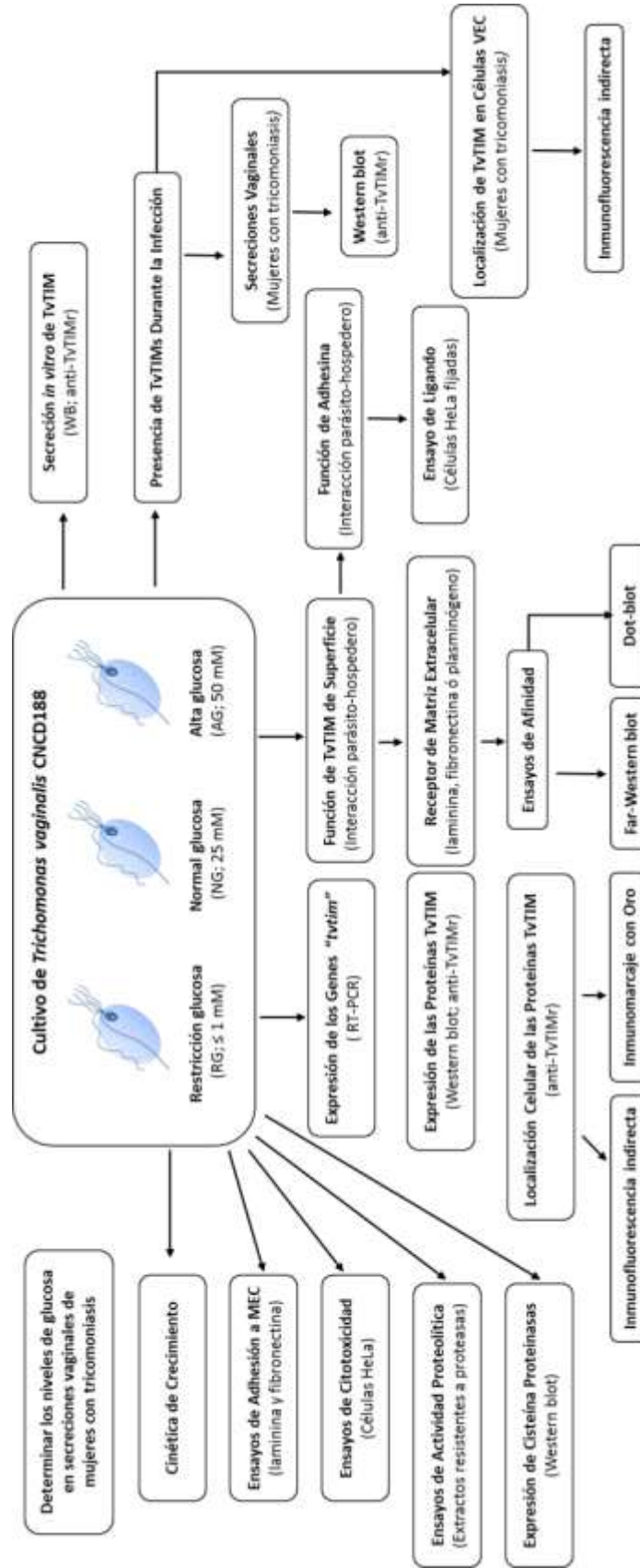
Objetivos particulares

- 1) Determinar el papel de la glucosa como un factor ambiental que modula el crecimiento, la adhesión y la citotoxicidad de *T. vaginalis*.
- 2) Evaluar el efecto de la glucosa sobre la expresión y la localización de las proteínas TvTIM a la superficie de *T. vaginalis*.
- 3) Buscar las posibles vías de transporte por las cuales TvTIM llega a la superficie del parásito.
- 4) Demostrar la función alternativa de las proteínas TvTIM de superficie en la interacción parásito-hospedero de *T. vaginalis*.
- 5) Determinar la presencia de las proteínas TvTIM durante la infección por *T. vaginalis*.

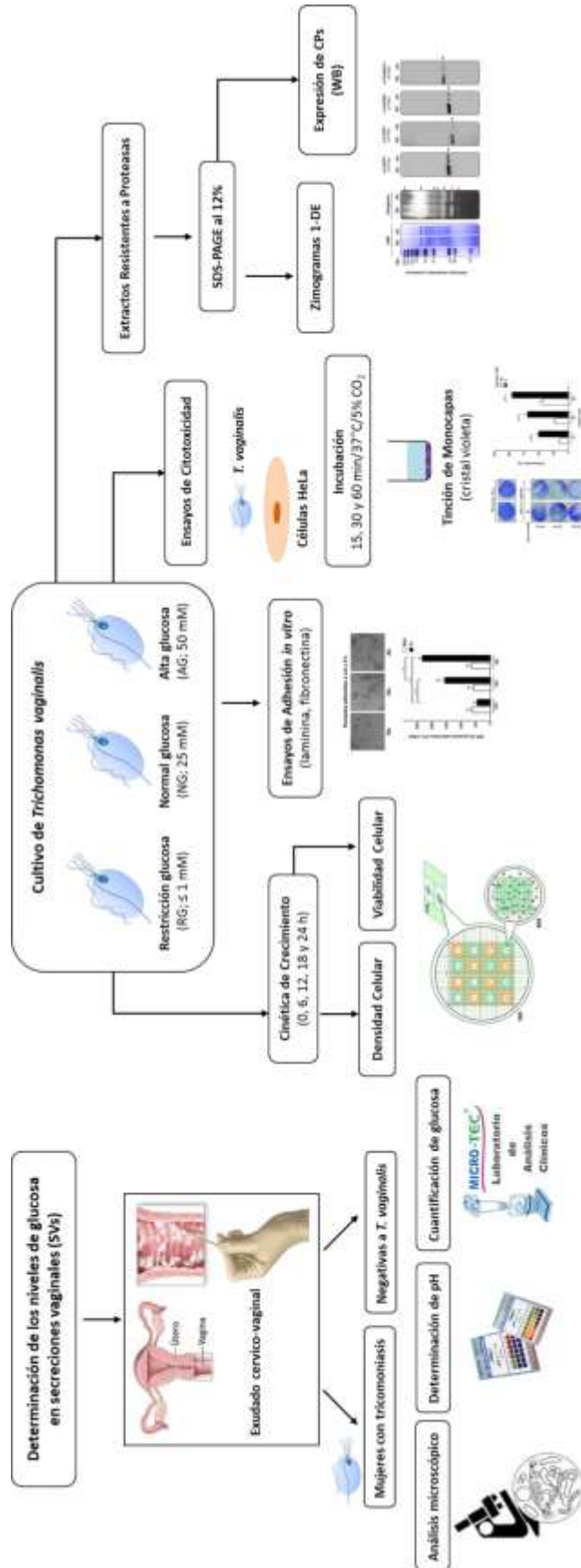
Capítulo VII

Estrategias Experimentales

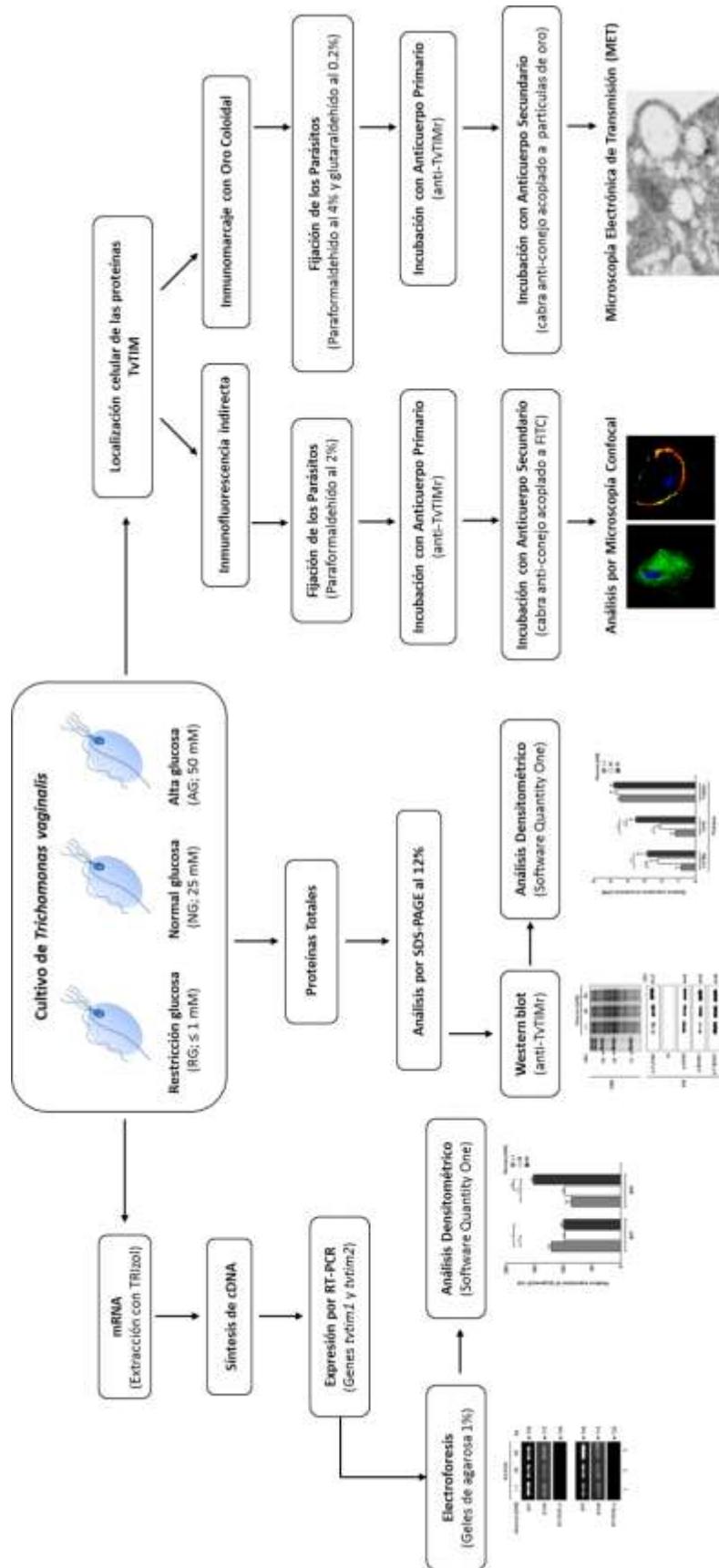
Estrategia General.



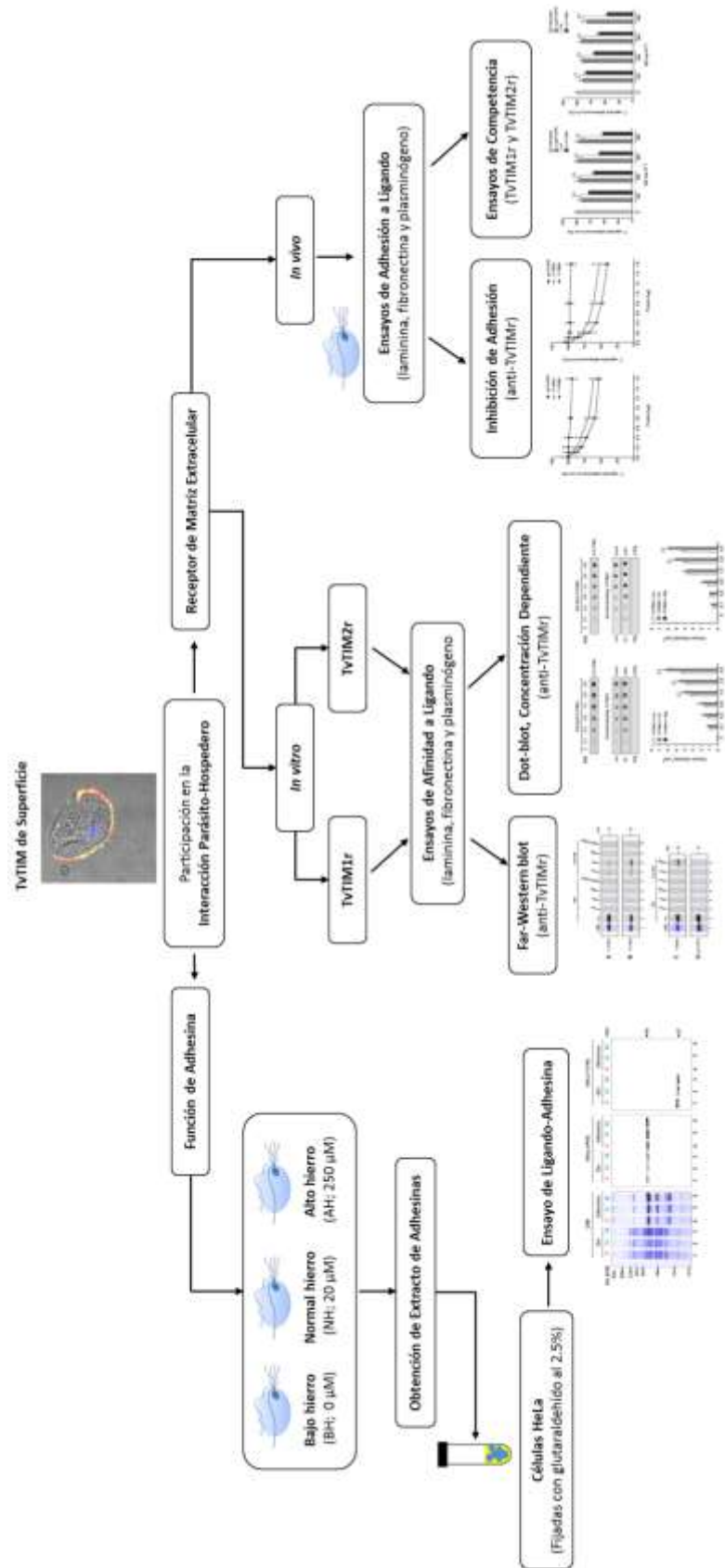
Objetivo 1.- Determinar el papel de la glucosa como un factor ambiental que modula el crecimiento, la adhesión y la citotoxicidad de *T. vaginalis*.



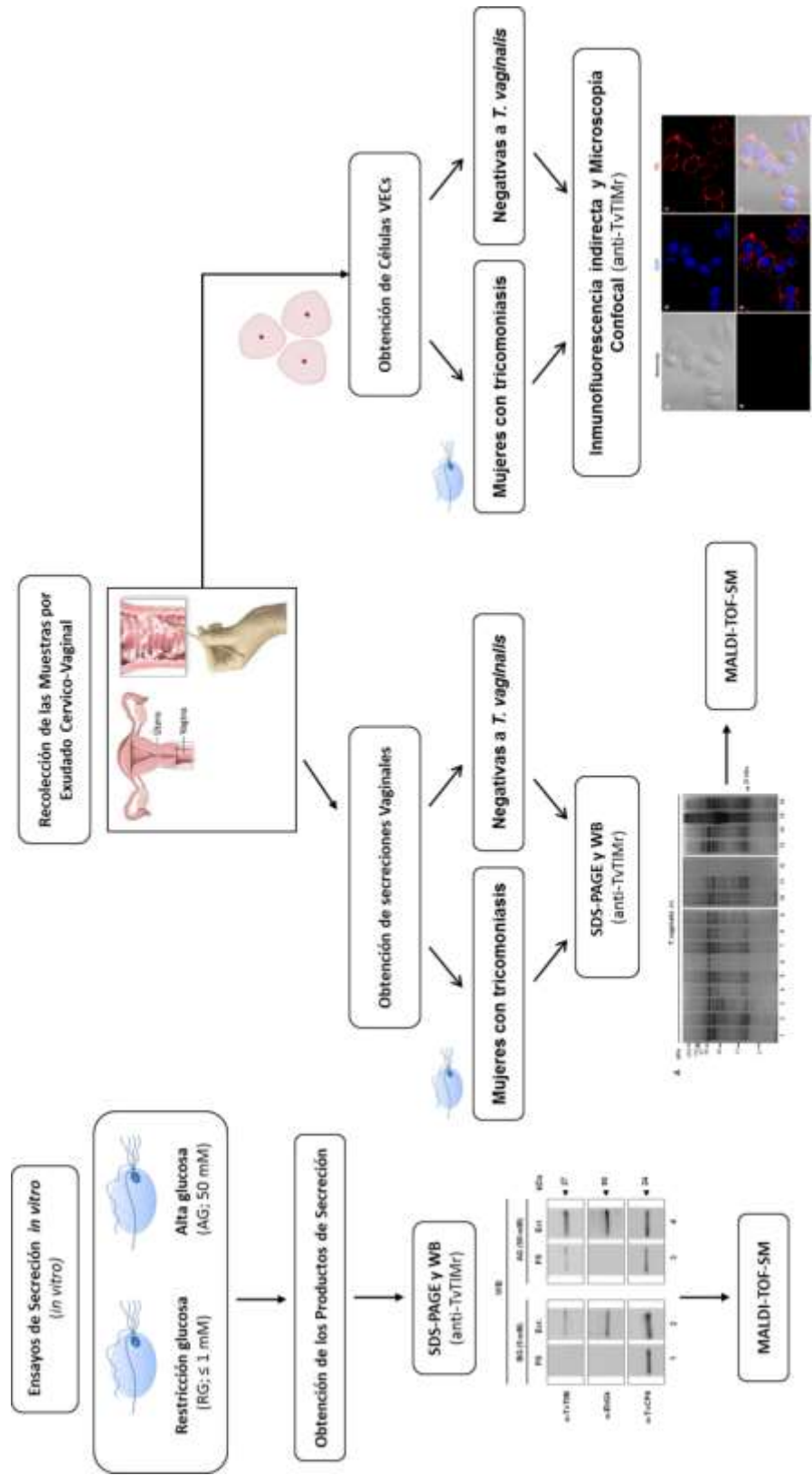
Objetivo 2.- Evaluar el efecto de la glucosa en la expresión y localización de las proteínas TvTIM a la superficie de *T. vaginalis*. **Objetivo 3.-** Buscar las posibles vías de transporte por las cuales TvTIM llega a la superficie del parásito.



Objetivo 4.- Demostrar la función alternativa de las proteínas TvTIM de superficie en la interacción parásito-hospedero de *T. vaginalis*.



Objetivo 5.- Determinar la presencia de las proteínas TvTIM durante la infección por *T. vaginalis*.



Capítulo VIII

Materiales y métodos

8.1 Establecimiento de las condiciones de glucosa in vitro.

Para determinar los niveles normales de glucosa a los que *T. vaginalis* está expuesta durante su crecimiento *in vitro*; se cuantificó la glucosa libre presente en el medio de cultivo TY (Tryptona-Extracto de levadura), suplementado con 10% de suero bovino adulto (SBA). Este medio de cultivo (TY-SBA) se utilizó como medio base para el crecimiento de *T. vaginalis* en todos los experimentos. La glucosa se determinó por el método automatizado glucosa-hexoquinasa, en el laboratorio de diagnóstico clínico MICRO-TEC (Ciudad de México, México).

En este proyecto se estandarizó el crecimiento de *T. vaginalis* bajo tres condiciones de glucosa: (1) Restricción de glucosa (RG, ≤ 1 mM); (2) Glucosa normal (NG, 25 mM); (3) Alta glucosa (AG, 50 mM). Las condiciones de RG y AG, se incluyeron en base a previos reportes por Huang KY y col. 2014 (73). La condición de NG, se calculó en base a la maltosa (13 mM) contenida en el medio estándar TYM-SBA, tomando en cuenta que una molécula de maltosa son dos moléculas de glucosa. Para la condición de RG, se utilizó medio TY-SBA, sin glucosa suplementada, y en el que solo ≤ 1 mM de glucosa está presente, derivada de los componentes del medio. Para la condición de AG, se utilizó medio TY-SBA, suplementado con 50 mM de glucosa. Los niveles de glucosa en cada condición de crecimiento se verificaron por el método glucosa-hexoquinasa (MICRO-TEC).

8.2 Cultivo de Trichomonas vaginalis.

En este estudio se trabajó con el aislado clínico CNCD188 de *T. vaginalis* (74). Para normalizar el crecimiento, los parásitos en fase logarítmica se mantuvieron en cultivo durante 3 días, mediante pase diario en medio TYG-SBA-NG. Posteriormente, los parásitos se cosecharon y se lavaron tres veces con PBS

pH 7, frío y enseguida se transfirieron a medio TYG-SBA, en las tres condiciones de glucosa RG, NG o AG y se incubaron durante 20 h a 37°C, para los diferentes experimentos.

8.3 Cinética de crecimiento.

Para evaluar el efecto de la glucosa sobre el crecimiento de *T. vaginalis* se realizaron cinéticas de crecimiento de parásitos (2×10^5 parásitos/ml) en las condiciones de RG, NG y AG. Los cultivos se incubaron a 37°C y la densidad celular se determinó en intervalos de 6 h durante 24 h de crecimiento utilizando el método de conteo celular en hematocitómetro. Como un control normal de crecimiento, los parásitos se cultivaron en medio regular TYM-SBA, suplementado con maltosa (13 mM). La viabilidad celular fue monitoreada en cada punto de la cinética utilizando el método de exclusión con el colorante azul de tripano (75).

8.4 Oligonucleótidos.

Para determinar los niveles de expresión de los genes *vtim*, se utilizaron oligonucleótidos específicos para *vtim1* y *vtim2*, previamente diseñados en el laboratorio por Figueroa-Angulo y col. en el 2012 (70) utilizando las secuencias reportadas en TrichDB para *vtim1* (TVAG_497370) y *vtim2* (TVAG_096350). Para la amplificación por PCR y RT-PCR del gen *vtim1* se utilizaron los oligonucleótidos: sentido 5'-ACATTCTTTGTCGGAGGC-3' y anti-sentido 5'-AATGTTGATGAAACCTGG-3'. Para la amplificación de *vtim2* se utilizaron los oligonucleótidos: sentido 5'-ACATTCTTCGTCGGTGGT-3' y anti-sentido 5'-AATGTTGATGAAGCCTGG-3'. Para ambos, *vtim1* y *vtim2* el producto amplificado fue de 726 pb.

8.5 Extracción del RNA total.

El RNA total de *T. vaginalis* se obtuvo a partir de parásitos (2×10^7) cultivados en las condiciones de RG, NG y AG, utilizando el método estándar de TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Las pastillas de parásitos se obtuvieron por centrifugación, se resuspendieron en 1 ml de TRIzol y se incubaron 5 min a temperatura ambiente (TA). Enseguida, se le adicionaron 200 μ l de cloroformo, los tubos se mezclaron por inversión, se incubaron por 3 min a TA, se centrifugaron a $12,000 \times g$ por 15 min a 4°C , el sobrenadante se recuperó en un tubo Eppendorf nuevo de 1.5 ml, se le adicionó 500 μ l de isopropanol, se incubó por 10 min a TA y se centrifugó a $12,000 \times g$ durante 10 min. Las pastillas se lavaron con 1 ml de etanol al 75% en agua DEPC, se mezclaron por inversión y se centrifugaron a $7,500 \times g$ durante 5 min. Las pastillas se secaron en campana para eliminar los residuos de etanol y el RNA total se re-suspendió en 50 μ l de agua DEPC estéril. El RNA total (5 μ g) se trató con 3 U de DNasa I (Roche) en amortiguador $10\times$ y agua DEPC, en un volumen final de reacción de 40 μ l, se incubó 40 min a 37°C , se agregaron 2 μ l de EDTA (25 mM) y se incubó a 65°C durante 10 min para inactivar a la DNasa I. El RNA se llevó a un volumen de 100 μ l con agua DEPC estéril y se precipitó con acetato de sodio 3 M (volumen 1/10) y 2.5 volúmenes de etanol absoluto toda la noche a -70°C , se centrifugó a $12,000 \times g$ durante 15 min a TA y la pastilla con el RNA total se resuspendió en 5 μ l de agua DEPC.

8.6 Retrotranscripción.

Para la síntesis de cDNA se utilizó el kit “RevertAid First Strand cDNA Synthesis” (Thermo Scientific). A 5 μ g de RNA total tratado con DNasa I, se adicionaron 6 μ l de agua DEPC estéril, 1 μ l de oligo dT y se desnaturalizó a 70°C durante 5 min. Los tubos se colocaron en hielo a 4°C y se adicionaron 4 μ l de amortiguador RT $5\times$, 1 μ l (20 U/ μ l) de inhibidor de RNasa “RiboLock”, 2 μ l de dNTPs mix (10 mM), 1 μ l (200 U/ μ l) de la enzima retrotranscriptasa “Revert Aid M-Mulv Reverse” y se incubaron durante 60 min a 42°C . La reacción se terminó

calentando a 70°C durante 5 min y la concentración de cDNA se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 UV-Vis (Thermo Scientific).

8.7 Amplificación por PCR.

Las reacciones de PCR se prepararon en tubos estériles con los siguientes reactivos: 5 µl del amortiguador para PCR (10×), 3 µl de MgCl₂ (25 mM), 1 µl de dNTP's mix (10 mM), 1 µl (1 µg/µl) de cada oligonucleótido sentido y anti-sentido, 5 µl de cDNA (500 ng) y 0.4 µl de enzima Taq polimerasa (Invitrogen 7.5 µg/µl); la reacción se llevó a un volumen final de 50 µl con agua de ampollita. Como control positivo de PCR, se incluyó un tubo de reacción utilizando DNA genómico como molde. Para el control negativo, se incluyó un tubo de reacción utilizando RNA tratado con DNasa I. Como control interno de cantidad, se amplificó un fragmento de 112 pb del gen *β-tubulina* (*β-tub*) utilizando los oligonucleótidos, sentido BTUB9 5'-CATTGATAACGAAGCTCTTTACGAT-3' y anti-sentido BTUB2 5'-GCATGTTGTGCCGGACATAACCAT-3' (70). Las condiciones de PCR utilizadas para amplificar los genes *tvim1*, *tvim2* y *β-tub* fueron las siguientes: 1 ciclo a 94°C por 2 min, 25 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 55°C por 1 min y extensión a 72°C por 1 min; como extensión final se incluyó 1 ciclo a 72°C por 7 min. Para visualizar los productos de amplificación se corrieron en geles de agarosa al 1%, a 80 volts durante 20 min y se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 µg/µl) en amortiguador TBE 1×. Las imágenes se capturaron con el ChemiDoc XRS (Bio-Rad) y se analizaron con el "software Quantity One" (Bio-Rad).

8.8 Obtención de los extractos de proteínas totales (para adhesinas).

Los extractos de proteínas totales de *T. vaginalis* se obtuvieron en presencia de inhibidores de proteasas de acuerdo a lo previamente descrito por Arroyo y col. 1992; Moreno-Brito y col., 2005 (40, 41). De manera breve y con pequeñas modificaciones, parásitos (2×10^7) cultivados en RG, NG y AG durante

20 h a 37°C, se resuspendieron en 500 µl de amortiguador NET (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM y EDTA 5 mM), pH 7.4, en presencia de los inhibidores de proteasas TLCK (1 mM) y leupeptin (0.2 mM), se mezclaron y se incubaron por 10 min a 4°C. Enseguida se lisaron los parásitos con deoxicolato de sodio (0.5%) adicionando TLCK (1 mM) y leupeptin (0.2 mM) e incubando 20 min a 4°C. Después, se adicionó amortiguador TDSET (Tris-Cl 10 mM, pH 7.8, DOC 0.2%, SDS 0.1%, EDTA 10 mM y Triton-X100 al 1%) hasta completar un volumen final de 1 ml. A continuación se colocó un colchón de sacarosa al 10% (100 µl) con indicador rojo de fenol en el fondo del tubo y se centrifugó a 12,000 × g por 30 min a 4°C. Después se recuperó el sobrenadante con las proteínas totales solubles y se cuantificó la concentración de proteína a 280 nm en un NanoDrop 2000 UV-Vis. Los extractos de proteínas se analizaron por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12% y luego se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (NC) de 0.22 µm (Bio-Rad) para su análisis por ensayos de Western blot (WB) con diferentes anticuerpos. Para visualizar el patrón de proteínas un gel duplicado se tiñó con azul brillante de Coomassie al 0.05%.

8.9 Electrotransferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa.

El sándwich para la transferencia de proteínas se preparó en el siguiente orden: lado oscuro de la unidad de transferencia, esponja, papel filtro Whatman No. 3, gel de poliacrilamida con proteínas separadas por SDS-PAGE, membrana de NC de 0.22 µm (Bio-Rad), papel filtro Whatman No. 3, esponja y lado transparente de la unidad de transferencia. Enseguida, el sándwich se colocó en cámara húmeda (Bio-Rad) sumergido en amortiguador de transferencia. La transferencia se realizó en frío con agitación suave, durante 20 min a 30 volts para las proteínas de bajo peso molecular y por 1 h a 100 volts para las proteínas de alto peso. La transferencia de las proteínas se verificó tiñendo las membranas con rojo de Ponceau al 100% y los patrones de proteínas se capturaron en el fotodocumentador y se destiñeron con PBS pH 7. Las membranas se bloquearon con leche al 10% en PBS-Tween 20 al 0.1% (PBS-T20) durante toda la noche con

agitación suave a 4°C, se lavaron cinco veces con PBS-T20 en agitación durante 5 min (por lavado) a TA y se incubaron con los anticuerpos correspondientes para los ensayos de WB.

8.10 Western blot.

Para los ensayos de WB, las membranas transferidas y previamente bloqueadas con leche al 10% se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en PBS-T20, con leche al 5%, durante 18 h a 4°C. Las membranas se lavaron cinco veces con PBS-T20 y se incubaron con un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo acoplado a peroxidasa, diluido 1:3,000 (Bio-Rad) con leche al 2.5% en PBS-T20 durante 2 h a TA. Las bandas reactivas se revelaron por quimioluminiscencia con el kit “SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate” (Thermo Scientific-Pierce). Las imágenes se capturaron con el ChemiDoc XRS (Bio-Rad) y se analizaron con el “software Quantity One” (Bio-Rad).

8.11 Ensayo de inmunofluorescencia indirecta.

Parásitos en RG (≤ 1 mM) y AG (50 mM), se crecieron adheridos a cubreobjetos durante 20 h a 37°C, se lavaron con PBS pH 7 filtrado, se fijaron con paraformaldehído fresco al 2% en PBS pH 7 durante 30 min a TA, se lavaron cinco veces con albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS y se bloquearon con PBS-glicina 0.5 M durante 1 h a TA, se lavaron tres veces con PBS-glicina, se bloquearon con suero fetal bovino (SFB) al 1% en PBS durante 15 min a TA, se lavaron cinco veces con PBS y se incubaron durante 18 h a 4°C con el anticuerpo primario anti-TvTIMr o suero pre-inmune (PI) de conejo, ambos a una dilución de 1:50 en PBS. Los parásitos se lavaron cinco veces con PBS y se incubaron con un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo acoplado a fluoresceína (FITC) (Thermo Scientific) diluido 1:100 en PBS durante 2 h a TA, se lavaron cinco veces con PBS y la superficie de los parásitos se tiñó con DIL (DIL-CM-38; Molecular

Probes-Invitrogen) diluido 1:2,000 en agua miliQ filtrada durante 30 min a TA. Para marcar los núcleos de los parásitos, los cubreobjetos se montaron en 7 μ l de solución "Vectashield" con DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Los parásitos se observaron por microscopía confocal en un microscopio Zeiss y las imágenes se analizaron con el software ZEN 2012 (Carl Zeiss, Germany).

Para confirmar el efecto de la glucosa sobre la localización de las proteínas TvTIM de *T. vaginalis*, los parásitos se mantuvieron durante tres días por pase diario en RG (≤ 1 mM) antes de ser transferidos a medio fresco, suplementado con diferentes concentraciones de glucosa (≤ 1 , 2.5, 5, 10, 25 y 50 mM) sobre cubreobjetos durante 1 h a 37°C. Estos parásitos se procesaron con el mismo protocolo descrito arriba para los ensayos de inmunofluorescencia indirecta y análisis de microscopía confocal.

8.12 Inmunomarcaje con oro coloidal.

Parásitos crecidos en AG por 20 h a 37°C, se lavaron cinco veces con PBS pH 7 y se fijaron con una mezcla de paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 0.2% en medio D-MEM sin suero. Los parásitos se deshidrataron con etanol, se embebieron en resina LR-white que se polimerizó con luz UV a 4°C toda la noche. De la pastilla de parásitos se generaron secciones ultra finas, se montaron en rejillas de níquel, se bloquearon con suero fetal bovino (SFB) al 10% en PBS, se incubaron con el anticuerpo primario anti-TvTIMr diluido 1:30 toda la noche a 4°C, se lavaron varias veces con albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS, se incubaron con el anticuerpo secundario de cabra anti-conejo acoplado a partículas de oro coloidal (10 o 20 nm), diluido 1:50 durante 1 h a TA. Como control negativo, los parásitos se incubaron solo con el anticuerpo secundario. Las muestras se analizaron por microscopía electrónica de transmisión (MET) en un microscopio JEOL JEM-1011 (JOEL Ltd., Tokyo, Japón).

8.13 Ensayo de ligando-adhesina.

A partir de parásitos (2×10^7) crecidos en condiciones de bajo hierro (BH; 0 μM), hierro normal (NH; 20 μM) y alto hierro (AH; 250 μM) durante 20 h a 37°C, se obtuvieron los extractos de proteínas totales solubles que contienen a las adhesinas utilizando el mismo protocolo descrito en la sección 8.8. Para los ensayos de ligando-adhesinas los extractos de proteínas obtenidos en cada condición de hierro se incubaron con células HeLa (1×10^6) fijadas con glutaraldehído al 2.5% y bloqueadas con glicina al 0.5 M. La incubación se realizó en agitación suave a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, las células se lavaron cinco veces con amortiguador TDSET (Tris-Cl 10 mM, pH 7.8, DOC 0.2%, SDS 0.1%, EDTA 10 mM y Triton-X100 al 1%), centrifugando a 12,000 x g 5 min a 4°C en cada lavado. Las proteínas de *T. vaginalis* unidas por afinidad a la superficie de las células HeLa se separaron eluyendo con 30 μl de amortiguador de muestra 1 \times (BM 1 \times), se hirviendo durante 3 min y se analizaron por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10%. Para visualizar el patrón de proteínas un duplicado del gel se tiñó con azul brillante de Coomassie (CBB). Para los ensayos de WB duplicados de estos geles se transfirieron a membranas de NC (0.22 μm , Bio-Rad) y se incubaron con los anticuerpos correspondientes.

8.14 Ensayo de afinidad a ligando.

Para demostrar la interacción de las proteínas TvTIM de *T. vaginalis* con diferentes ligandos como proteínas de matriz extracelular y plasminógeno, se realizaron ensayos de Far-western blot (FWB), siguiendo el protocolo previamente descrito por Pereira y col. 2007 (58). De manera breve y con pequeñas modificaciones, 1 μg de las proteínas recombinantes TvTIM1r o TvTIM2r se sometieron a SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12%, se transfirieron a membranas de NC (0.22 μm , Bio-Rad) y se bloquearon con leche al 10% en PBS-T20 toda la noche a 4°C en agitación suave. Las membranas se lavaron cinco veces con PBS-T20 y se incubaron con los diferentes ligandos: laminina (Lm; L2020, Sigma Co. St Louis, MO, USA), fibronectina (Fn; F2006, Sigma),

plasminógeno (Plg; STA-239, Cell Bio-Labs, San Diego, CA, USA), o ppTvCP4r, una proteína recombinante no relacionada que se utilizó como control negativo. Todos los ligandos se utilizaron a una concentración de 30 µg/ml en PBS-BSA al 1% y la interacción se incubó toda la noche a 4°C en agitación suave. Las membranas se lavaron cinco veces con PBS-T20 y se incubaron toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios correspondientes: anti-Lm (L9393, Sigma), anti-Fn (F3348, Sigma), anti-Plg (STA-139, Cell Bio-Labs) o anti-ppTvCP4r, diluidos 1:1,000 en PBS-T20-BSA. Las membranas se lavaron cinco veces con PBS-T20 y se incubaron 2 h a TA con los anticuerpos secundarios correspondientes: cabra anti-conejo acoplado a peroxidasa (dilución 1:3,000, Bio-Rad) o burro anti-cabra acoplado a peroxidasa (dilución 1:2,000, Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA), se lavaron cinco veces con PBS-T20 y las bandas reactivas se revelaron por quimioluminiscencia “SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate” (Thermo Scientific-Pierce). Las imágenes se capturaron con el ChemiDoc XRS (Bio-Rad) y se analizaron con el software Quantity One (Bio-Rad). La proteína recombinante alfa-enolasa de *T. vaginalis* previamente reportada como receptor de Plg (44), se utilizó como control positivo de FWB; una proteína recombinante no relacionada ppTvCP4r, se incluyó como control negativo de FWB. Como controles negativos adicionales se incluyeron las proteínas TvTIM1r, TvTIM2r, TvENOr y ppTvCP4r incubadas directamente con los anticuerpos anti-Lm, anti-Fn, anti-Plg. Como controles positivos, las proteínas TvTIM1r, TvTIM2r, TvENOr, o ppTvCP4r, se incubaron directamente con los anticuerpos correspondientes: anti-TvTIMr (dilución 1:1,500), anti-TvENOr (dilución 1:2,000) o anti-ppTvCP4r (dilución 1:2,000).

8.15 Ensayo de unión Dot-blot.

Diferentes cantidades (0, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 2.0 y 4.0 µg) de las proteínas recombinantes TvTIM1r, TvTIM2r, TvENOr y TvCP4r se transfirieron a membranas de NC (0.22 µm; Bio-Rad) utilizando el equipo de microfiltración Bio-Dot (Bio-Rad). Las membranas se bloquearon con leche al 5% en amortiguador TBS-T20 (Tris-

HCl 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7.5, Tween-20 al 0.05%) toda la noche a 4°C, se lavaron cinco veces con TBS-T20 y se incubaron con Lm y Fn (30 µg/ml), o Plg (30 µg/ml y 60 µg/ml) en TBS-BSA al 1% con agitación suave toda la noche a 4°C, se lavaron cinco veces con TBS-T20 y se incubaron toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios correspondientes: anti-Lm, anti-Fn, anti-Plg, (dilución 1:1,000) en PBS-T20-BSA. Las membranas se lavaron cinco veces con TBS-T20 y se incubaron 2 h a TA con los anticuerpos secundarios correspondientes: cabra anti-conejo acoplado a peroxidasa (dilución 1:3,000) o burro anti-cabra acoplado a peroxidasa (dilución 1:2,000), se lavaron cinco veces con TBS-T20 y las zonas reactivas se revelaron por quimioluminiscencia “SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate” (Thermo Scientific-Pierce). Las imágenes se capturaron con el ChemiDoc XRS (Bio-Rad) y se analizaron con el software Quantity One (Bio-Rad). Como controles positivos de dot-blot diferentes cantidades de las proteínas TvTIM1r, TvTIM2r, o TvCP4r se incubaron directamente con los anticuerpos anti-TvTIMr o anti-TvCP4r (ambos a dilución 1:1,000), respectivamente. Como control positivo de unión a Plg se incluyó a la proteína recombinante TvENOr y como control negativo de unión se utilizó a la proteína recombinante no relacionada TvCP4r en las mismas cantidades descritas previamente.

8.16 Marcaje con cell tracker blue.

Los parásitos se lavaron tres veces con PBS pH 7 frío y se contaron en un hematocitómetro. Enseguida, a 1×10^6 parásitos/ml resuspendidos en medio TYG sin suero, se adicionó Cell Tracker Blue (CTB; 75 µM) (CMAC; Molecular Probes) en DMSO y se incubaron durante 45 min a 37°C en agitación a 100 rpm, se lavaron tres veces con medio TYG-SBA centrifugando a 1,800 rpm/5 min en cada lavado. Los parásitos se resuspendieron en medio fresco TYG-SBA y se incubaron 2 h a 37°C cubiertos de la luz. Los parásitos marcados con CTB se analizaron por microscopía de epifluorescencia.

8.17 Ensayos de adhesión a Lm y Fn.

Primeramente, las placas de 96 pozos (Jet Biofil, USA) fueron recubiertas con Lm, Fn o BSA (2 µg/pozo) en amortiguador de carbonatos, pH 9.6, incubando toda la noche a 4°C. A continuación, los pozos se lavaron 5 veces con PBS-T20, se bloquearon con leche al 5% en PBS-T20 2 h a TA, se lavaron cinco veces con PBS-T20, se incubaron con los anticuerpos primarios anti-Lm o anti-Fn (dilución 1:200) toda la noche a 4°C, se lavaron con PBS-T20 y se incubaron con un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo acoplado a FITC (dilución 1:500) 2 h a TA. Los pozos se lavaron cinco veces con PBS-T20 y la emisión de fluorescencia por pozo se midió a 520 nm en un espectrofluorómetro Gemini EM (Molecular Devices SpectraMax) confirmando de esta manera el recubrimiento de los pozos con Lm y Fn.

Para los ensayos de adhesión de *T. vaginalis* a Lm y Fn inmobilizadas en placas de 96 pozos, se utilizaron parásitos vivos crecidos en diferentes concentraciones de glucosa (RG, NG y AG) previamente marcados con CTB (75 µM), los cuales se agregaron a los pozos (5×10^5 parásitos/pozo) recubiertos con Lm, Fn o BSA (control negativo), se incubaron 30 min a 37°C, se lavaron tres veces con PBS tibio para eliminar los parásitos no adheridos y la emisión de fluorescencia a partir de los parásitos adheridos a Lm, Fn o BSA se midió a 466 nm en un espectrofluorómetro Gemini EM. Las unidades relativas de fluorescencia (URF) se analizaron utilizando el software SoftMax Pro 6.3 y se graficaron utilizando el software GraphPad Prism 5.0.

8.18 Inhibición de la adhesión a Lm y Fn.

Para los ensayos de inhibición de la adhesión parásitos crecidos en condiciones de AG y marcados con CTB se incubaron con concentraciones crecientes (0, 100, 200, 300, and 400 µg/ml) de IgGs de los sueros anti-TvTIMr, pre-inmune (PI) de conejo (como control negativo), o anti-ppTvCP4r (como un anticuerpo no relacionado) durante 30 min a 4°C, se lavaron tres veces con medio

TYG sin suero y luego se agregaron a los pozos (5×10^5 parásitos/pozo) recubiertos con Lm o Fn en un volumen final de 100 μ l de medio TYG sin suero y se incubaron durante 30 min a 37°C. A continuación, se lavaron tres veces con PBS tibio para eliminar los parásitos no adheridos y después del tercer lavado se eliminó el PBS de los pozos para medir la emisión de fluorescencia a partir de los parásitos adheridos a Lm y Fn en un espectrofluorómetro Gemini EM a 466 nm. Para obtener el 100% de adhesión a Lm y Fn se incluyeron parásitos marcados con CTB sin tratamiento.

Para los ensayos de competencia pozos recubiertos con Lm y Fn (2 μ g/pozo) se incubaron con cantidades crecientes (0-1.6 μ g) de las proteínas recombinantes purificadas TvTIM1r, TvTIM2r o ppTvCP4r (control negativo), durante 1 h a 4°C. A continuación, se lavaron tres veces con PBS para eliminar la proteína no unida, se agregaron los parásitos (5×10^5 parásitos/pozo) previamente cultivados en AG y marcados con CTB, se incubaron 30 min a 37°C, se lavaron tres veces con PBS tibio para eliminar los parásitos no adheridos y después del tercer lavado se eliminó el PBS de los pozos para medir la emisión de fluorescencia a partir de los parásitos adheridos a Lm y Fn en un espectrofluorómetro Gemini EM a 466 nm. El 100% de adhesión se obtuvo de parásitos adheridos directamente a Lm y Fn, sin tratamiento con los competidores.

8.19 Ensayo de secreción in vitro.

Para determinar si las proteínas TvTIM eran secretadas por *T. vaginalis* bajo las condiciones de glucosa utilizadas, realizamos ensayos de secreción *in vitro* a partir de parásitos (5×10^6) resuspendidos en 5 ml de PBS pH7, en condiciones de RG (≤ 1 mM) y AG (50 mM), incubados durante 1 h a 37°C. Los productos de secreción en ambas condiciones se obtuvieron por centrifugación a 1,800 rpm por 5 min a 4°C y el sobrenadante se filtró a través de membranas de 0.22 μ m para eliminar restos celulares. A continuación las proteínas se precipitaron con TCA al 10% durante toda la noche a 4°C, se obtuvo la pastilla de proteínas a partir de los 5 ml, centrifugando a 13,000 rpm por 5 min a 4°C, se

lavarón tres veces con acetona fría para eliminar los residuos de TCA, se resuspendieron en 20 µl de amortiguador de muestra (BM 1×), se hirvieron 5 min, luego se analizaron por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12% y los patrones de proteínas se visualizaron por tinción con azul brillante de Coomassie (CBB). Duplicados de estos geles se transfirieron a membranas de NC (0.22 µm, Bio-Rad) para su análisis por WB con los diferentes anticuerpos primarios: anti-TvTIMr, anti-EhHKr (control negativo de secreción) y anti-TvCP4 (control positivo de secreción) que se incubaron durante toda la noche a 4°C en agitación suave. Las membranas se lavaron cinco veces con PBS-T20, se incubaron con un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo acoplado a peroxidasa (dilución 1:3,000) en PBS-T20 durante 2 h a TA, se lavaron 5 veces con PBS-T20 y finalmente las bandas reactivas se revelaron por quimioluminiscencia, las imágenes se capturaron con el ChemiDoc XRS (Bio-Rad) y se analizaron con el software Quantity One (Bio-Rad). Como control positivo de WB las pastillas de proteínas totales de los parásitos en RG y AG se analizaron por SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de NC y se analizaron por WB utilizando los mismos anticuerpos mencionados.

8.20 Obtención de las secreciones vaginales.

Las muestras de secreciones vaginales (SV) incluidas en este estudio se obtuvieron con la colaboración de la Biol. Diana Rodríguez y la QBP. María del Pilar González Uribe, esta última adscrita al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). La toma de muestras se realizó a mujeres que acudían a su exámen periódico de Papanicolaou en la Unidad de Medicina Preventiva del Hospital General de México (HGM), así como a mujeres que acudían para estudios ginecológicos a la Unidad de Medicina Familiar N°94 (UMF-IMSS). Como evidencia de infección vaginal todas ellas recibieron el diagnóstico de cervicovaginitis y algunos otros trastornos ginecológicos mediante exámenes clínicos. Las SVs se colectaron a partir del flujo vaginal (líquido blanco lechoso) con un hisopo estéril y se diluyeron en solución salina (dilución 1:5). La presencia

de componentes celulares como células epiteliales vaginales (VEC), leucocitos, bacterias, levaduras y *T. vaginalis* se determinó por análisis microscópico de las SVs. El pH de las muestras se determinó con tiras indicadoras de pH con rangos de 0-14 y 4-7 (ColorpHast, Merck). La presencia de *T. vaginalis* y otros patógenos como *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans* o enterobacterias se determinó por análisis microscópico y cultivo *in vitro*. Para el cultivo de *T. vaginalis* se utilizó el método de InPouch Tv (Biomed Diagnostic, White City, OR, USA).

8.21 Determinación de los niveles de glucosa en SV.

Para determinar los niveles de glucosa a los que *T. vaginalis* se expone durante la infección vaginal, se cuantificó la glucosa libre presente en las secreciones vaginales de mujeres con tricomoniasis. En este estudio se incluyeron 85 muestras de SV las cuales se obtuvieron según el protocolo descrito en la sección anterior 8.20. Las SV diluidas (1:5) en solución salina, se centrifugaron a 13,000 rpm por 5 min a 4°C para eliminar los componentes celulares. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se centrifugó nuevamente a 13,000 rpm por 5 min a 4°C. Las muestras de SV se organizaron en dos grupos de acuerdo a los resultados del análisis microscópico y cultivo *in vitro*: 1) grupo de personas con microbiota normal sana y 2) grupo de personas con infección vaginal. Para la cuantificación de glucosa libre, se tomaron 500 µl de cada SV y se enviaron al laboratorio de diagnóstico clínico MICRO-TEC para la cuantificación de glucosa por el método automatizado de glucosa-hexoquinasa.

8.22 Búsqueda de TvTIM en secreciones vaginales.

Para determinar la presencia de las proteínas TvTIM de *T. vaginalis* durante la infección, se realizaron ensayos de WB con el anticuerpo anti-TvTIMr, a partir de secreciones vaginales obtenidas de mujeres con tricomoniasis (n=16) o mujeres con microbiota normal sana (n=16). La selección de las SV para este estudio, se realizó en base a los resultados del análisis microscópico y cultivo *in*

vitro. Cada muestra de SV con tricomoniasis tuvo su SV equivalente con microbiota normal sana, donde la única diferencia entre las muestras radicó en la presencia (Tv +) o la ausencia (Tv -) de *T. vaginalis*. Para los ensayos de WB, se obtuvieron las proteínas presentes en las SV por el método de precipitación con ácido tricloroacético (TCA). A 200 µl de SV se le agregó 700 µl de PBS pH 7 frío y se precipitaron con 100 µl de TCA toda la noche a 4°C. La pastilla de proteínas se obtuvo por centrifugación a 13,000 rpm por 5 min a 4°C, se lavaron tres veces con acetona fría, se resuspendieron en 30 µl de amortiguador de muestra (BM 1×), se hirvieron 5 min, se analizaron por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12 % y el perfil de proteínas se visualizó por tinción con CBB. Duplicados de estos geles se transfirieron a membranas de NC (0.22 µm, Bio-Rad) para su análisis por WB con el anticuerpo primario anti-TvTIMr (dilución 1:500) y con un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo acoplado a peroxidasa (dilución 1:3,000). Las bandas reactivas se detectaron por quimioluminiscencia, las imágenes se capturaron con el ChemiDoc XRS (Bio-Rad) y se analizaron con el software Quantity One (Bio-Rad). Las bandas con reactividad positiva por WB, se localizaron en los geles teñidos con CBB, se cortaron y se identificaron por Maldi-Tof-MS. Para descartar un posible reconocimiento cruzado del anticuerpo anti-TvTIM con la proteína TIM de humano, extractos de proteínas totales obtenidos a partir de células HeLa se analizaron por WB con el anticuerpo anti-TvTIMr.

8.23 Inmunofluorescencia indirecta de células VEC.

Para evaluar la posible interacción entre las proteínas TvTIM de *T. vaginalis* con las células epiteliales vaginales (VEC) durante la infección; realizamos ensayos de inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo anti-TvTIMr, a partir de células VEC aisladas de las secreciones vaginales de mujeres con tricomoniasis o mujeres con microbiota normal sana (control de especificidad). Para el aislamiento de las células VEC las SV (500 µl) se centrifugaron a 6,000 rpm por 5 min a 4°C, la pastilla de células se resuspendió en 800µl de paraformaldehído al 4% y se fijaron sobre cubreobjetos tratados con poli-L-lisina

(SIGMA) 30 min a TA, se lavaron cinco veces con PBS, luego cinco veces con PBS-albúmina al 1%, se bloquearon con PBS-glicina (0.5 M) 1 h a TA, se lavaron tres veces con PBS-glicina, se bloquearon con 1% de suero fetal bovino en PBS 15 min a TA, se lavaron cinco veces con PBS y se incubaron con el anticuerpo primario anti-TvTIMr (dilución 1:50) 18 h a 4°C. A continuación, se lavaron cinco veces con PBS, se incubaron con un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo acoplado a fluoresceína (FITC) (dilución 1:100 en PBS) 2 h, se lavaron cinco veces con PBS y la superficie de las células se tiñó con DIL (dilución 1:2,000) 30 min a TA. Para marcar los núcleos los cubreobjetos se montaron en 7 µl de solución Vectashield con DAPI y finalmente las células se analizaron por microscopía confocal en un microscopio Zeiss y las imágenes se analizaron con el software ZEN 2012 (Carl Zeiss, Germany).

8.24 Ensayos de citotoxicidad

Para los ensayos de citotoxicidad las tricomonas ($\sim 2 \times 10^5$ parásitos/pozo) se depositaron sobre monocapas de células HeLa ($\sim 5 \times 10^4$ células/pozo) en una relación 4:1 (parásito/HeLa) en medio de interacción D-MEM-TYG (relación 2:1) sin suero. Para evaluar el efecto de la glucosa sobre la citotoxicidad de *T. vaginalis*, la interacción parásito-HeLa se realizó en condiciones de RG (≤ 1 mM) o AG (50 mM) y se siguió a los 15, 30 y 60 min a 37°C, en atmósfera de CO₂ al 5%. Concluido el tiempo de interacción se retiró el medio de los pozos, se lavaron tres veces con PBS frío, para eliminar los parásitos adheridos y las monocapas de células HeLa se fijaron con formaldehído al 2% en PBS 10 min a TA, se lavaron tres veces con PBS y se tiñeron con cristal violeta (50 µl/pozo) 10 min a TA. Los pozos se lavaron cinco veces con PBS para eliminar el exceso de colorante y se evaluó la integridad de las monocapas por microscopía óptica. Para determinar el % de citotoxicidad, el colorante retenido por las monocapas se eluyó en 50 µl de SDS al 1% y se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de ELISA. El % de citotoxicidad de las monocapas incubadas con *T. vaginalis* se calculó comparando

con el control de células HeLa sin tratamiento. Los resultados se graficaron utilizando el software GraphPad Prism.

8.25 Ensayos de actividad proteolítica.

Para determinar el efecto de la glucosa sobre la actividad proteolítica de *T. vaginalis*, se obtuvieron extractos resistentes a proteasas a partir de tricomonas (2×10^7) cultivadas en medio TYG-SBA en RG (≤ 1 mM) o AG (50 mM). Los parásitos se lavaron tres veces con PBS pH 7 frío, se resuspendieron en 500 μ l de PBS pH 8, se lisaron con 50 μ l de desoxicolato de sodio al 10% y se incubaron durante 20 min a 4°C, se adicionaron 450 μ l de PBS pH 8 (1 ml vol. final), se depositó en el fondo del tubo un colchón de sacarosa al 10% (100 μ l) con indicador rojo de fenol y se centrifugó a $12,000 \times g$ 30 min a 4°C. Las proteínas de los sobrenadantes se analizaron por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12% copolimerizados con gelatina al 0.2%. Después de la electroforesis las proteasas separadas en los geles se renaturalizaron con 30 ml de Tritón X-100 al 2.5% 1 h a TA y se activaron con amortiguador de acetato de sodio (0.1 M) pH 4.5 con β -mercaptoetanol al 0.1% por 4 h a 4°C o 4 h a 37°C. Para visualizar las zonas con actividad proteolítica los geles se tiñeron con CBB, observando la actividad proteolítica como bandas blancas contra un fondo oscuro.

8.26 Expresión de cisteína proteinasas (CPs).

Para evaluar el efecto de la glucosa en algunas de las CPs que participan en la virulencia de *T. vaginalis*, se obtuvieron extractos resistentes a proteasas de parásitos (2×10^7) cultivados en medio TYG-SBA en RG (≤ 1 mM) y AG (50 mM) como se describió previamente. Los extractos se analizaron por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12%, se transfirieron a membranas de NC, se bloquearon con leche al 10% en PBS-T20 durante toda la noche a 4°C, se lavaron cinco veces con PBS-T20 y se incubaron 18 h a 4°C con diferentes anticuerpos primarios dirigidos contra varias CPs de *T. vaginalis*: anti-TvCP2 (1:200), anti-

TvCP4 (1:200), anti-TvCP30 (1:200), anti-TvCP39 (1:200) y anti-TvLEGU-1 (1:500) diluidos con 5% de leche en PBS-T20. Las membranas se lavaron cinco veces con PBS-T20 y se incubaron con un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo acoplado a peroxidasa (dilución 1:3,000) 2 h a TA, se lavaron cinco veces con PBS-T20, las bandas reactivas se revelaron por quimiolumiscencia (SuperSignal West Pico), las imágenes se capturaron con el ChemiDoc XRS (Bio-Rad) y se analizaron con el software Quantity One (Bio-Rad).

8.27 Electroforesis en 2-DE.

La electroforesis bidimensional se realizó según el protocolo previamente descrito por Cárdenas-Guerra y col. 2013 (76). Parásitos (6×10^7) cultivados en RG (≤ 1 mM) y AG (50 mM) por 22 h a 37°C, se resuspendieron y lisaron en 150 μ l de amortiguador de isoelectroenfoco (Bio-Rad), se incubaron 20 min a TA, se centrifugó a 13,000 rpm 5 min a 4°C para eliminar los componentes celulares no solubilizados y el sobrenadante (extracto resistente a proteasas) se transfirió a las celdas de la cámara para isoelectroenfoco (IEF; Bio-Rad). Para la separación de las proteínas en la primera dimensión, tiras de gel con un gradiente de pH inmovilizado (ReadyStrip IPG strip pH 4-7, Bio-Rad) se colocaron directamente sobre los extractos en la cámara y se rehidrataron de manera activa 14 h a 20°C con 50 volts. El isoelectroenfoco de las proteínas se realizó en el equipo Protean IEF Cell (Bio-Rad), en tres pasos: (1) 250 volts por 20 min; (2) 4,000 volts por 3 h; (3) 4,000 volts con un incremento gradual hasta 10,000 volts/h. Una vez terminada la corrida, las tiras de gel con las proteínas se sometieron a la segunda dimensión (2D) por SDS-PAGE en geles preparativos de poliacrilamida al 10 y 12%. Antes de la corrida las tiras de gel se incubaron en amortiguador de equilibrio 1 (con DTT) 10 min a TA y en amortiguador de equilibrio 2 (con iodacetamida) 10 min a TA para geles teñidos con nitrato de plata. En el caso de geles para actividad proteolítica, las tiras de gel se incubaron sólo con el amortiguador 1 ya que la iodoacetamida inhibe la actividad. Las tiras se montaron en los geles preparativos

correspondientes y se inmovilizaron con solución de “overlay” agarosa al 0.5% (Sigma-2D) y se corrieron a 100 volts constantes durante 90 min.

8.28 Identificación de proteínas por Maldi-Tof-MS

La identificación de proteínas se realizó a partir de geles de poliacrilamida en 1-DE teñidos con CBB; así como de geles de poliacrilamida en 2-DE teñidos con nitrato de plata. Las bandas de los geles 1-DE o las manchas de los geles 2-DE se cortaron, se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 ml estériles y se enviaron al Departamento de Biotecnología y Bioquímica (área de proteómica) del CINVESTAV-Unidad Irapuato, con la colaboración de la auxiliar en investigación C. Alicia Chagoya López. Las proteínas contenidas en las bandas o manchas se sometieron a una digestión con tripsina, para hacer un mapeo tróptico por el método de Maldi-Tof-MS/MS-peptide mapping en un espectrómetro de masas (ToFSPec SE).

8.29 Análisis in silico.

Para identificar posibles sitios de modificaciones postraduccionales en las proteínas TvTIM de *T. vaginalis*, se analizaron las secuencias de aminoácidos reportadas en TrichDB para TvTIM1 (TVAG_497370) y TvTIM2 (TVAG_096350), para la búsqueda de sitios implicados en la asociación a la membrana, secreción e interacción con otras proteínas o sustratos. Los programas utilizados para este estudio fueron: CSS-Palm 4.0 (csspalm.biocuckoo.org), GPS Lipid 1.0 (lipid.biocuckoo.org), GPS 3.0 (csspalm.biocuckoo.org), NetPhos 2.0 (www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos), DictyOGLy 1.1 (www.cbs.dtu.dk/services/DictyOGLy), NetNGly 1.0 (www.cbs.dtu.dk/services/NetNGLy).

8.30 Análisis estadístico

Las diferencias estadísticamente significativas entre los resultados generados para cada experimento, se determinaron por análisis de varianza (ANOVA) y el método comparativo de Tukey, utilizando el software GraphPad Prism 5.0.

Capítulo IX

Resultados

9.1 Niveles de glucosa en secreciones vaginales de mujeres con Tricomoniasis.

Uno de los principales planteamientos de este trabajo fue demostrar que la glucosa es otro factor ambiental que modula la virulencia de *T. vaginalis*. Los antecedentes sugerían que cambios en los niveles de glucosa *in vitro* podrían estar influyendo en la biología del parásito, sin embargo, se desconocía si *T. vaginalis* se exponía a cambios en la concentración de glucosa *in vivo* durante la infección. Para abordar esta cuestión en nuestro trabajo determinamos los niveles de glucosa libre presente en las secreciones vaginales de un total de 85 mujeres mexicanas, entre las que se incluyeron mujeres con microbiota normal y mujeres con infección vaginal por *T. vaginalis* o por otros patógenos. La tabla 1 incluye el concentrado de los resultados obtenidos de la cuantificación de glucosa, donde se muestran los valores individuales de glucosa en (mM) para cada persona. Los resultados muestran que para el grupo de mujeres con microbiota vaginal normal, pero que presentaban problemas ginecológicos la concentración de glucosa promedio fue de 11.96 mM, con una variación en los valores individuales entre 0.3-38.3 mM. Para el grupo de mujeres que presentaban cervicovaginitis pero sin *T. vaginalis*, la concentración de glucosa promedio fue de 14.31 mM con valores individuales que variaron entre 0.3-43.10 mM. Para el grupo de mujeres con cervicovaginitis causada por *T. vaginalis*, la concentración de glucosa promedio fue de 10.25 mM con valores individuales que variaron entre 0.3-36.65 mM. Finalmente, las mujeres que presentaban infección vaginal por *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis* y enterobacteria, sumado a otros problemas ginecológicos, la concentración de glucosa promedio fue de 13.48 mM con valores individuales entre 0.55-56.6 mM. Nuestros resultados sugieren que los niveles de glucosa

vaginal entre las mujeres incluidas en este estudio son variables; también muestran que las tres condiciones de glucosa (RG, NG y AG) utilizadas para los experimentos *in vitro* se encuentran dentro del rango de glucosa *in vivo*, lo que respalda nuestros resultados y sugiere que los parásitos se exponen a cambios drásticos en los niveles de glucosa durante la infección del tracto vaginal que además podrían estar modulando *in vivo* la virulencia de *T. vaginalis*. Es importante mencionar que los niveles de glucosa reportados en este estudio están sujetos a diferentes variables, como son la edad, pH y diagnóstico clínico de cada persona.

Tabla 1. Niveles de glucosa en secreciones vaginales de mujeres con microbiota normal e infección vaginal.

(n) ^a	Edad ^b	pH	Diagnóstico clínico	Análisis microscópico					Cultivo <i>in vitro</i> ^h	Glucosa (mM) ^k
				VEC ^c	CB ^d	Bact ^e	Lev ^f	Tv ^g		
Microbiota normal										
1	37	4	Quiste ovárico	+	+	++	-	-	PNA ⁱ	0.3
2	38	8	Miomatosis uterina	+	+	+	-	-	√	0.55
3	42	5	Cistocele	+	+	+	-	-	√	0.55
4	33	4	Embarazo	++	+	+	-	-	√	0.55
5	31	5	Infección del tracto urinario, cervicovaginitis	++	++	++	-	-	√	2.2
6	24	4	Cervicovaginitis, embarazo	+	+	+	-	-	√	2.2
7	35	7	Cervicovaginitis, disfunción ovárica	+	+	+	-	-	√	2.8
8	54	7	Miomatosis uterina	+	+	+	-	-	√	2.8
9	65	7	Cistocele	++	++	++	-	-	√	3.05
10	36	5	Dismenorrea	+	+++	+++	-	-	√	3.9
11	60	7	Cistoceles	+	+++	+++	-	-	√	3.9
12	24	4	Dispereunia	++	++	+	-	-	√	7.5
13	33	4	Infección del tracto urinario, infertilidad	++	+	++	-	-	√	18.3
14	30	4	Embarazo	+++	+	++	-	-	√	21.65
15	40	4	Miomatosis uterina	+++	++	++	-	-	√	23.05
16	29	5	Infección del tracto urinario	++	++	++	-	-	√	25.25
17	38	7	Vaginitis crónica, ovario poliquístico	++	+	+++	-	-	√	25.8
18	37	4	Quiste ovárico	++	+	+++	-	-	√	26.35
19	37	4	Vulvovaginitis crónica	+	+	+	-	-	√	30.25
20	45	6	Cistocele	+	+	+	-	-	√	38.3
Infección vaginal										
21	25	4	Cervicovaginitis	++	++	++	-	-	Tv (-) ^{j*}	0.3
22	26	4	√	++	+	++	-	-	√	0.3
23	43	5	√	++	++	++	-	-	√	0.3
24	44	6	√	+++	+++	++	-	-	√	0.3
25	50	5	√	+	+	+	-	-	√	0.3
26	65	7	√	+	+	+	-	-	√	0.3
27	23	6	√	+	+	+	-	-	√	0.55
28	33	5	√	++	++	++	-	-	√	0.55
29	38	4	√	+	+++	++	-	-	√	0.55
30	42	5	√	+	+	+	-	-	√	0.55
31	25	6	√	+++	+++	+++	-	-	√	0.85
32	42	7	√	++	++	+	-	-	√	0.85
33	23	5	√	+	+	+	-	-	√	1.95
34	29	6	√	+	+	+	+	-	√	1.95
35	29	6	√	++	++	+++	-	-	√	2.2
36	27	4	√	+++	++	++	+	-	√	2.2
37	44	5	√	++	++	+++	+	-	√	2.5
38	42	5	√	++	++	+	-	-	√	3.05
39	20	5	√	++	++	++	-	-	√	3.35
40	58	6	√	++	++	++	-	-	√	3.6
41	33	5	√	+	+	++	-	-	√	3.9
42	43	4	√	++	+	+++	-	-	√	17.2
43	25	5	√	+	++	++	-	-	√	22.2
44	50	5	√	++	+	++	-	-	√	22.75
45	34	6	√	++	+	+++	-	-	√	25.8
46	29	5	√	++	++	++	-	-	√	26.9
47	50	4	√	++	++	++	+	-	√	28.3
48	20	5	√	++	+	+	-	-	√	28.3
49	31	5	√	++	+	++	-	-	√	30.55
50	59	5	√	++	+	+	-	-	√	31.1
51	36	6	√	++	++	++	-	-	√	31.35

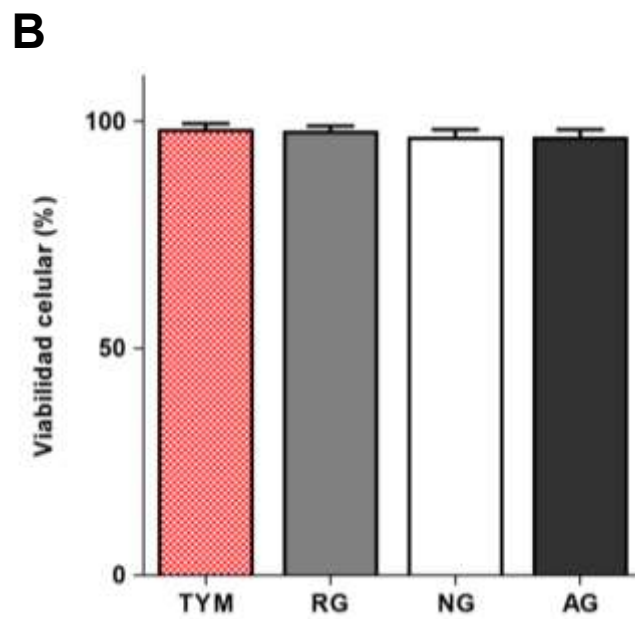
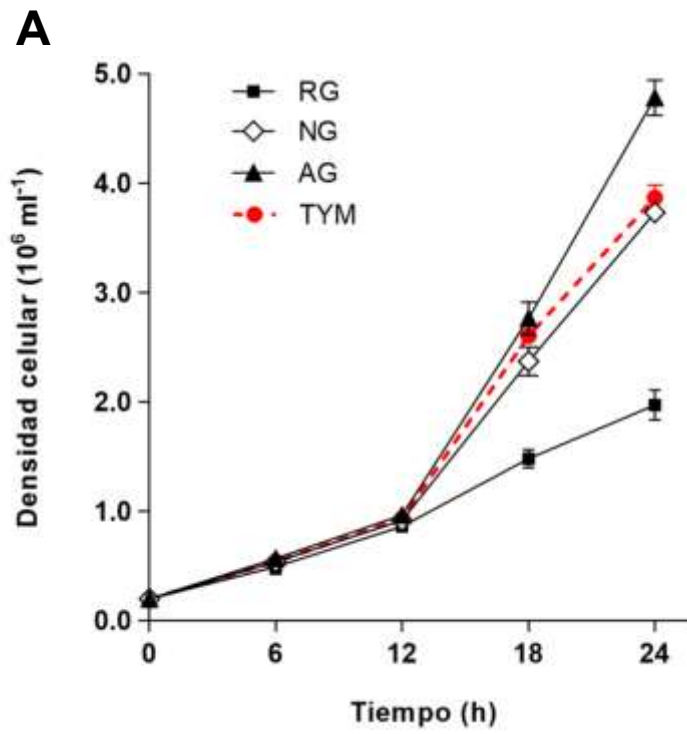
52	52	5	√		++	++	+++	-	-	√	31.66
53	37	5	√		++	+	++	++	-	√	36.1
54	47	4	√		++	++	+++	-	-	√	39.15
55	26	5	√		++	++	++	-	-	√	42.2
56	24	6	√		+++	++	++	-	-	√	42.45
57	41	4	√		++	++	+++	-	-	√	43.1
Trichomonas vaginalis											
58	33	5		Cervicovaginitis	+	+	++	-	+	<i>T. vaginalis</i> *	0.3
59	52	5	√		++	++	+++	-	+	√	0.3
60	26	6	√		++	++	++	+	+	√	0.3
61	40	5	√		++	+	+++	-	+	√	0.85
62	35	5	√		++	++	+++	-	+	√	0.85
63	25	6	√		+++	++	++	-	+	√	1.1
64	19	5	√		+++	++	+++	-	+	√	1.1
65	40	5	√		+	+	+++	-	+	√	1.65
66	44	5	√		+++	+	+++	-	+	√	1.65
67	40	6	√		+	+	+	-	+	√	2.2
68	42	5	√		++	++	+++	-	+	√	19.45
69	61	6	√		++	++	++	-	+	√	25.25
70	42	5	√		++	++	+	-	+	√	30.8
71	35	5	√		++	+	++	-	+	√	31.35
72	20	5	√		+	+	++	+	+	√	36.65
Otros patógenos											
73	25	6		Cervicovaginitis	++	+++	++	-	-	<i>G. vaginalis</i>	0.55
74	19	5		Cervicovaginitis	++	+	++	-	-	√	1.1
75	29	5		Hipotiroidismo	+++	++	+++	-	-	√	1.95
76	29	4		Papilomavirus humano	++	+	+	-	-	<i>C. albicans</i>	1.4
77	47	5		Urosepsis	+++	+	++	-	-	√	2.2
78	26	4		Embarazo	+	+	+	-	-	√	2.2
79	21	5		Cervicovaginitis, embarazo	+++	+++	+++	-	-	√	2.5
80	27	5		Cervicovaginitis	++	++	++	-	-	√	4.45
81	24	7		Cáncer cervical	+	+	+	-	-	√	25.25
82	47	4		Cervicovaginitis	++	++	++	+++	-	√	41.35
83	34	5		Infección del tracto urinario, infertilidad	+	+	+	-	-	Enterobacterias	3.9
84	58	7		Infección del tracto urinario, cervicovaginitis	++	++	++	-	-	√	31.9
85	66	7		Diabetes mellitus tipo 2	+	+	+	-	-	√	56.6

(n)^a, Número de muestras en orden consecutivo; **Edad**^b, en años; **VEC**^c, células epiteliales vaginales; **CB**^d, células blancas; **Bact**^e, bacterias; **Lev**^f, levaduras; **Tv**^g, *Trichomonas vaginalis*; **Cultivo in vitro**^h, aislamiento e identificación de bacterias, hongos o *T. vaginalis*; **PNA**ⁱ, patógenos no aislados por cultivo; sin embargo, no se realizó el cultivo para el aislamiento de *T. vaginalis*; **Tv** (-)^j, en estas muestras no se detectó a *T. vaginalis* en el análisis microscópico, ni por cultivo *in vitro*. Por lo tanto se clasificaron como negativas para *T. vaginalis*; (*), los asteriscos indican que sólo se realizó el cultivo *in vitro* para el aislamiento de *T. vaginalis*. Los niveles de glucosa en las secreciones vaginales se muestran en milimolar (mM) determinada por el método automatizado de hexoquinasa^k. Los signos indican los componentes celulares en escasos (+), moderados (++), abundantes (+++) o negativos (-). Los signos (√) indican resultados similares en cada grupo de muestras.

9.2 Efecto de la glucosa en el crecimiento de *T. vaginalis*.

Tomando en cuenta que *T. vaginalis* podría estar expuesta a cambios en los niveles de glucosa durante la infección *in vivo*; nos surgió el interés por evaluar el efecto de la glucosa en el crecimiento de *T. vaginalis*, ya que es un evento esencial para el mantenimiento de una infección crónica. Para ello, realizamos cinéticas de crecimiento de los parásitos en condiciones de restricción (RG; ≤ 1 mM), normal (NG; 25 mM) y alta (AG; 50 mM) concentración de glucosa. Nuestros resultados mostraron que la mayor densidad celular al tiempo máximo de 24 h de cultivo fue alcanzada por los parásitos en condiciones de AG ($4.78 \pm 0.16 \times 10^6$ células/ml), comparado con los parásitos en NG ($3.73 \pm 0.06 \times 10^6$ células/ml) y RG ($1.97 \pm 0.14 \times 10^6$ células/ml); incluso comparado con los parásitos crecidos en medio regular TYM ($3.78 \pm 0.12 \times 10^6$ células/ml) que se utilizó como un control normal de crecimiento (Fig. 3A). Adicionalmente, evaluamos si las diferentes condiciones de glucosa (RG, NG y AG) afectaban la viabilidad de los parásitos, sin embargo, no encontramos cambios significativos a las 24 h de cultivo, comparando con el control de crecimiento en medio TYM (Fig. 3B). Estos datos nos sugieren que AG es una condición óptima para el crecimiento de *T. vaginalis*, con un incremento significativo en la densidad celular ($P \leq 0.05$), comparado con la condición de RG. Además nos sugieren que la glucosa modula el crecimiento de los parásitos, posiblemente como un mecanismo de supervivencia para adaptarse a los cambios en las condiciones del microambiente vaginal.

Figura 3. Cinética de crecimiento de *Trichomonas vaginalis* en diferentes concentraciones de glucosa. (A) La gráfica muestra la cinética de crecimiento de *T. vaginalis* en condiciones de restricción (RG, ≤ 1 mM), normal (NG, 25 mM) y alta (AG, 50 mM) concentración de glucosa. El número inicial de parásitos cultivados en las diferentes condiciones de glucosa fue de 2×10^5 células/ml. Como control de crecimiento normal, la misma cantidad de parásitos se crecieron en medio regular TYM (triptona, extracto de levadura, maltosa). La densidad celular se determinó en intervalos de 6 h durante 24 h de crecimiento a 37°C. **(B)** La gráfica muestra la viabilidad celular de los parásitos a las 24 h de cultivo en las diferentes condiciones de glucosa (RG, NG y AG) determinada por el método de exclusión con el colorante azul de tripano. Todos los datos **(A y B)**, representan la desviación estándar de tres experimentos independientes por duplicado.

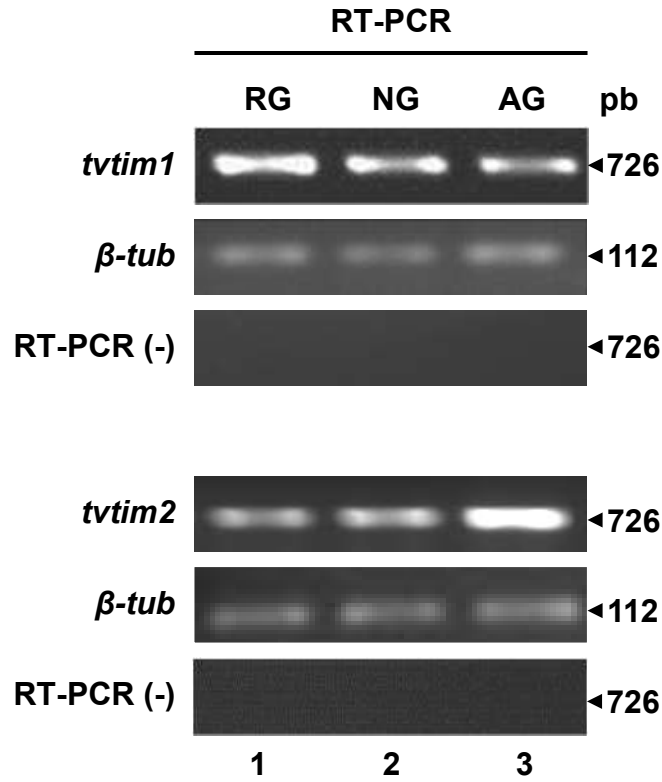


9.3 Expresión de los genes *vtim*

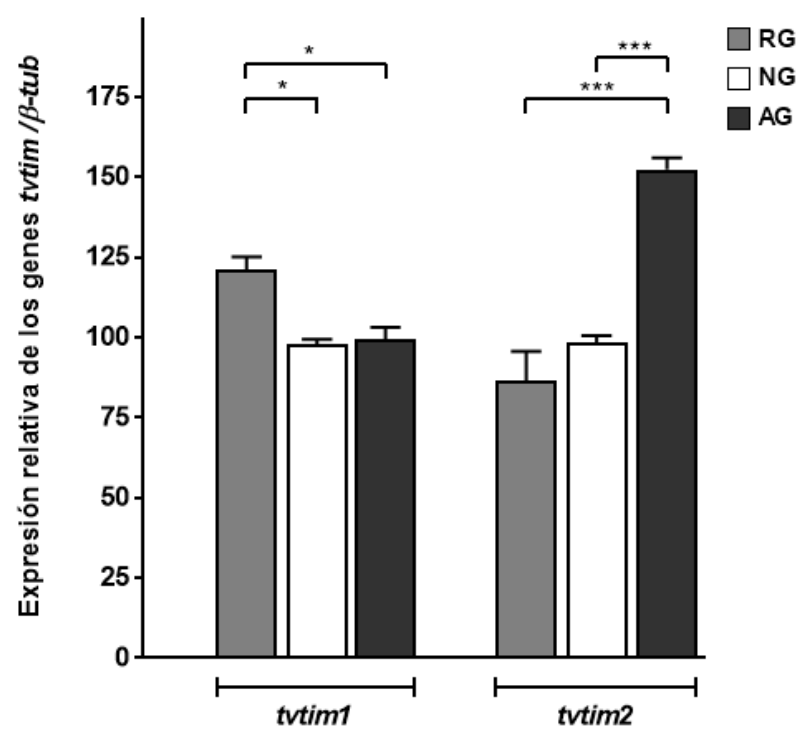
La triosafosfato isomerasa de *T. vaginalis*, TvTIM, es una enzima glucolítica codificada por dos genes *vtim* funcionales (*vtim1* y *vtim2*). Uno de los factores ambientales más estudiados en la regulación de la expresión de genes en *T. vaginalis* es el hierro; sin embargo, Figueroa-Angulo y col., 2012 (70) demostraron que el hierro no afecta la expresión de los genes *vtim*. Esto nos llevó a investigar a la glucosa como otro factor ambiental que podría afectar la expresión de los genes *vtim*. Mediante ensayos de RT-PCR a partir de cDNA de *T. vaginalis* cultivados en diferentes concentraciones de glucosa, se encontró que el gen “*vtim1*” muestra la mayor expresión en los parásitos que crecen en RG (Fig. 4A; línea 1) comparado con los parásitos en NG y AG (Fig. 4A, líneas 2 y 3). Por el contrario, el gen *vtim2* mostró una mayor expresión en los parásitos que crecen en AG (Fig. 4A; línea 3) comparado con los parásitos en RG y NG (Fig. 4A; líneas 1 y 2). Estas diferencias se corroboraron por el análisis densitométrico de los amplicones teñidos con bromuro de etidio en geles de agarosa (Fig. 4B), normalizados con el amplicon de β -*tubulina* que se utilizó como control de carga para cada condición de glucosa. Las diferencias fueron significativas ($P < 0.05$; Fig. 4B), lo que demostró que en *T. vaginalis* la expresión de los genes *vtim* se modula diferencialmente por las concentraciones de glucosa en el microambiente en el que se encuentre el parásito.

Figura 4. Expresión diferencial de los genes *tvtim* de *T. vaginalis* en diferentes condiciones de glucosa. **(A)** RT-PCR semicuantitativa utilizando oligonucleótidos específicos para los genes *tvtim1* y *tvtim2* (726 pb) y cDNA de parásitos cultivados en restricción (RG, ≤ 1 mM; línea 1), normal (NG, 25 mM; línea 2) y alta (AG, 50 mM; línea 3) concentración de glucosa. Como control interno se amplificó un fragmento del gen *β -tubulina* (*β -tub*; 112 pb) utilizando el mismo cDNA de los parásitos crecidos en las tres condiciones de glucosa. La RT-PCR (-) muestra los controles negativos en los que se utilizó RNA tratado con DNasa I o sin la enzima transcriptasa reversa (RT). El tamaño de los productos de amplificación se indica en pares de bases (pb). **(B)** Análisis densitométrico de los amplicones detectados por la tinción con bromuro de etidio después de la electroforesis en geles de agarosa al 1% en **(A)** y realizado con el software Quantity One (Bio-Rad). Las barras muestran la cantidad relativa de los transcritos *tvtim1* y *tvtim2* normalizados con los niveles de transcritos de *β -tub* para cada condición de glucosa. Las barras de error indican la desviación estándar (SD) de tres experimentos independientes. Los asteriscos (*) (***) muestran las diferencia significativas ($P < 0.05$) entre los transcritos en las tres condiciones de glucosa y determinada por el método estadístico ANOVA.

A



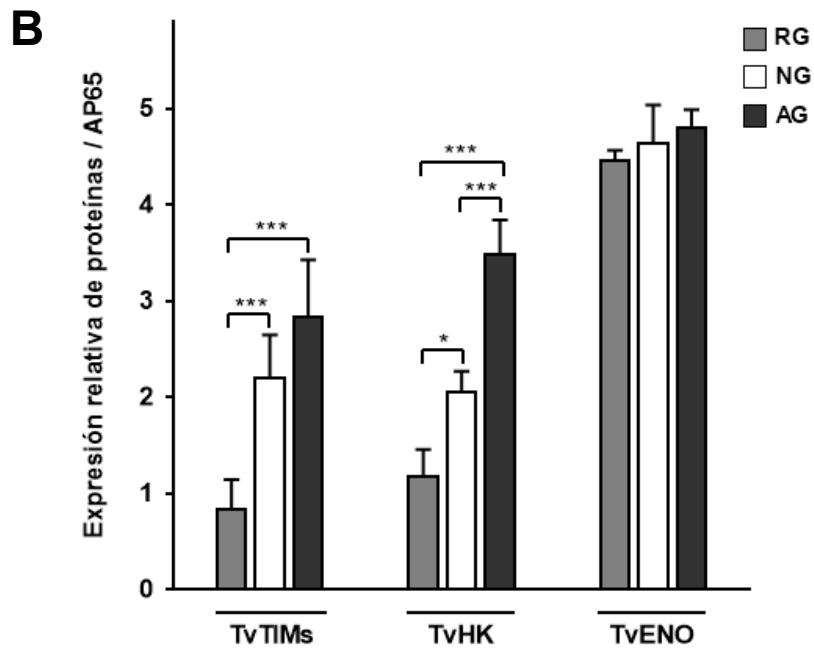
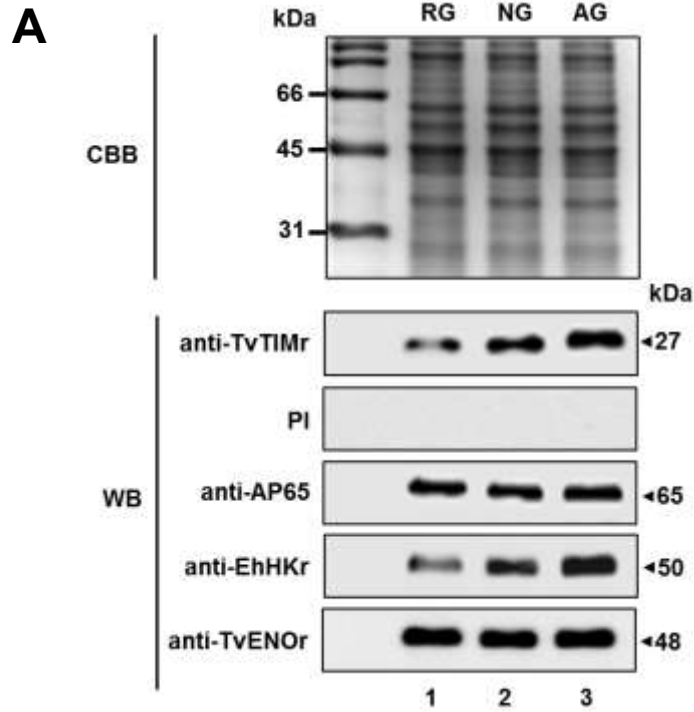
B



9.4 Expresión de las proteínas TvTIM.

Mediante ensayos de Western blot con el anticuerpo anti-TvTIMr utilizando extractos de proteínas totales de *T. vaginalis* cultivadas en diferentes concentraciones de glucosa, se observó un incremento en la cantidad de la banda de 27 kDa correspondiente a ambas proteínas TvTIM en los parásitos cultivados en NG y AG (Fig. 5A, líneas 2 y 3), comparado con los parásitos crecidos en RG (Fig. 5A, línea 1). Estas diferencias se corroboraron por el análisis densitométrico de las bandas detectadas por WB, normalizadas con la banda de AP65 utilizada como un control de carga para cada condición de glucosa (Fig. 5B), las cuales resultaron ser significativas ($P < 0.05$). Para determinar si la glucosa también afectaba la expresión de otras proteínas glucolíticas de *T. vaginalis* como hexoquinasa (TvHK) y enolasa (TvENO) que participan en las reacciones uno y nueve de la vía glucolítica, respectivamente, se realizaron ensayos de WB utilizando los mismos extractos de proteínas de parásitos cultivados en las diferentes condiciones de glucosa. Los resultados mostraron que la cantidad de proteína TvENO no cambió con respecto a la concentración de glucosa (Fig. 3A, líneas 1-3); sin embargo, similar al efecto observado con la proteína TvTIM, la cantidad de la banda de 50 kDa correspondiente a TvHK, se observó un marcado incremento en la banda de los parásitos crecidos en NG y AG (Fig. 5A, líneas 2 y 3), comparado con los parásitos en RG (Fig. 5A, línea 1). Estas diferencias se corroboraron por el análisis densitométrico (Fig. 5B) y fueron significativas ($P < 0.05$) para TvHK, pero no para TvENO. Estos datos muestran que TvTIM y TvHK, dos enzimas glucolíticas de *T. vaginalis*, son moduladas positivamente por la concentración de glucosa, mientras que TvENO y AP65/enzima málica no se afectan por los niveles de glucosa.

Figura 5. Expresión de las proteínas TvTIM de *T. vaginalis* en diferentes condiciones de glucosa. (A) Perfil de proteínas totales de parásitos crecidos en restricción (RG, ≤ 1 mM; línea 1), normal (NG, 25 mM; línea 2) y alta (AG, 50 mM; línea 3) concentración de glucosa, analizados por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12%, teñidos con azul brillante de Coomassie (CBB). Para los ensayos de WB, geles duplicados se transfirieron a membranas de NC y se incubaron con diferentes anticuerpos: anti-TvTIMr (dilución 1:1,000) que reconoció una banda de 27 kDa, correspondiente a las proteínas TvTIM nativas; anti-adhesina AP65/enzima málica (anti-AP65; dilución 1:1,500), que reconoció una banda de 65 kDa y que se utilizó como un control de carga; suero preinmune (PI) de conejo que se utilizó como control negativo; anti-hexoquinasa de *E. histolytica* (anti-EhHKr; dilución 1:1,000) que reconoció una banda de 50 kDa, correspondiente a la hexoquinasa de *T. vaginalis* (TvHK) y que se utilizó como control de regulación positiva por glucosa; anti-enolasa (anti-TvENOr; dilución 1:1,500) que reconoció una banda de 48 kDa y que se utilizó como control para la ausencia de efecto inducido por glucosa. (B) Análisis densitométrico de las bandas detectadas por WB en (A) realizado con el software Quantity One (Bio-Rad). Las gráficas de barras muestran las cantidades relativas de las proteínas TvTIM, TvHK y TvENO normalizadas con el control de carga AP65. Las barras de error indican la desviación estándar (SD) de tres experimentos independientes. Los asteriscos (*) (***) muestran las diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las bandas de proteína detectadas por WB en las tres condiciones de glucosa determinada por el método estadístico ANOVA.



9.5 Localización subcelular de TvTIM en *T. vaginalis*.

Los resultados obtenidos previamente por inmunofluorescencia indirecta utilizando el anticuerpo anti-TvTIMr y parásitos crecidos en el medio regular de cultivo (TYM) mostraron que las proteínas TvTIM se localizan principalmente en el citoplasma. Sin embargo, de manera interesante también mostraban una localización en la superficie de los parásitos en condiciones regulares de cultivo. Esto nos llevó a tener que confirmar la localización de TvTIM en la superficie de *T. vaginalis* y evaluar el efecto de la glucosa en esta segunda localización. Para ello se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo anti-TvTIMr, utilizando parásitos crecidos en diferentes concentraciones de glucosa y fijados con paraformaldehído preparado en PBS que los permeabilizó parcialmente, por lo que se observó la doble localización. La figura 6A muestra un incremento en la intensidad de fluorescencia de TvTIM (FITC; en verde) citoplasmática puntiforme que pudieran corresponder a vésiculas y asociada a la superficie de *T. vaginalis* (paneles, c, h) que colocaliza (en amarillo) con el marcador de membrana DIL (en rojo) (traslape; paneles, d, e, i y j) en los parásitos cultivados en AG (Fig.4A paneles a-j), comparado con los parásitos cultivados en RG (paneles k-ñ) que muestran una señal puntiforme verde fluorescente reducida, en el citoplasma y en la superficie de los parásitos (paneles m, n). El control negativo de parásitos en AG incubados con suero preinmune (PI) de conejo (paneles o-s) no muestra señal verde fluorescente, como se esperaba (paneles q-s).

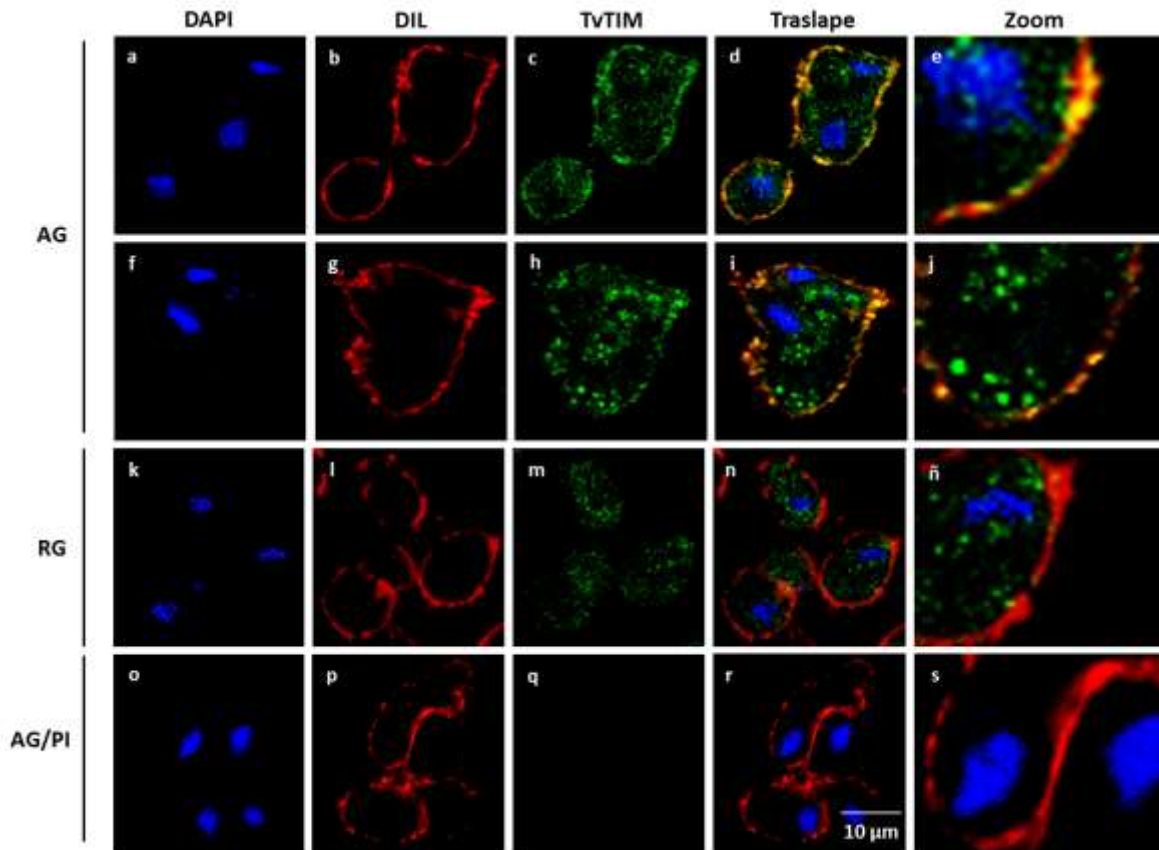
Para confirmar que la glucosa tiene un efecto en la localización de TvTIM en la superficie de *T. vaginalis*, realizamos ensayos de inmunofluorescencia indirecta utilizando parásitos cultivados primero en RG por tres días y que después se transfirieron a medio con diferentes concentraciones de glucosa ($\leq 1, 2.5, 5, 10, 25, \text{ y } 50 \text{ mM}$) durante 1 h a 37°C . La figura 6B muestra que TvTIM se localiza en la superficie de *T. vaginalis* a partir de 2.5 mM de glucosa (Fig. 6B, paneles, e-h), con puntos de colocalización en amarillo que incrementan de manera proporcional a la concentración de glucosa (Fig. 6B, paneles, h, l, p, t y x). Estos datos sugieren

que en *T. vaginalis* la expresión y localización de TvTIM en la superficie están regulados positivamente por glucosa.

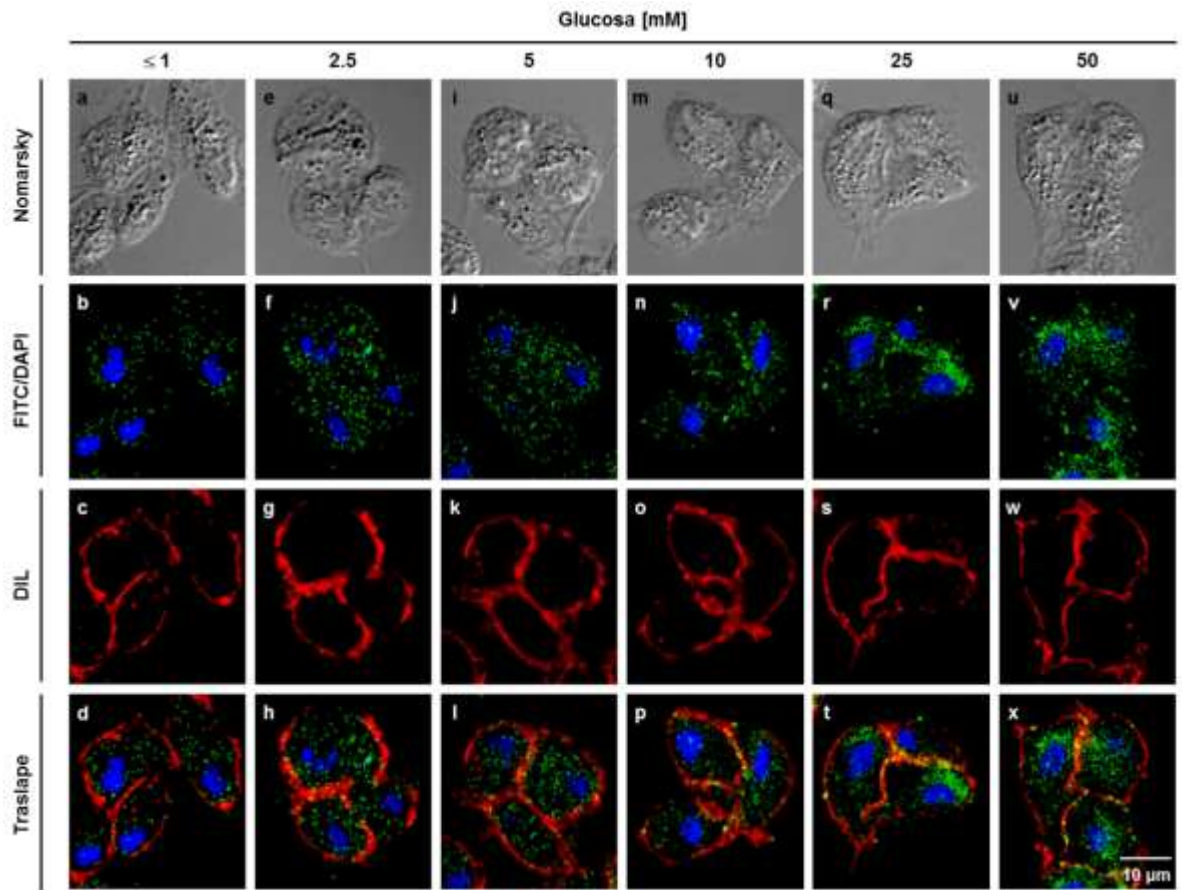
Figura 6. Localización subcelular de las proteínas TvTIM de *T. vaginalis*. (A)

Las imágenes de inmunofluorescencia indirecta y microscopía de campo claro, muestran la localización citoplasmática puntiforme, en estructuras similares a vesículas y en la superficie de parásitos cultivados en AG (Fig. 6A, paneles a-j) y RG (Fig. 6A, paneles k-ñ) durante 20 h a 37°C. Los parásitos fijados con paraformaldehído al 2% en PBS se incubaron con el anticuerpo anti-TvTIMr (dilución 1:50), seguido de un anticuerpo secundario conjugado a FITC (dilución 1:100). Como un control negativo se utilizaron parásitos en AG incubados con suero preinmune (PI) de conejo (dilución 1:50), seguido de un anticuerpo secundario conjugado a FITC (Fig. 6A, paneles o-s). **(B)** Localización de TvTIM en el citoplasma y superficie de parásitos crecidos en concentraciones crecientes de glucosa ($\leq 1, 2.5, 5, 10, 25, \text{ y } 50$ mM) durante 1 h a 37°C. Los parásitos fijados con paraformaldehído al 2% se incubaron con el anticuerpo anti-TvTIMr (dilución 1:50), seguido de un anticuerpo secundario conjugado a FITC (dilución 1:100). En ambos paneles **(A y B)**, las imágenes de microscopía confocal muestran a TvTIM marcada con FITC (en verde), los núcleos marcados con DAPI (en azul) y la membrana de los parásitos marcada con DIL (dilución 1:2,000, en rojo). Las imágenes “traslape” muestran colocalización de las marcas en amarillo de las proteínas TvTIM con la superficie de los parásitos. Tamaño de barra: 10 μm . Estos experimentos se realizaron tres veces de manera independiente con resultados similares

A



B

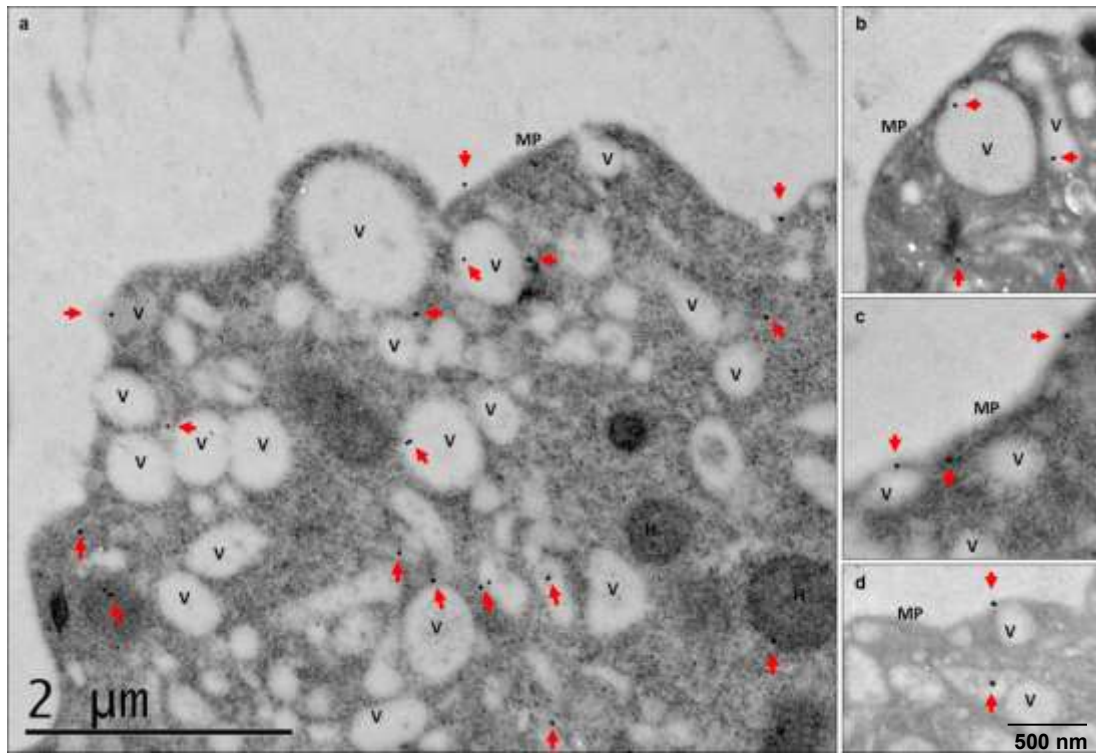


9.6 Transporte de TvTIM hacia la superficie de *T. vaginalis*.

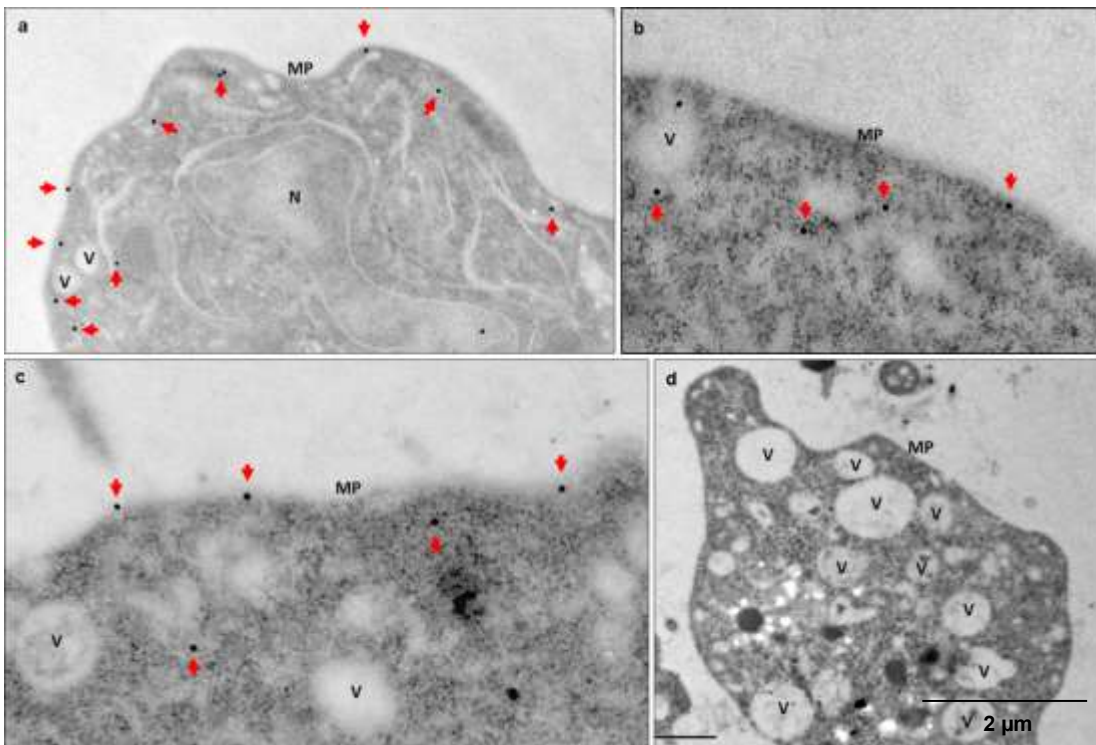
Mediante ensayos de inmunolocalización con oro por microscopía electrónica de transmisión (MET) con el anticuerpo anti-TvTIMr y parásitos cultivados en AG, exploramos las posibles vías de tráfico celular de las proteínas TvTIM hacia la membrana plasmática de *T. vaginalis*. La figura 7A muestra el inmunomarcaje con partículas de oro de TvTIM, en citoplasma, en el interior de posibles vesículas de secreción y en la membrana externa de los parásitos (Fig. 7A, panel a). También se detectó marca de TvTIM en el interior de vesículas en proceso de fusión con la membrana plasmática (MP) (Fig. 7A, panel b) y vesículas ya fusionadas con la MP donde al parecer TvTIM se está relocalizando a la MP (Fig. 7A, panel c y d). Estos resultados sugieren que TvTIM sigue una vía de transporte a la MP no convencional dependientes de vesículas. La figura 7B muestra una posible vía de tráfico de TvTIM a la MP libre de vesículas citoplasmáticas (Fig. 7B, paneles a y b). También observamos varios puntos de oro en la cara externa de la MP, corroborando la localización de TvTIM en la superficie de *T. vaginalis* (Fig. 7B, panel c). El control negativo de parásitos en AG incubados sólo con el anticuerpo secundario (Fig. 7B, panel d) no muestra partículas de oro como se esperaba. Estos resultados sugieren que TvTIM sigue una vía de transporte a la MP no convencional independientes de vesículas. Además muestran una posible vía de secreción de TvTIM en condiciones de AG y apoyan la hipótesis de que TvTIM es una proteína multifuncional con doble localización modulada positivamente por glucosa. Sin embargo sería necesario confirmar esta(s) posibles rutas a través de marcadores de organelos específicos.

Figura 7. TvTIM muestra dos posibles vías no convencionales de tráfico celular hacia la membrana plasmática en parásitos crecidos en AG. (A) Inmunomarcage de parásitos crecidos en AG incubados con el anticuerpo anti-TvTIMr (dilución 1:30) y un anticuerpo secundario conjugado a partículas de oro (10 o 12 nm). Los parásitos se analizaron por microscopía electrónica de transmisión (MET). Las imágenes de MET muestran a TvTIM marcada con oro, libre en el citoplasma (c), en vesículas (v) y en la superficie de los parásitos asociada a la membrana plasmática (MP); también muestran dos posibles rutas no convencionales de transporte a la MP. La figura 7A, muestra el transporte de TvTIM a través de vesículas de secreción y que terminan en la relocalización de TvTIM a la MP. La figura 7B, muestra puntos de localización de TvTIM cerca de la MP o en la cara externa de la MP, sugiriendo una posible vía no convencional de transporte independiente de vesículas. El control negativo de parásitos en AG incubados sólo con el anticuerpo secundario (Fig. 7B, panel d) no muestra partículas de oro como se esperaba. Las flechas apuntan a las partículas de oro. Tamaño de las barras: 2 μm , 500 nm.

A



B



9.7 Análisis *in silico* de las proteínas TvTIM.

Hasta este punto demostramos que las proteínas TvTIM a pesar de que no contienen dominios transmembranales, ni péptido señal de exporte, las encontramos asociadas a la cara externa de la membrana plasmática y a las membranas de vesículas de secreción, a través de un mecanismo aún desconocido. Para abordar la cuestión de ¿Cómo TvTIM se ancla a las membranas de *T. vaginalis*? realizamos un análisis *in silico* utilizando las secuencias de aminoácidos de las proteínas TvTIM para la búsqueda de modificaciones postraduccionales implicadas en el tráfico, secreción y asociación de proteínas a las membranas celulares. La figura 8 es una representación a escala de las proteínas TvTIM1 y TvTIM2 donde se indican los diferentes sitios putativos de modificaciones postraduccionales. Los resultados muestran que ambas proteínas TvTIM1 y TvTIM2 poseen sitios putativos de lipidación como S-palmitoilación y N-miristoilación. Estas modificaciones se han descrito como posibles responsables del anclaje de proteínas a fosfolípidos en las membranas celulares (77, 78). También se identificaron sitios potenciales para O y N-glicosilación. Estas modificaciones también están implicadas en la secreción y asociación de proteínas a membranas celulares (79, 80). Adicionalmente, se identificaron sitios potenciales de fosforilación en residuos de serina (S) y treonina (T). Estas modificaciones son comunes en enzimas metabólicas y están implicadas en la regulación de la actividad enzimática, interacción con sustratos y tráfico celular (81). La tabla 2 muestra la sumatoria de los datos generados del análisis *in silico* de las proteínas TvTIM. En esta tabla se muestra la posición y el aminoácido implicado en la modificación; todas estas modificaciones muestran un “score” por arriba del punto de corte o umbral. Estos datos sugieren posibles sitios de modificaciones postraduccionales que podrían estar implicados en el transporte, relocalización y asociación de las proteínas TvTIM a la membrana plasmática de *T. vaginalis*. Sin embargo, se requiere de datos experimentales para demostrarlo.

Figura 8. Modificaciones postraduccionales de las proteínas TvTIMs.

Representación a escala de las proteínas TvTIM1 y TvTIM2 que muestran la localización de posibles sitios para lipidación (S-palmitoilación, N-miristoilación), glicosilación (O y N-glicosilación) y fosforilación (en S y T). La búsqueda de estos sitios se realizó mediante el análisis *in silico* utilizando las secuencias completas de aminoácidos reportadas en TrichDB para TvTIM1 (TVAG_497370) y TvTIM2 (TVAG_096350). La posición de los sitios putativos de modificaciones se obtuvo a partir de los softwares en línea, GPS-lipid 1.0, CSS-Palm 4.0, NetPhos 2.0, DictyOGly 1.1 y NetNGlyc 1.1. Las regiones N-terminal (NH₂) y C-terminal (COOH) se indican para cada proteína. La representación de las diferentes modificaciones se indica en la parte superior de la figura. La sumatoria de los datos generados del análisis *in silico* se concentran en la tabla 2.

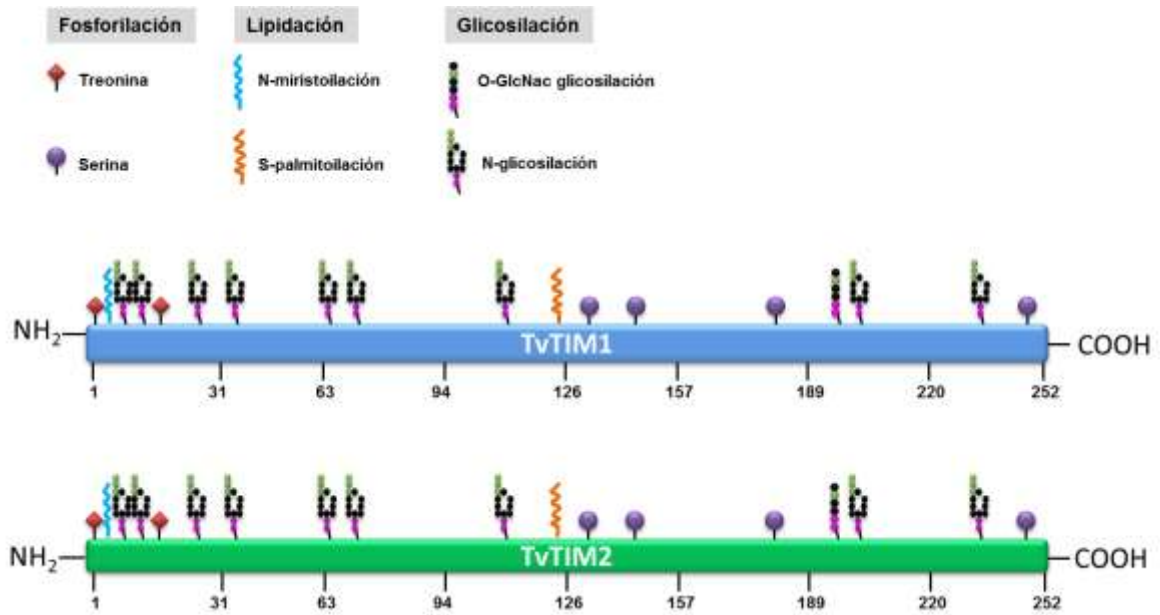


Tabla 2. Concentrado de los datos generados del análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos de la TvTIM1 y de la TvTIM2.

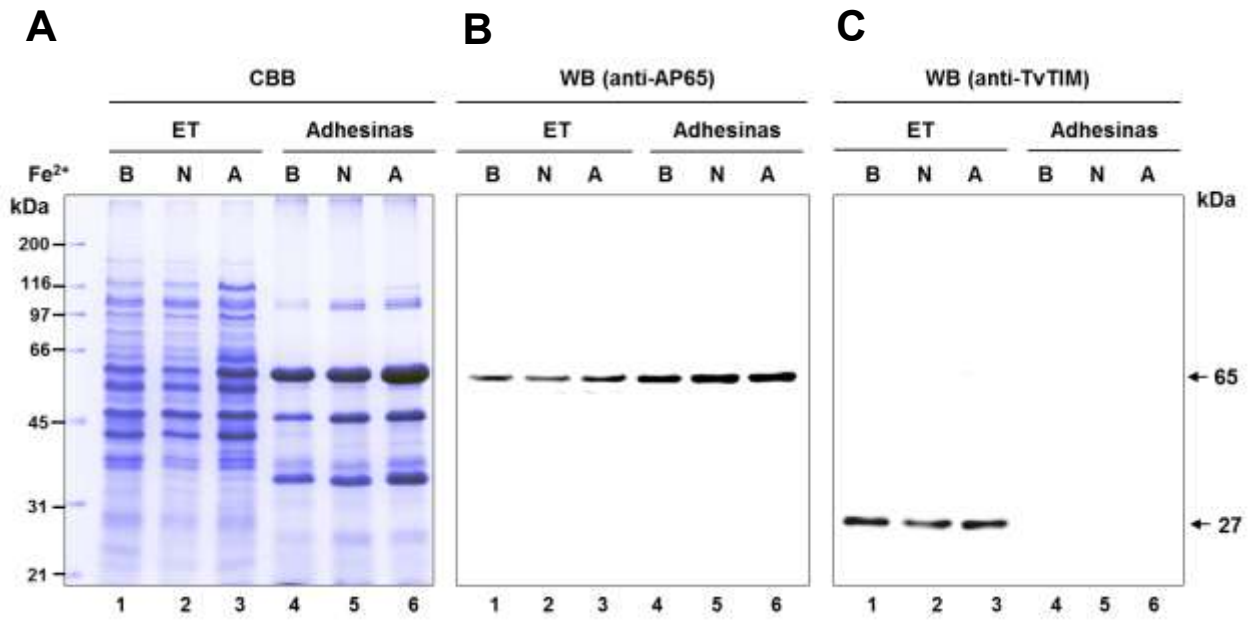
Proteína	Enzima	Tipo de modificación	Posición	Péptido (aa)	Score	Cutoff	Software	
TvTIM1	Triosafosfato isomerasa	S-palmitoilación (cluster C)	125 186	NGMKIICYCGEHLSE TQDAQEMCKVIRDIL	9.718 11.04	1.906 9.657	CSS-Palm 4.0	
		N-miristoilación	8	MRTFFVGGNWKANPK	3.505	3.172	GPS-Lipid 1.0	
		O-glicosilación	212	S	0.8821	0.5735	DictyOGly 1.1	
		N-glicosilación	9 13 28 35 64 70 118 203 243	N WKA N PKT N GAK N VEV N VFT N GAF N GMK N KVA N VN	0.6194 0.6266 0.7752 0.8024 0.6799 0.6497 0.7477 0.5882 0.6391	0.5 0.5 0.5 0.5 0.5 0.5 0.5 0.5 0.5	NetNGlyc 1.1	
		Fosforilación (T)	3 16	****MRTFFVGGNW NWKANPKTVEEAEKL	1.25 1.841	0.5 1.667	NetPhos 2.0	
		Fosforilación (S)	131 251 143 178	YCCGEHL S EREAGKA IVNSNVH S K***** GKASEFV S AQIEKMI IGTGKV S TQDAQEM	1.5 5.75 6.875 2.094	0.5 0.3 6.781 2.07	NetPhos 2.0	
		TvTIM2	Triosafosfato isomerasa	S-palmitoilación (cluster C)	125 186	NGMKIICYCGEHLSE TQDAQEMCKVIRDIL	9.718 11.04	1.906 9.657
N-miristoilación	8			MRTFFVGGNWKANPK	3.505	3.172	GPS-Lipid 1.0	
O-glicosilación	212			S	0.8821	0.5735	DictyOGly 1.1	
N-glicosilación	9 13 28 35 64 70 118 203 243			N WKA N PKT N GAK N VEV N VFT N GAF N GMK N KVA N IVN	0.6172 0.6096 0.7749 0.8038 0.6798 0.6498 0.7474 0.5882 0.6166	0.5 0.5 0.5 0.5 0.5 0.5 0.5 0.5 0.5	NetNGlyc 1.1	
Fosforilación (T)	3							

9.8 Función de TvTIM asociada a la superficie como adhesina.

Como se mencionó en la introducción varias enzimas glucolíticas han sido localizadas en la superficie de *T. vaginalis*, donde presentan una nueva función como adhesinas que median la unión directa y específica de los parásitos a receptores de superficie en la célula blanco, en condiciones de alto hierro (42). Estas evidencias nos llevaron a investigar si la TvTIM de superficie mostraba función de adhesina en condiciones de hierro. La figura 9A muestra el perfil de proteínas de *T. vaginalis* con afinidad por la superficie de células HeLa y que muestran funciones de adhesinas en las condiciones de bajo (0 μ M), normal (20 μ M) y alto (250 μ M) hierro. El gel control teñido con CBB muestra el enriquecimiento de bandas con diferentes pesos moleculares: 120 kDa (AP120), 65 kDa (AP65), 51 kDa (AP51), 33 kDa (AP33) y una banda de aproximadamente 23 kDa (AP23) que aún no había sido identificada (40) y que pensábamos que podría tratarse de la proteína TvTIM por su cercanía en peso molecular (Fig. 9A; líneas 4-6). Adicionalmente, la figura 9A, muestra el perfil de proteínas totales en las tres condiciones de glucosa, antes de la interacción con células HeLa, y que se utilizó como un control para el WB (Fig. 9A; líneas 1-3). Los resultados de WB con el anticuerpo anti-AP65 muestran el reconocimiento de una banda de 65 kDa en los extractos de proteínas totales (Fig. 9B; líneas 1-3) que corresponde a la adhesina AP65 presente en los ensayos de ligando-adhesina y que además muestra un ligero incremento en la cantidad de proteína unida a las células HeLa, conforme incrementa la concentración de hierro (Fig. 9B; líneas 4-6). Por otro lado, el anticuerpo anti-TvTIMr muestra el reconocimiento de una banda de 27 kDa en los extractos de proteínas totales (Fig. 9C; líneas 1-3) que desaparece en los ensayos de ligando-adhesina realizados bajo las diferentes condiciones de hierro (Fig. 9A; líneas 4-6). Estos resultados sugieren que las proteínas TvTIM no muestran afinidad por la superficie de células HeLa en las condiciones de hierro analizadas. Por lo tanto, no presenta una función como adhesina de superficie en *T. vaginalis*, comparada con el control de la adhesina AP65 previamente reportada (82). Con estos resultados quedaba sin resolver la pregunta ¿Cuál es la función de TvTIM en la superficie de *T. vaginalis*? Sin embargo, surgía la posibilidad de

investigar la función de TvTIM de superficie como un receptor para componentes de matriz extracelular, una función previamente reportado para otras enzimas glucolíticas de superficie tales como, la alfa-enolasa (TvENO) y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (TvGAPDH) (43, 44).

Figura 9. Las proteínas TvTIM de *T. vaginalis* no presentan función de adhesinas. **(A)** Perfil de proteínas totales (ET, líneas 1, 2 y 3) y ensayo de ligando-adhesinas (líneas 4, 5 y 6) utilizando extractos de parásitos crecidos en diferentes concentraciones de hierro: bajo (BH, 0 μ M; línea 1 y 4), normal (NH, 20 μ M; línea 2 y 5) y alto (AH, 250 μ M; línea 3 y 6) hierro, analizados por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12% y teñidos con azul brillante de Coomassie (CBB). **(B)** Para los ensayos de WB, geles duplicados a partir de **(A)**, se transfirieron a membranas de NC y se incubaron con los anticuerpos: anti-adhesina AP65 (anti-AP65; dilución 1:1,500) que reconoció una banda de 65 kDa en ET (líneas 1-3) y en adhesinas (líneas 4-6) y que se utilizó como un control positivo de adhesina. **(C)** Una membrana adicional se incubó con el anticuerpo anti-TvTIMr (dilución 1:1,000) que reconoció una banda de 27 kDa correspondiente a las proteínas TvTIM nativas en ET (líneas 1-3), pero que desaparece en las adhesinas (líneas 4-6). Las bandas detectadas por WB en **(B y C)** se visualizaron con el software Quantity One (Bio-Rad). Estos experimentos se realizaron al menos tres veces de manera independiente.



9.9 Función de TvTIM como receptor de MEC.

Otra posible función de TvTIM en la superficie es como receptor de componentes de matriz extracelular (MEC) como se ha reportado para otros patógenos. Por ello, decidimos evaluar la función de TvTIM de superficie como receptor de MEC y otros ligandos mediante ensayos de afinidad a ligando Far-Western blot (FWB). En estos ensayos realizamos interacciones *in vitro* proteína-proteína utilizando a las proteínas recombinantes TvTIM1r y TvTIM2r como posibles receptores para los ligandos laminina (Lm), fibronectina (Fn), plasminógeno (Plg) o ppTvCP4r (una proteína no relacionada utilizada como control negativo) (Fig. 10). Las interacciones específicas de TvTIM con Lm, Fn, Plg o ppTvCP4 se detectaron por WB utilizando los anticuerpos correspondientes: anti-Lm, anti-Fn, anti-Plg o anti-ppTvCP4r, observando una interacción positiva con la aparición de una banda reactiva. Las figuras 10A y B muestran que TvTIM1r y TvTIM2r se unen a Lm (línea 7), Fn (línea 8), pero no a Plg (línea 9) o ppTvCP4r (línea 10), a pesar de que el control positivo TvENOr mostró una interacción positiva para Plg (Fig. 10C; línea 8) y el control negativo ppTvCP4r no mostró interacción cuando se incubó con los diferentes ligandos probados (Fig. 10D; líneas de 6-8). Los controles positivos de WB se incubaron directamente con los anticuerpos anti-TvTIMr, anti-TvENO o anti-ppTvCP4r (Figs. 10A-D; línea 2), respectivamente. Los controles negativos adicionales (Figs. 10A y B, líneas 3-6; Figs. 10C y D, líneas 3-5, respectivamente) demostraron que los anticuerpos primarios utilizados para el reconocimiento específico de los ligandos por WB (Fig. 10F, líneas 4-6), no mostraron reactividad cruzada con las proteínas recombinantes utilizadas (TvTIM1r, TvTIM2r, TvENOr y ppTvCP4r). Tampoco los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa reaccionaron con las proteínas Lm, Fn y Plg (Figura 10F, líneas 7-9).

Para confirmar la unión específica de las proteínas recombinantes TvTIMs a Lm y Fn, así como la ausencia de unión a Plg, realizamos ensayos de unión Dot-blot (Fig. 11). Para ello, cantidades crecientes (0-4 µg) de TvTIM1r (Fig. 11A) y TvTIM2r (Fig. 11B) se inmovilizaron en membranas de NC y se incubaron con los diferentes ligandos (Lm, Fn o Plg; todos a 30 µg/ml). Similar al FWB, las

interacciones proteína-proteína se detectaron por WB utilizando los anticuerpos correspondientes (anti-Lm, anti-Fn, o anti-Plg). La figura 11 muestra la unión concentración dependiente de TvTIM1r y TvTIM2r a Lm y Fn pero no a Plg, la cual se corroboró por el análisis densitométrico de los “spots” en negro detectados por WB (Fig. 11A y B). Como controles positivos TvTIM1r y TvTIM2r se incubaron directamente con el anticuerpo anti-TvTIMr. Además, la ausencia de unión a Plg (Fig. 11A y B) se confirmó utilizando el doble de Plg (60 µg/ml) y la unión se comparó con la reacción positiva de TvENOr utilizada como control positivo adicional para la unión a Plg. Estos resultados se corroboraron por análisis densitométrico de los spots (en negro) detectados por WB con el anticuerpo anti-Plg (Fig. 11C). Para evaluar la especificidad de la unión se utilizó a la TvCP4r, una proteína no relacionada, que se incubó con los tres ligandos (Lm, Fn y Plg) y con los anticuerpos correspondientes (anti-Lm, anti-Fn o anti-Plg). Los resultados mostraron que ninguna de las tres proteínas ligando, se unió a TvCP4r (Fig. 11D). En conjunto, estos datos demuestran la capacidad de ambas proteínas TvTIM para unir específicamente y de manera concentración dependiente a Lm y Fn. Por lo que podrían funcionar en la superficie de *T. vaginalis* como receptores para Lm y Fn. Por lo tanto, nuestro próximo objetivo fue determinar si TvTIM asociada a la superficie del parásito modula la unión de *T. vaginalis* a Lm y Fn en las diferentes condiciones de glucosa.

Figura 10. Unión de las proteínas recombinantes TvTIM a proteínas de matriz extracelular (MEC). Para los ensayos de Far-Western blot, 1 μ g de las proteínas recombinantes TvTIM1r (**A**), TvTIM2r (**B**), TvENOr (**C**) y ppTvCP4r (**D**), se separaron por SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de NC y se incubaron con 30 μ g/ml de laminina (Lm) (páneos **A** y **B**, línea 7; páneos **C** y **D**, línea 6), fibronectina (Fn) (paneles **A** y **B**, línea 8; páneos **C** y **D**, línea 7), plasminógeno (Plg) (páneos **A** y **B**, línea 9; páneos **C** y **D**, línea 8) o ppTvCP4r (páneos **A** y **B**, línea 10). Las interacciones específicas proteína-proteína se detectaron por WB usando los anticuerpos correspondientes (dilución 1:1,000): anti-Lm (páneos **A** y **B**, líneas 3 y 7; páneos **C** y **D**, líneas 3 y 6), anti-Fn (páneos **A** y **B**, líneas 4 y 8; páneos **C** y **D**, líneas 4 y 7), anti-Plg (páneos **A** y **B**, líneas 5 y 9; páneos **C** y **D**, líneas 5 y 8), o anti-ppTvCP4r (páneos **A** y **B**, líneas 6 y 10). Los controles positivos (+ línea 2) se incubaron con el anticuerpo anti-TvTIMr, anti-TvENOr o anti-ppTvCP4r correspondiente. Los controles del patrón de las proteínas teñidos con CBB se muestran en la línea 1. La proteína recombinante TvENOr (TVAG_32460) se utilizó como un control positivo para la interacción con Plg (panel **C**, línea 8). Los controles negativos se obtuvieron por la incubación de la proteína recombinante no relacionada ppTvCP4r (**D**) con Lm (línea 6), Fn (línea 7) y Plg (línea 8) y los anticuerpos correspondientes. Controles negativos adicionales (páneos **A** y **B**, líneas 3-6; o páneos **C** y **D**, líneas 3-5) se obtuvieron por incubación directa de las proteínas recombinantes probadas, con los diferentes anticuerpos usados. Controles de especificidad se obtuvieron por incubación directa de Lm, Fn y Plg, con los anticuerpos anti-Lm, anti-Fn y anti-Plg (panel **F**, líneas 4-6, respectivamente), o directamente con los anticuerpos secundarios de cabra anti-conejo acoplado a peroxidasa (panel **F**, líneas 7 y 8) y burro anti-cabra-peroxidasa (panel **F**, línea 9). Las bandas reactivas se detectaron por WB y se visualizaron con el software Quantity One (Bio-Rad). Estos experimentos se realizaron tres veces de manera independiente con resultados similares.

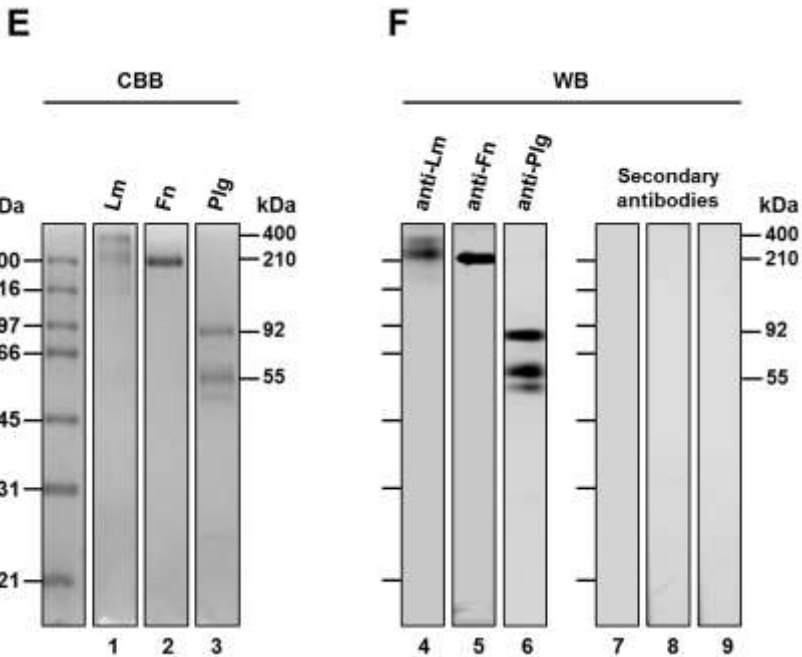
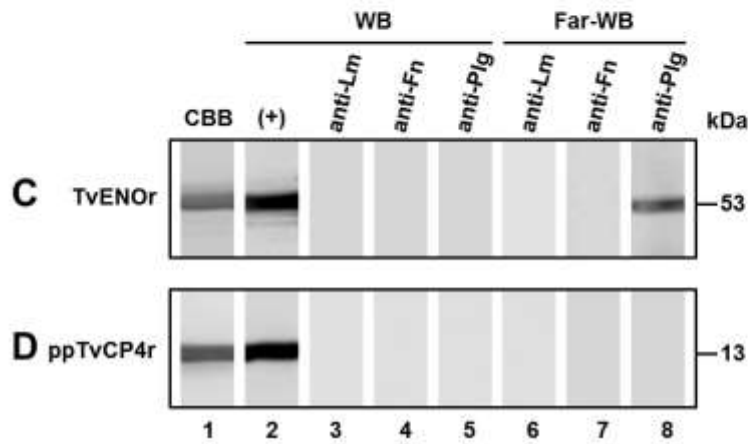
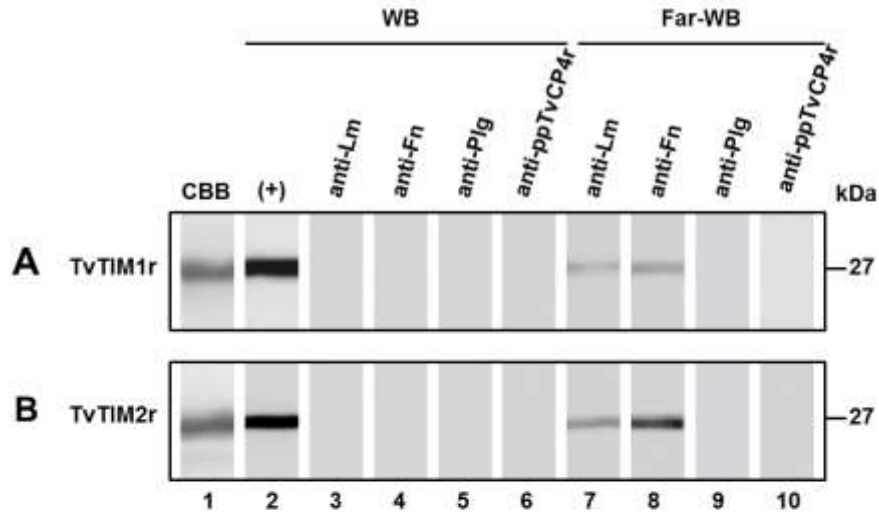
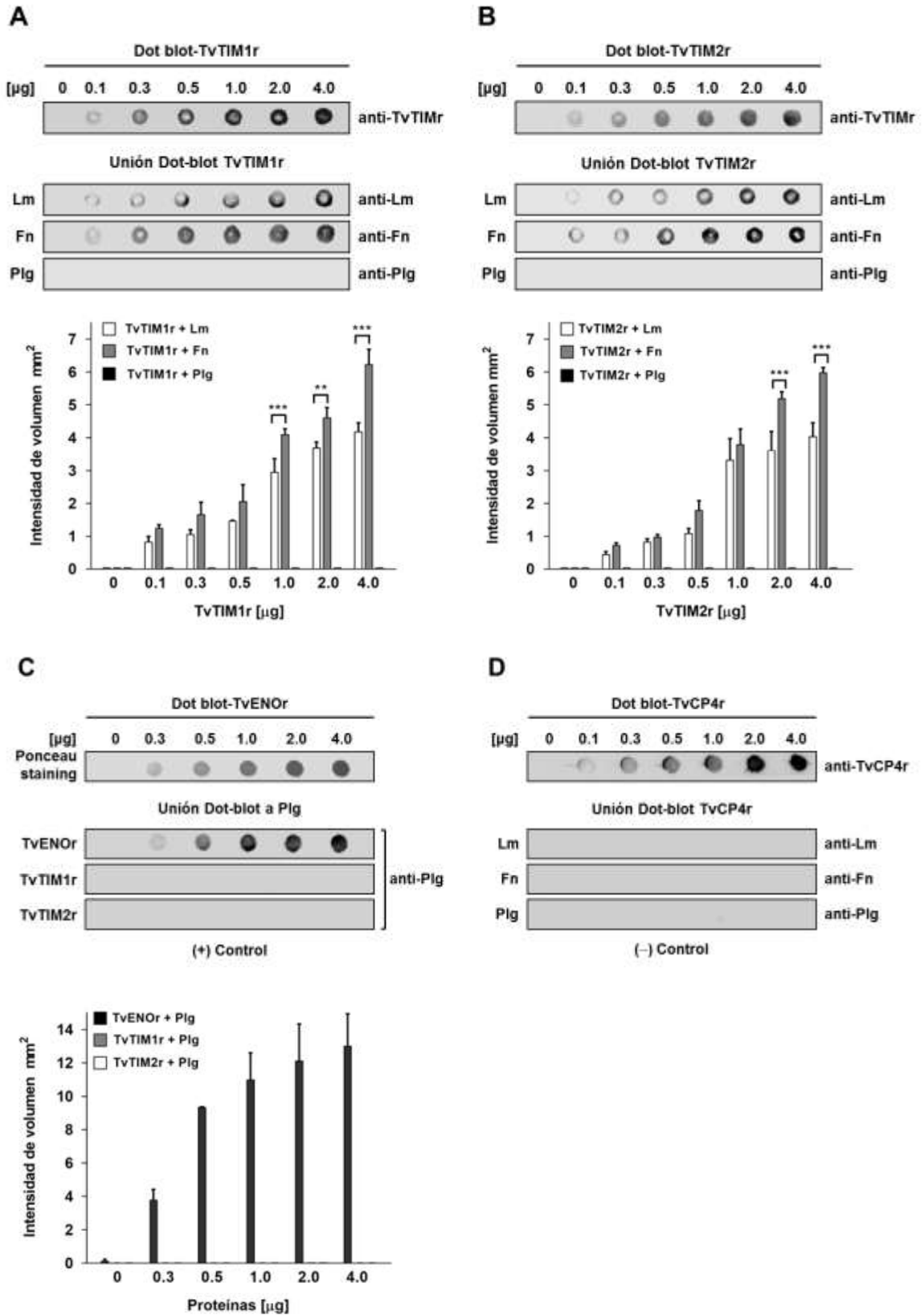


Figura 11. Unión concentración dependiente de las proteínas recombinantes TvTIM a Lm y Fn. Ensayos de unión Dot-blot para confirmar la unión específica de las proteínas recombinantes TvTIM a Lm y a Fn, pero no a Plg. Cantidades crecientes (0-4 μg) de TvTIM1r (**A**) y TvTIM2r (**B**) se inmovilizaron en membranas de NC y se incubaron con 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Lm, Fn y Plg. La unión específica proteína-proteína se detectó por WB con los anticuerpos anti-Lm, anti-Fn y anti-Plg, respectivamente, seguido de los anticuerpos secundarios correspondiente. La intensidad de los puntos en negro indica una interacción positiva. Las gráficas de barras muestran los resultados del análisis densitométrico para cada punto en volumen de intensidad mm^2 que se realizó con el software Quantity One (Bio-Rad). La unión TvTIMr-Lm se muestra en barras blancas, TvTIMr-Fn en barras grises y la ausencia de unión de TvTIMr a Plg en barras negras. Como control positivo de Dot-blot las proteínas TvTIM1r y TvTIM2r se incubaron directamente con el anticuerpo anti-TvTIMr seguido de un anticuerpo secundario. (**C**) Diferentes cantidades (0-4 μg) de TvENOr (control positivo), TvTIM1r y TvTIM2r se inmovilizaron en membranas de NC y se incubaron con 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Plg para TvENOr, o 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Plg para TvTIM1r y TvTIM2r. La unión de Plg se detectó por WB con el anticuerpo anti-Plg como puntos en negros. La gráfica muestra el análisis densitométrico de los puntos en negro de la unión positiva a TvENOr-Plg en barras negras y la ausencia de unión de Plg a TvTIM1r y TvTIM2r se muestra en barras grises y blancas, respectivamente. (**D**) Diferentes cantidades (0-4 μg) de TvCP4r (una proteína recombinante no relacionada), se incubaron con Lm, Fn y Plg (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y la unión se detectó por WB con los anticuerpos (anti-Lm, anti-Fn o anti-Plg, respectivamente). La ausencia de unión entre TvCP4r con Lm, Fn o Plg se utilizó como un control negativo. El control positivo muestra el WB de TvCP4r incubada directamente con el anticuerpo α -TvCP4. Las barras de error indican la desviación estándar (DS) determinada a partir de tres experimentos independientes. Los asteriscos (**) (***) muestran las diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los puntos detectados por WB determinada por ANOVA.



9.10 Adhesión de *T. vaginalis* a Lm y Fn inmovilizada.

Mediante ensayos de adhesión celular con parásitos vivos evaluamos el efecto de la glucosa sobre la adhesión de *T. vaginalis* a Lm y Fn inmovilizadas. Para ello, parásitos crecidos en las tres condiciones de glucosa (RG, NG y AG) y marcados con Cell Tracker Blue (reactivo fluorescente) se incubaron con Lm, Fn o BSA (una proteína no relacionada usada como control de especificidad), todas inmovilizadas en placas de 96 pozos (transparentes). Las imágenes de microscopía óptica muestran un mayor número de parásitos adheridos a Lm (Fig. 12A) y Fn (Fig. 12B) cuando se cultivaron en NG y AG, comparado con los cultivados en RG. Aunque se observó un cierto grado de adhesión de los parásitos a BSA, el número de parásitos adheridos a BSA se mantuvo sin cambios significativos en las diferentes condiciones de glucosa. Estos resultados se corroboraron mediante la cuantificación de la fluorescencia total de los parásitos adheridos a Lm, Fn y BSA. Las gráficas de barras (Figs. 12C y D) muestran el incremento en unidades relativas de fluorescencia (URF) de los parásitos adheridos a Lm, Fn, pero no a BSA, con respecto a la concentración de glucosa. En conjunto, estos resultados muestran que los niveles más altos de adhesión a Lm y Fn se observaron en los parásitos crecidos en alta glucosa; estas diferencias en la adhesión fueron significativas ($P < 0.05$). Además demuestran la presencia de moléculas de superficie que median la unión de los parásitos a Lm y Fn en las condiciones de glucosa analizadas.

9.11 Inhibición de la adhesión de *T. vaginalis* a Lm y Fn.

Como lo demostramos la cantidad y localización de las proteínas TvTIM de superficie son moduladas positivamente por glucosa, y sumado a los resultados de los ensayos de adhesión donde la mayor adhesión a Lm y Fn se observó en la condición de AG, nos preguntamos si TvTIM de superficie podría estar participando como receptor de Lm y Fn. Para demostrarlo, realizamos ensayos de inhibición de la adhesión de parásitos vivos con el anticuerpo anti-TvTIMr. Como se observó en las figuras 6 y 12, tanto la localización de TvTIM en la superficie, como el máximo

de adhesión de parásitos vivos a Lm y Fn ocurrió en altas concentraciones de glucosa. Por lo tanto, en estos ensayos utilizamos parásitos crecidos en AG previamente marcados con Cell Tracker Blue los cuales se preincubaron con concentraciones crecientes (0-400 $\mu\text{g/ml}$) de IgGs anti-TvTIMr antes de la interacción con Lm y Fn. De manera similar, IgGs del suero PI de conejo y de un anticuerpo anti-ppTvCP4r no relacionado se utilizaron como controles negativos. Después de 30 min de interacción a 37°C entre los parásitos pretratados y las proteínas utilizadas, se cuantificó la fluorescencia total de los parásitos adheridos a Lm o Fn y se comparó con los valores de adhesión de los parásitos sin tratamiento, (IgGs-0 $\mu\text{g/ml}$) que se tomaron como el 100% de adhesión a Lm y Fn. La figura 12A y B muestra que el anticuerpo anti-TvTIMr inhibió de manera específica la unión de *T. vaginalis* a Lm y Fn inmovilizadas de manera concentración dependiente. Sin embargo, no observamos una inhibición similar ni con el anticuerpo anti-ppTvCP4r ni con el suero PI. En ambos casos, 400 $\mu\text{g/ml}$ de las IgGs anti-TvTIMr resultó en la máxima inhibición de la adhesión de *T. vaginalis* a Lm y Fn (43.8% y 53.5% de inhibición, respectivamente), indicando que el anticuerpo anti-TvTIMr bloqueó de manera específica la unión de TvTIM en la superficie de tricomonas a estas proteínas de MEC.

Para confirmar la capacidad de la proteína TvTIM localizada en la superficie de *T. vaginalis* para mediar la unión a Lm y Fn, se realizaron ensayos de competencia por ligando, utilizando las proteínas recombinantes TvTIM purificadas. Con este fin, placas de 96 pozos recubiertas con Lm y Fn se preincubaron con cantidades crecientes (0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 y 1.6 μg) de TvTIM1r o TvTIM2r, antes de la interacción con parásitos vivos. De manera similar, cantidades crecientes de ppTvCP4r se usaron como controles negativos de especificidad. Parásitos crecidos en condiciones de AG previamente marcados con Cell Tracker Blue se agregaron a los pozos cubiertos con las proteínas, se incubaron durante 30 min a 37°C y se midió la emisión de fluorescencia de los parásitos adheridos y se comparó con los valores obtenidos de los parásitos adheridos a los pozos recubiertos con Lm o Fn sin tratamiento que se tomaron como 100% de adhesión a las proteínas MEC. La figura 13 muestra que TvTIM1r (Fig. 13C) y TvTIM2r (Fig.

13D) bloquearon la unión de *T. vaginalis* a Lm y Fn, compitiendo por el ligando (Lm y Fn) de manera concentración dependiente. Por el contrario, la proteína ppTvCP4r no mostró competencia como se esperaba. La figura 13C muestra que 1.6 µg de TvTIM1r o TvTIM2r inhibieron la unión de *T. vaginalis* a Lm en 39% y 47%, respectivamente, confirmando la participación de TvTIM en la unión a laminina cuando se encuentra en la superficie de tricomonas. La Fig. 13D muestra que 1.6 µg de TvTIM1r o TvTIM2r, inhibieron la unión de *T. vaginalis* a Fn 47% y 60%, respectivamente. Estos resultados fueron consistentes con la inhibición de la adhesión del anticuerpo anti-TvTIMr (Figs. 13 A y B); además confirman el rol de las proteínas TvTIM de superficie en la unión de *T. vaginalis* a Lm y Fn en AG.

Figura 12. La glucosa promueve la adhesión de *T. vaginalis* a Lm y Fn. Ensayos de adhesión de parásitos vivos (5×10^5 células/ pozo) crecidos en las tres condiciones de glucosa (RG, NG y AG) y marcados con Cell Tracker Blue se incubaron en placas de 96 pozos recubiertas con Lm, Fn o BSA (2 μ g) 30 min a 37°C. **(A y B)** Las imágenes de microscopía óptica muestran parásitos adheridos a Lm **(A)** y Fn **(B)** dependiente de las diferentes concentraciones de glucosa en las que se cultivaron a los parásitos. El número de parásitos adheridos se estimó indirectamente por la medición de la fluorescencia a 466 nm utilizando un espectrofluorómetro Gemini EM. Las gráficas de barras muestran las unidades relativas de fluorescencia (URF) de los parásitos adheridos a Lm **(C, barras negras)** o Fn **(D, barras negras)** en las tres condiciones de glucosa. Los controles negativos de especificidad (barras blancas) se obtuvieron de parásitos adheridos a pozos recubiertos con BSA en las tres condiciones de glucosa. Las barras de error indican la desviación estándar (DS) determinada a partir de tres experimentos independientes. Los asteriscos **(**)** **(***)** muestran las diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los parásitos adheridos en cada condición de glucosa determinada por ANOVA.

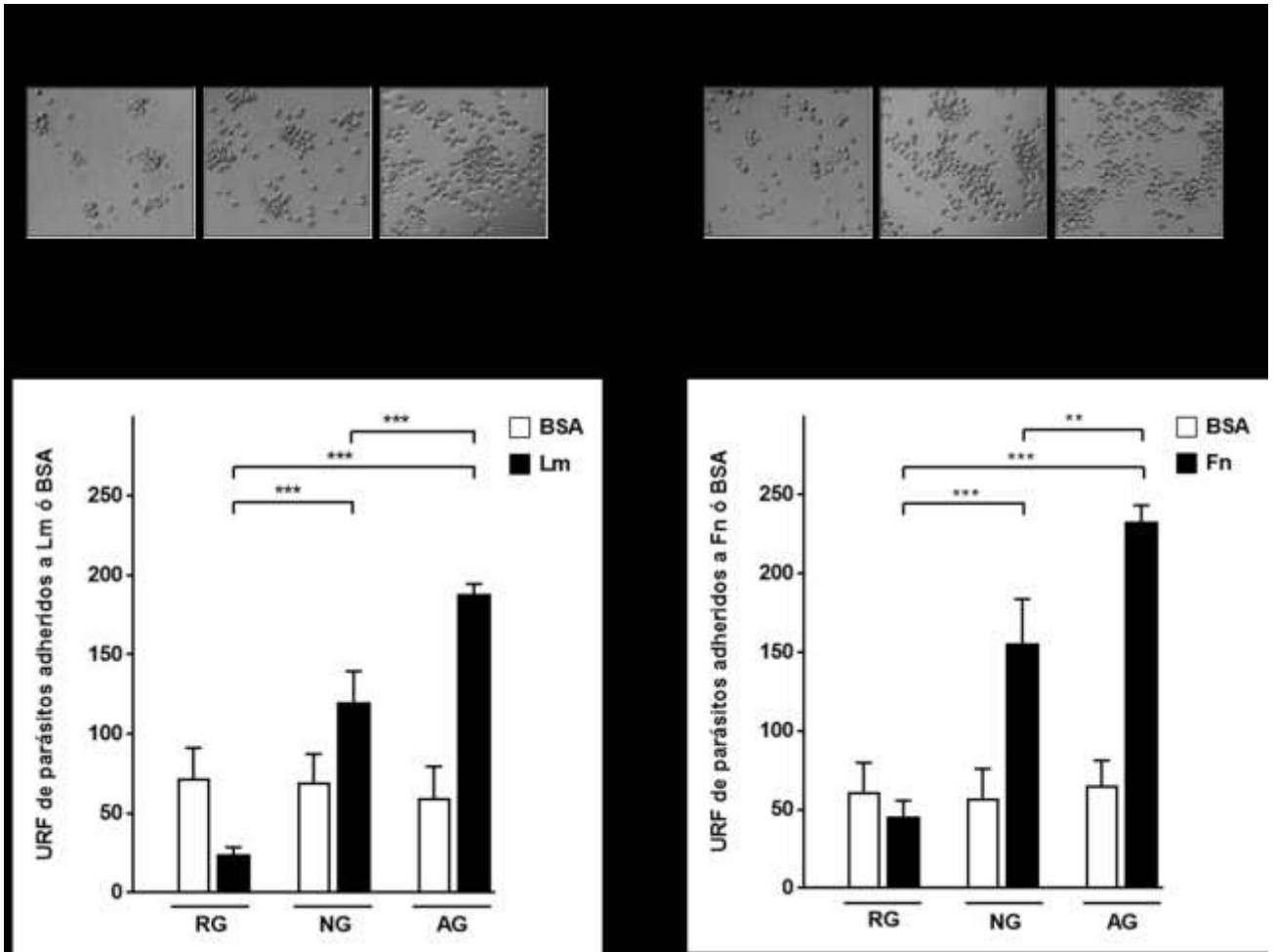
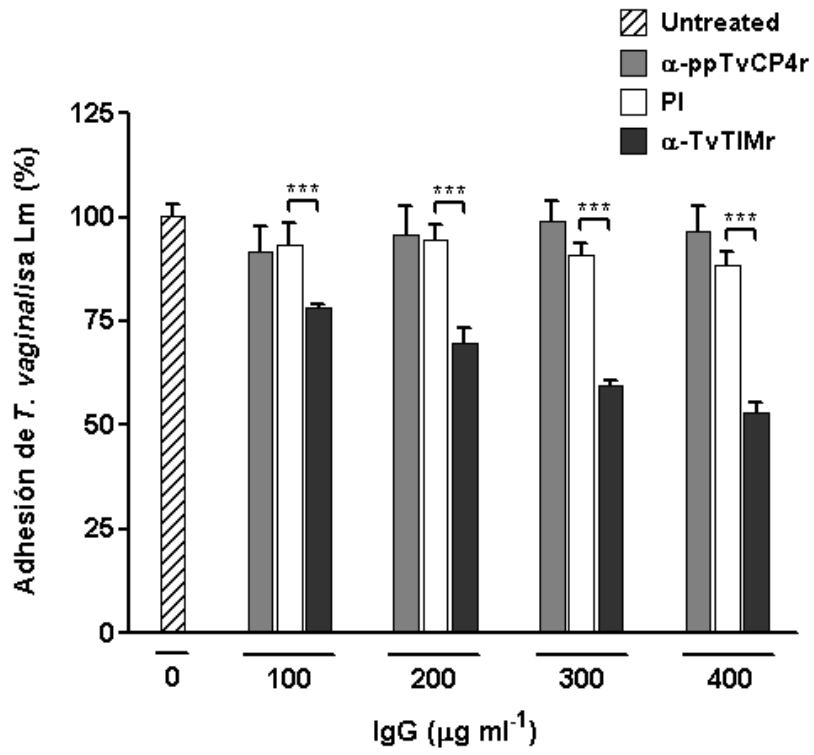
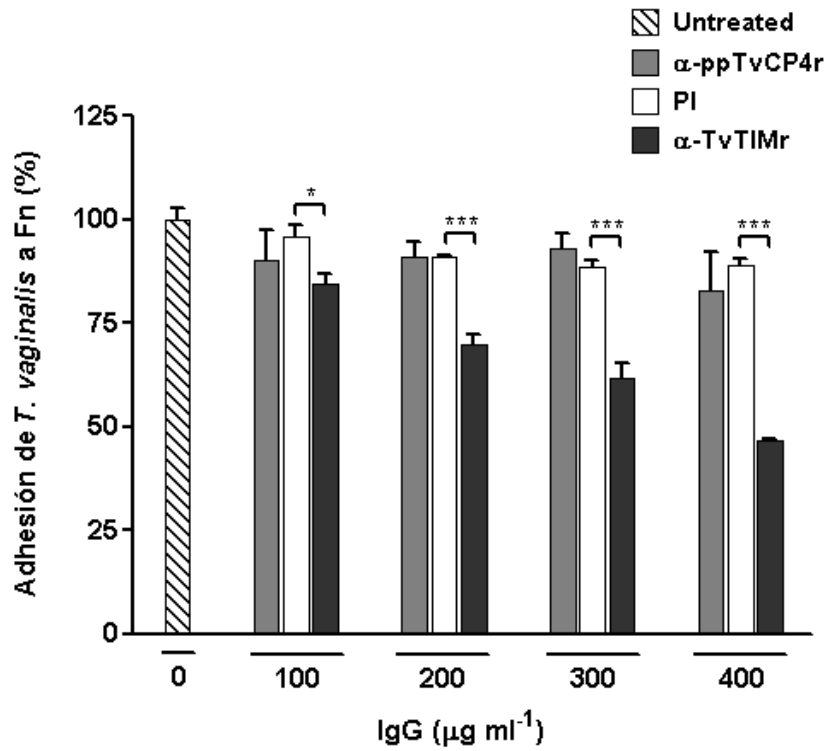


Figura 13. Inhibición de la adhesión *T. vaginalis* a Lm y Fn. (A y B) Inhibición de la adhesión de *T. vaginalis* por el anticuerpo (Ac) anti-TvTIMr. Parásitos vivos (5×10^5 células/pozo) crecidos en condiciones de AG (50 mM) y marcados con Cell Tracker Blue se preincubaron con diferentes concentraciones (0-400 $\mu\text{g/ml}$) de IgGs del Ac anti-TvTIMr (barras negras), suero PI (barras blancas), o del Ac α -ppTvCP4r (barras grises) antes de la interacción con Lm (A) o Fn (B) inmovilizada 30 min a 37°C. La emisión de fluorescencia de los parásitos adheridos a Lm y Fn se determinó en un espectrofluorómetro y los valores se graficaron. La unión directa de parásitos marcados con CTB sin tratamiento se tomó como 100% de unión a Lm (A) y Fn (B), con valores absolutos de 171.74 y 209.48 URF, respectivamente (barras rayadas). IgGs de suero PI y del Ac anti-ppTvCP4r no relacionado, se utilizaron como controles negativos. Las gráficas de barras muestran las medias de los porcentajes de adhesión obtenidos de tres experimentos independientes. Las barras de error indican la desviación estándar (SD) y los asteriscos (*) (***) muestran las diferencias significativas ($P < 0.05$) determinadas por ANOVA. (C y D) Inhibición de la adhesión de *T. vaginalis* por competencia con las proteínas recombinantes TvTIM. Las placas recubiertas con Lm o Fn se preincubaron con diferentes cantidades (0-1.6 μg por pozo) de TvTIM1r (Δ), TvTIM2r (\bullet), o ppTvCP4r (\blacksquare) como control negativo, antes de la interacción por 30 min a 37°C con parásitos vivos crecidos en AG y marcadas con CTB. La emisión de fluorescencia de los parásitos adheridos a Lm (C) y Fn (D) se determinó en un espectrofluorómetro y los valores se graficaron. Los porcentajes de adhesión se calcularon comparando con el 100% de adhesión a Lm y Fn de parásitos vivos sin tratamiento, marcados con CTB (con valores absolutos de 171.74 y 209.48 URF, respectivamente). Los puntos en las gráficas (C y D) representan las medias de los porcentajes de adhesión de parásitos adheridos a Lm y Fn en presencia de un competidor (TvTIM1r, TvTIM2r, o ppTvCP4r). Las barras de error indican la desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes determinada por ANOVA.

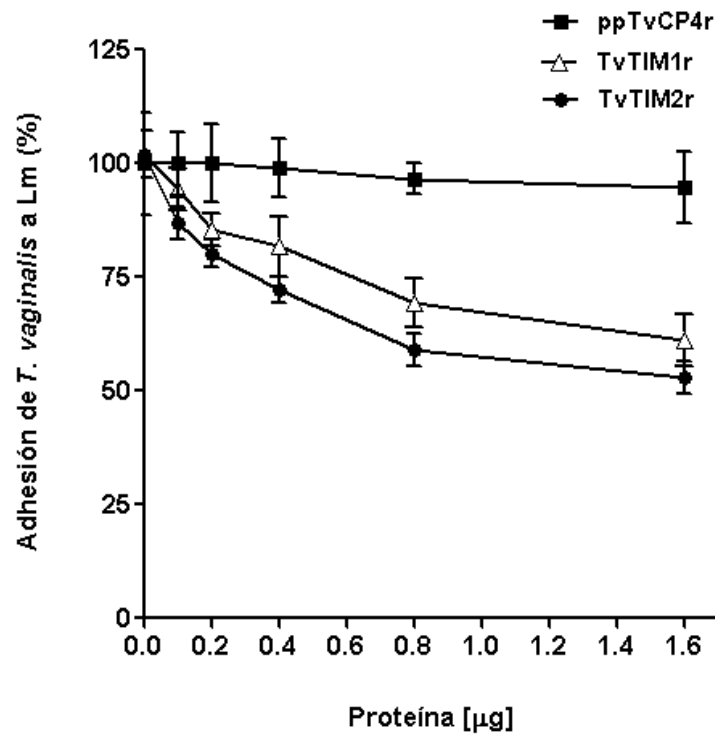
A



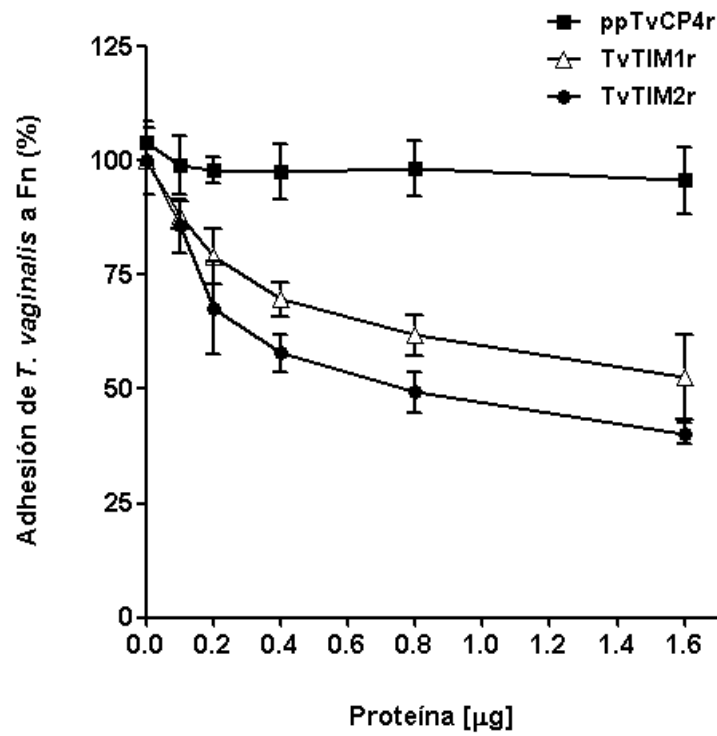
B



C



D



9.12 Secreción *in vitro* de las proteínas TvTIM.

Como se demostró en la figura 7, TvTIM sigue una vía no convencional de tráfico dependiente o independiente de vesículas de secreción para relocalizarse a la membrana plasmática en AG. Con estos resultados surgió la pregunta de si *T. vaginalis* además de localizar a TvTIM en la superficie, también la libera al medio extracelular en presencia de glucosa. Por lo que se realizaron ensayos de secreción *in vitro* de parásitos vivos en RG y AG. La figura 14A muestra el perfil de proteínas de los productos de secreción (PS) de parásitos en RG (línea 1) y AG (línea 3); en ambos PS se observaron proteínas en la región de 27 kDa que podrían corresponder a las proteínas TvTIM de *T. vaginalis*. Adicionalmente, se obtuvieron los extractos de proteínas totales (ET) de parásitos en ambas condiciones de glucosa RG (línea 2) y AG (línea 4), los cuales se utilizaron como controles positivos. Para evaluar la presencia de las proteínas TvTIMs en los PS, geles por duplicado de (A) se transfirieron a membranas de NC y se analizaron por ensayos de WB con el anticuerpo anti-TvTIMr. La figura 14B muestra los resultados de un ensayo de WB representativo de los PS y ET en el que se observó el reconocimiento de una banda de 27 kDa en los PS de parásitos de AG (Fig. 14B, línea 3) que no se detectó en los PS de parásitos en RG (Fig. 14B, línea 1), demostrando la ausencia de proteína TvTIM en los mismos. El anticuerpo anti-EhHKr reconoció una banda de 50 kDa de TvHK solo en los ET ya que no hubo reactividad en los PS de parásitos en RG (línea 1) y AG (línea 3), demostrando que TvHK, es una proteína que no se secreta por *T. vaginalis* por lo que se utilizó como control negativo de secreción; mientras que el anticuerpo anti-TvCP4r reconoció una banda de 24 kDa de la proteínasa TvCP4 de *T. vaginalis* tanto en ET como en PS de ambas condiciones de glucosa (RG, línea 1 y AG, línea 3), por lo que se utilizó como un control positivo de secreción, ya que se sabe que TvCP4 es una proteína secretada por *T. vaginalis* independientemente de la concentración de glucosa. Como un control positivo de WB los mismos anticuerpos (anti-TvTIMr, anti-EhHKr y anti-TvCP4r) se incubaron con los ET en ambas condiciones de glucosa, observándose el reconocimiento específico de las bandas esperadas (Fig. 14B, líneas 2 y 4). Estos resultados demostraron la

secreción *in vitro* de las proteínas TvTIM de *T. vaginalis* en altas concentraciones de glucosa. Además encontramos que TvHK, es una proteína que no se secreta bajo las condiciones de glucosa analizadas; en contraste con TvCP4 que se secreta de manera independiente de la concentración de glucosa.

La siguiente pregunta que abordamos fue ¿Cuál de las dos proteínas TvTIM se localiza en los PS de *T. vaginalis* en AG?. Para contestarla realizamos la identificación de las proteínas TvTIMs por espectrometría de masas (LC MS/MS) a partir de las bandas de la región de 27 kDa de los geles teñidos con CBB. La tabla 3, muestra los resultados obtenidos por LC MS/MS. De manera interesante se identificó a TvTIM2 y no TvTIM1 en los PS de *T. vaginalis* en AG. Adicionalmente, junto con la TvTIM2 se encontraron otras proteínas en la región de 27 kDa como las enzimas glucolíticas: malato deshidrogenasa (TVAG_253650), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (TVAG_475220) y fosfoglicerato mutasa (TVAG_113710). También se identificaron proteínas de señalización celular como la 14-3-3 (TVAG_454380), proteínas ribosomales como L10a (TVAG_074480), proteínas de citoesqueleto como actina (S5TJM9) y dos cisteína proteasas: Clan CA, family C1, cathepsin L-like TvCP39 (TVAG_298080) y Clan CA, family C1, cathepsin L-like TvCP2 (TVAG_057000). La Tabla 4 muestra los diez péptidos obtenidos por LC MS/MS para la proteína TvTIM2 de los cuales 9/10 se comparten entre TvTIM1 y TvTIM2; sin embargo, un péptido diferencial (TVQEA**E**KL**V**EMLNGAK) correspondiente a los residuos 16-31 confirmó que la proteína TvTIM entre los productos de secreción correspondía a la TvTIM2 y no de TvTIM1, aunque no se descarta que también se encontrara ésta como producto de la lisis de los parásitos.

Figura 14. Ensayos de secreción *in vitro* de las proteínas TvTIM de *T. vaginalis*. (A) Perfil de proteínas totales (ET; líneas 2 y 4) y productos de secreción (PS; líneas 1 y 3) de parásitos en RG (≤ 1 mM) y AG (50 mM), analizados por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12% y teñidos con azul brillante de Coomassie (CBB). (B) Ensayos de WB con geles duplicados de (A) transferidos a membranas de NC e incubados con diferentes anticuerpos: anti-TvTIMr (α -TvTIMr; dilución 1:500) que reconoce un banda de 27 kDa de las proteínas TvTIM de *T. vaginalis*; anti-EhHkr (dilución 1:1,000) que reconoce una banda de 50 kDa de la hexoquinasa de tricomonas (TvHK) utilizado como control negativo de secreción; anti-TvCP4r (dilución 1:500) que reconoce una banda de 24 kDa de la proteasa TvCP4 utilizado como control positivo de secreción. Los productos de secreción se obtuvieron después de 1 h de incubación a 37°C de los parásitos en ambas condiciones de glucosa. Los ensayos se realizaron tres veces de manera independiente y las imágenes se analizaron con el software Quantity One (Bio-Rad).

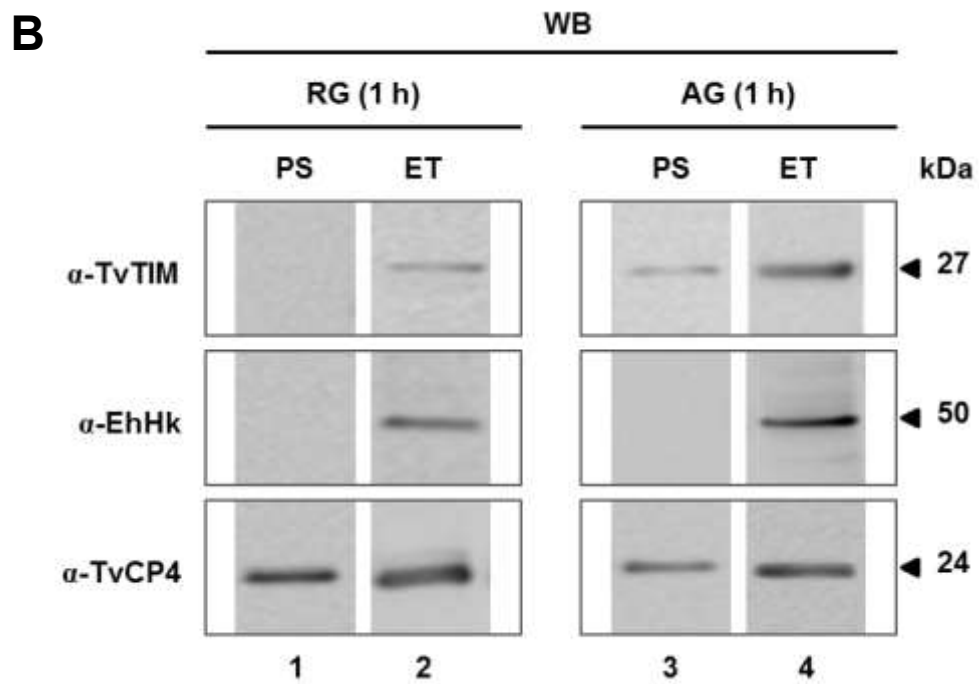
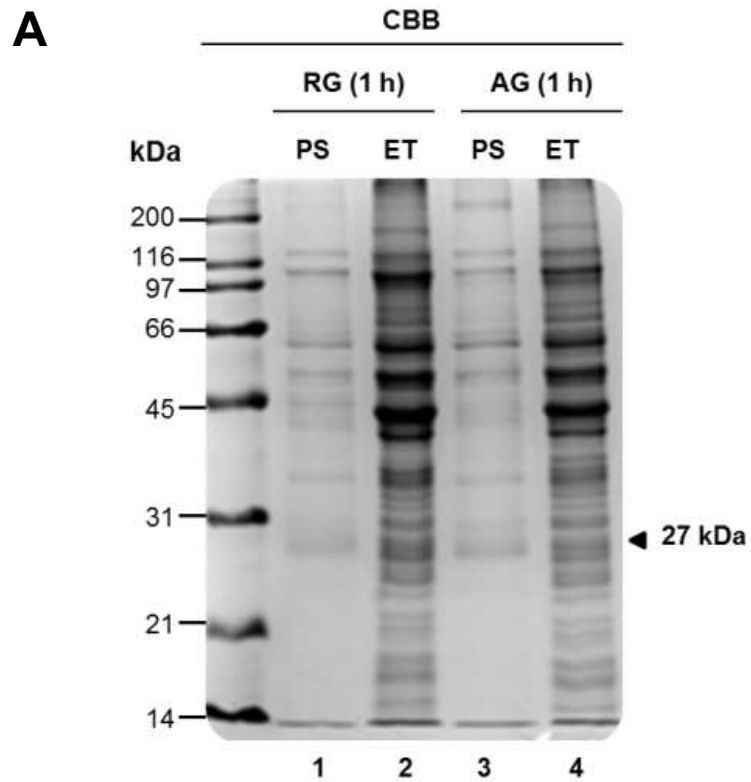


Tabla 3. Proteínas identificadas por LC MS/MS, en la región de 27 kDa, a partir de los productos de secreción *in vitro* de *T. vaginalis* en condiciones de AG.

Proteína	Función	TrichDB (ID)	N° acceso	Score	Coverage (%)	# Péptidos únicos	MW (kDa)/pI
Triosafosfato isomerasa (TvTIM2)	Glucólisis	TVAG_096350	A2FT29	55.74	53	10	27.4/6.01
Malato deshidrogenasa		TVAG_253650	A2DMN2	57.19	57	7	35.7/6.86
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa		TVAG_475220	A2EM29	35.60	26	6	39.2/8.0
Fosfoglicerato mutasa		TVAG_113710	A2DNM4	21.94	17	4	28.3/8.32
Proteína 14-3-3	Señalización celular	TVAG_454380	A2EU51	62.49	42	10	27.3/4.86
Proteína ribosomal L10a	Proteína ribosomal	TVAG_074480	A2DCH7	34.81	33	6	24.3/10.1
Actina (fragmento)	Citoesqueleto		S5TJM9	40.99	35	8	37.2/5.48
Clan CA, family C1, Cathepsin L-like (TvCP39)	Cisteína proteinasas	TVAG_298080	A2ETO2	40.74	21	5	33.6/6.62
Clan CA, family C1, Cathepsin L-like (TvCP2)			Q27107	39.33	21	4	34.6/8.13

Tabla 4. Lista de péptidos obtenidos por LC MS/MS para la proteína TvTIM2 de *T. vaginalis*.

N°	Residuo aa (inicia-termina)	Péptido (aa)
1	16-31	TVQEAEKLVEMLNGAK (Péptido diferencial)
2	60-83	VSAENVFTKPNGAFTGEVTVPMMIK
3	84-97	SFGIEWTILGHSER
4	99-111	DILKEDDEFLAAK
5	122-133	IYCCGEHLSER
6	134-148	EAGKASEFVSAQIEK
7	158-175	WDDVVIAYEPIWAIGTGK
8	197-206	VGADIANKVR
9	176-187	VASTQDAQEMCK

TvTIM2 (TVAG_096350)

↓ ↓

MRTFFVGGNWKANPKTVQEAEKLVEMLNGAKVEGNVEVVVAAPFVFLPTLQQKLRKDWKV

SAENVFTKPNGAFTGEVTVPMIKSFGIEWTILGHSERFDILKEDDEFLAAKAKFALENGM

KLIYCCGEHLSEREAGKASEFVSAQIEKMI PAIPAGKWDDVVIAYEPIWAIGTGK VASTQ

DAQEMCKVIRDILAAKVGADIANKVRILYGGSVKPNNCNELAACPDVDGFLVGGASLEAG

FINIVNSNVHSK

TvTIM1 (TVAG_497370)

MRTFFVGGNWKANPKTVEEAEKLIEMLNGAKVEGNVEVVVAAPFIFLPTLQQKLRKDWKV

SAENVFTKPNGAFTGEVTVPMIKSFGIEWTILGHSERFDILKEDDEFLAAKAKFALENGM

KLIYCCGEHLSEREAGKASEFVSAQIEKMI PAIPAGKWDDVVIAYEPIWAIGTGK VASTQ

DAQEMCKVIRDILAAKVGADIANKVRILYGGSVKPNNCNELAACPDVDGFLVGGASLEPG

FINIVNSNVHSK

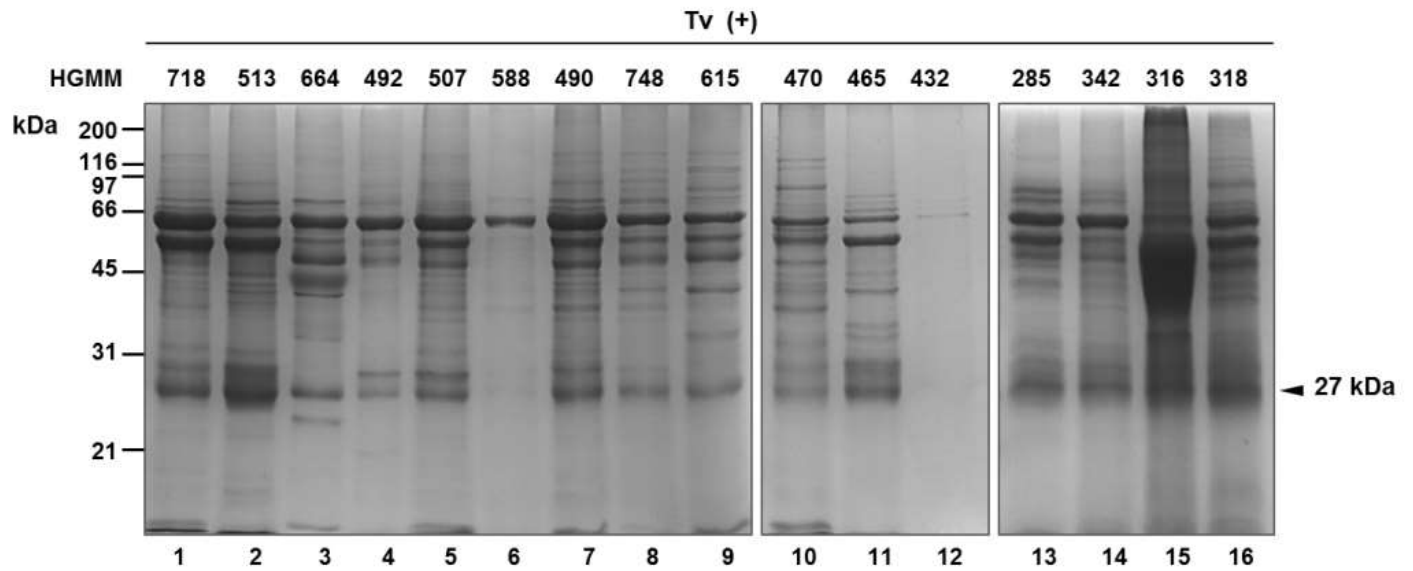
9.13 Identificación de las proteínas TvTIM en secreciones vaginales de mujeres con Tricomoniiasis.

Como se demostró en la figura 14 y en la tabla 3, la proteína TvTIM2 es secreta por *T. vaginalis* en AG. Este hallazgo nos llevó a preguntarnos si *T. vaginalis* secreta a la proteína TvTIM2 durante la infección vaginal. Para contestar esta pregunta realizamos ensayos de WB utilizando secreciones vaginales (SV) obtenidas de mujeres con tricomoniasis activa (n= 16) y mujeres con microbiota normal (n= 16). Para este estudio se incluyeron 32 muestras de SV. Las SV se analizaron por SDS-PAGE y por ensayos de WB utilizando el anticuerpo anti-TvTIM. La Figura 15 muestra el perfil de proteínas de SV de mujeres con infección por *T. vaginalis* (Tv +; panel A) y SV obtenidas de mujeres sanas (Tv -; panel C). En ambos grupos (A y C) se observó un patrón diferencial de proteínas entre cada muestra aunque hay bandas que se conservan y otras que desaparecen; sin embargo, en ambos (A) y (C) se observan bandas de proteínas en la región de 27 kDa que podrían corresponder a las proteínas TvTIM de *T. vaginalis*. Esto se confirmó por ensayos de WB con duplicados de las muestras de A y C con el anticuerpo anti-TvTIMr. Los resultados muestran el reconocimiento de una banda de aproximadamente 27 kDa, en las SV (10/16) de mujeres con infección por *T. vaginalis* (Tv +) (Fig. 15B, líneas 1, 2, 5-10, 13 y 16), en comparación con las SV de mujeres sanas (Tv -), donde no se observó reconocimiento del anticuerpo en la región de 27 kDa (Fig. 15D, líneas 1-16), sugiriendo que TvTIM está presente en las SV durante la infección por tricomonas. Para descartar un posible reconocimiento cruzado del anticuerpo con la TIM de humano, extractos totales de proteína (ET) de células HeLa (células cervicovaginales humanas), o *T. vaginalis* (control positivo), se analizaron por SDS-PAGE y por ensayos de WB con el anticuerpo anti-TvTIMr. Los resultados muestran la ausencia de reactividad del anticuerpo anti-TvTIMr en los ET de células HeLa (Fig. 15E, línea 3), comparado con el reconocimiento de la banda de 27 kDa en los ET de *T. vaginalis* (Fig. 15E, línea 6) como se esperaba.

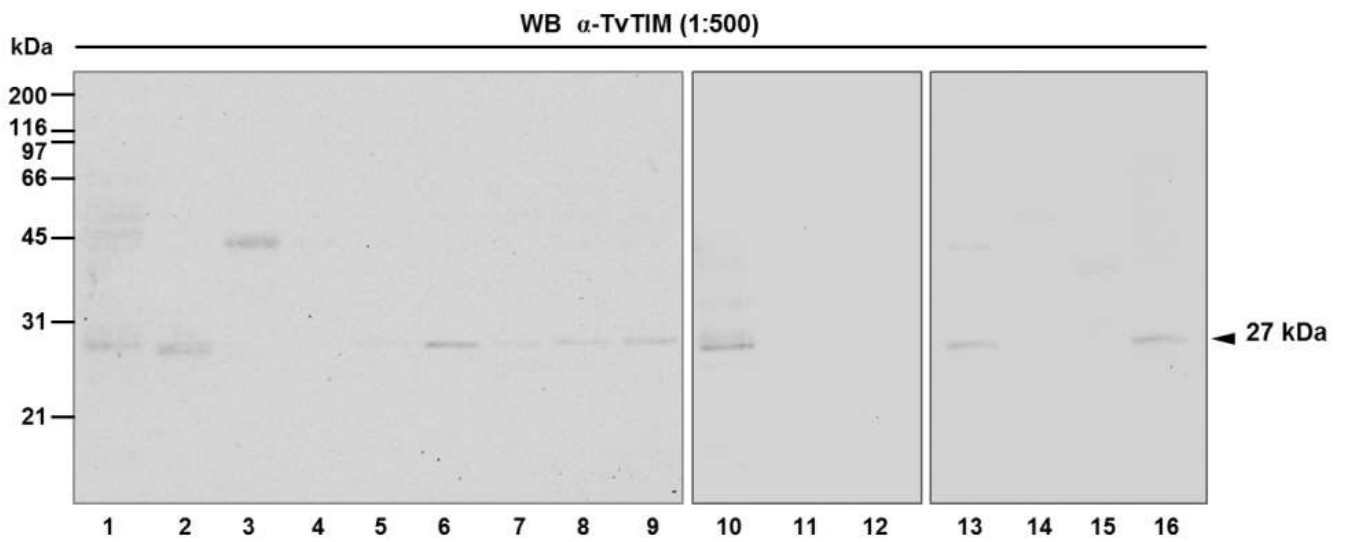
Para resolver ¿Cuál de las dos proteínas TvTIM se detectó en las SV de mujeres con tricomoniasis? se cortaron las bandas de 27 kDa de los geles de las muestras de SV (Tv +) (Fig. 15A, líneas 7 y 10) que por WB mostraron reactividad positiva (Fig. 15B, línea 7 y 10) y se realizó la identificación de las proteínas TvTIMs por espectrometría de masas. En la tabla 5 se muestran los resultados y se agrupan las proteínas identificadas en las bandas de 27 kDa en proteínas de *T. vaginalis* y del humano y por el tipo de proteínas al que pertenecen. De manera interesante se identificó a la proteína TvTIM2 (TVAG_096350) en ambas muestras (Tabla 5, carriles 7 y 10) y otras enzimas metabólicas de *T. vaginalis* como, fosfoglucomutasa (TVAG_205910) y malato deshidrogenasa (TVAG_204360). También se identificaron a las cisteína proteinasas TvCP2 (TVAG_057000) y TvCP3 (TVAG_090100), así como a la proteína ribosomal L10 (TVAG_344700) (Tabla 5, carriles 7 y 10). Todas estas proteínas a excepción de TvCP3 también se identificaron en los productos de secreción *in vitro* de *T. vaginalis*, corroborando estos resultados y sugiriendo la secreción activa de estas proteínas durante la infección. Además, entre las proteínas de humano identificadas se encontraron a la queratina, albúmina e inmunoglobulinas (Tabla 5, carriles 7 y 10); solo en la muestra del carril 10 se identificó a la isoforma 1 de la triosafosfato isomerasa de humano; sin embargo, previamente demostramos que el anticuerpo anti-TvTIMr no cruza con la TIM de humano (Fig. 15E, línea 3).

Figura 15. Identificación de las proteínas TvTIM en secreciones vaginales de mujeres con tricomoniasis. (A y C) Perfil de proteínas de secreciones vaginales (SV) de mujeres con infección por *T. vaginalis* (Tv +) (panel A, líneas 1-16) y mujeres con microbiota normal (Tv -) (panel C, líneas 1-16) analizadas por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12% y teñidos con azul brillante de Coomassie (CBB). Ensayos de WB con geles duplicados de las muestras de SV (A y C), transferidos a membranas de NC e incubados con el anticuerpo anti-TvTIMr (dilución 1:500) que reconoce una banda de 27 kDa. SV (Tv +) (panel B, líneas, 1, 2, 5-10, 13 y 16). SV (Tv -) (panel D, líneas 1-16). Como controles de especificidad se utilizaron extractos de proteínas totales (ET) de células HeLa (10×10^6 células) y de *T. vaginalis* (20×10^6) separados por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12% y teñidos con CBB (paneles E y F, líneas 2 y 5, respectivamente). Ensayos de WB de duplicados de las muestras en de E y F, transferidas a membranas de NC e incubadas con el anticuerpo α -TvTIM (dilución 1:1,000). Las imágenes se analizaron con el software Quantity One (Bio-Rad).

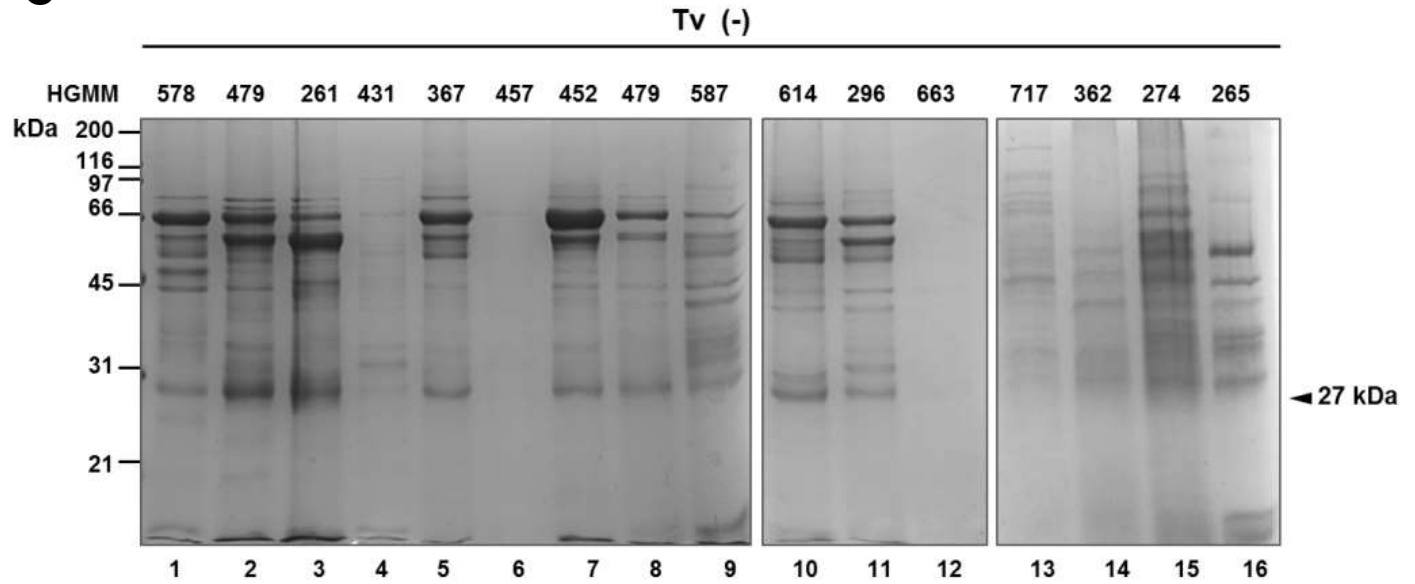
A



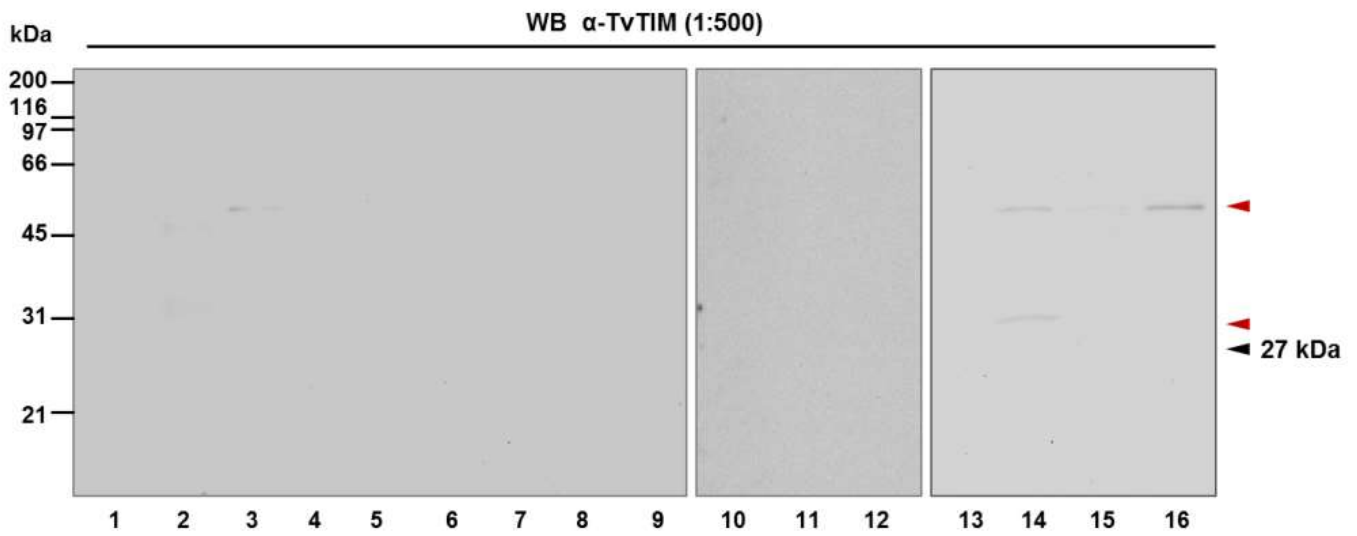
B



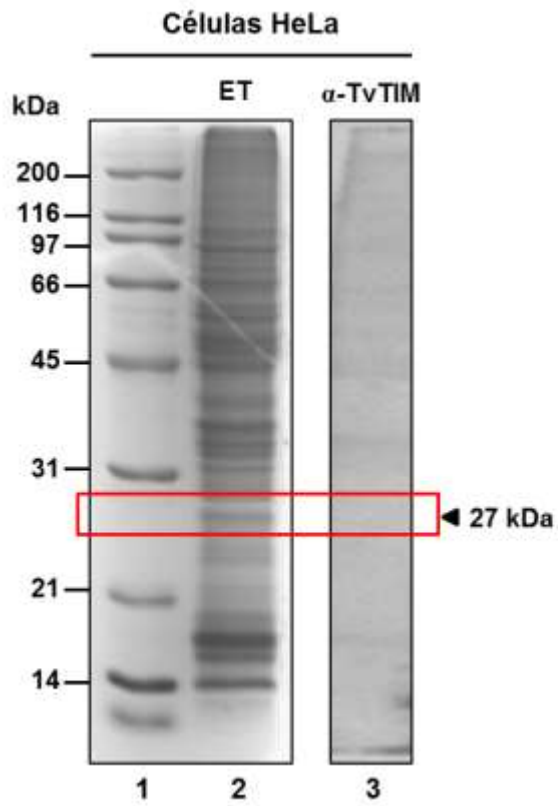
C



D



E



F

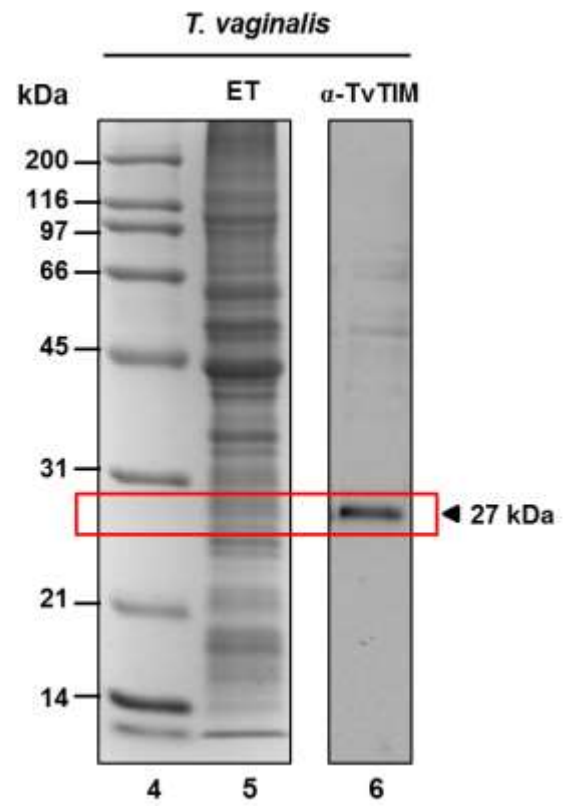


Tabla 5. Proteínas identificadas por LC MS/MS en la región de 27 kDa de las secreciones vaginales (SV) de mujeres con tricomoniasis.

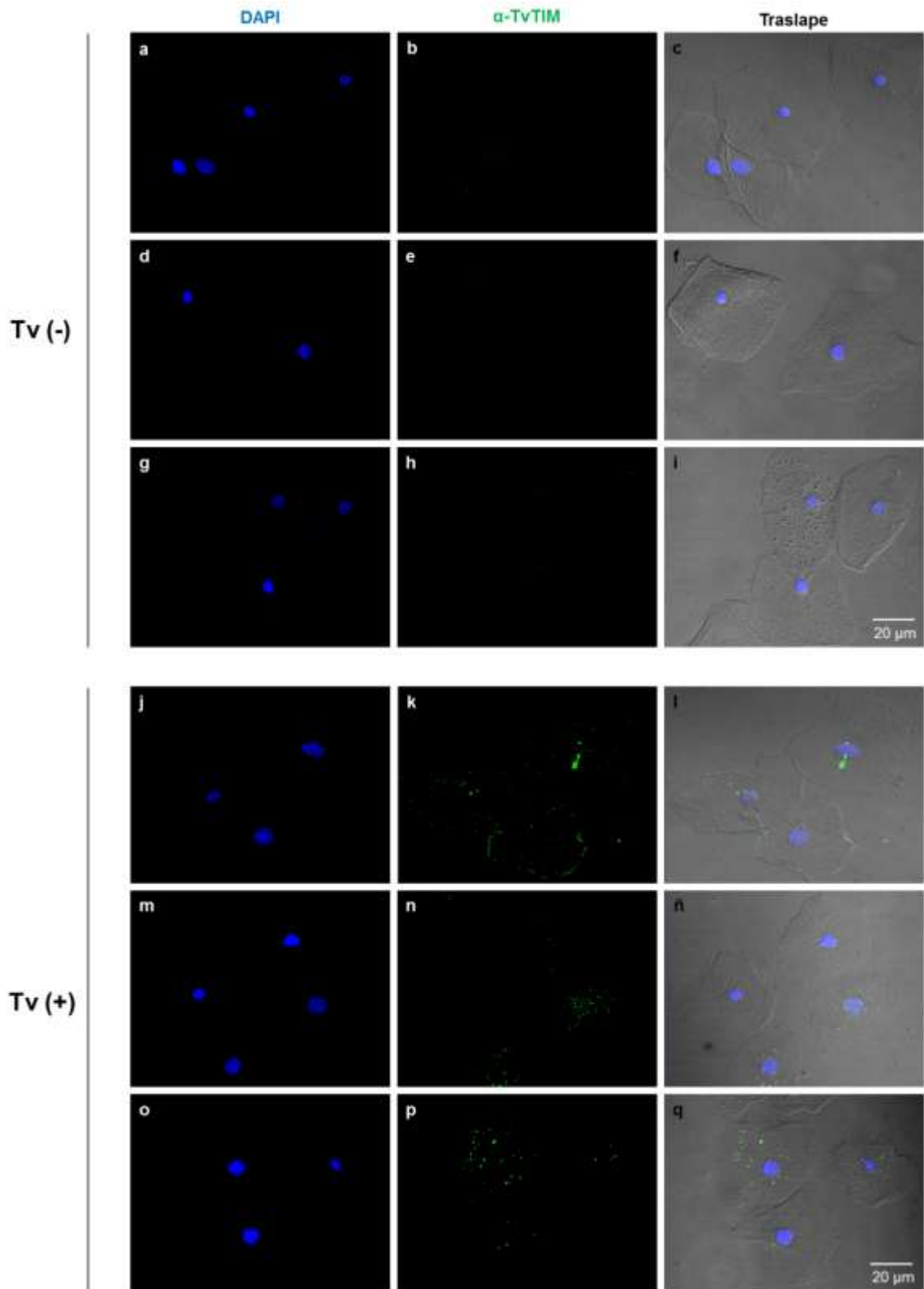
Banda de 27 kDa	Proteínas identificadas	N° acceso	Score	Coverage (%)	#Peptidos unicos	MW/pi
Carril 7 Proteínas/ <i>T. vaginalis</i>	Triosafosfato isomerasa, TvTIM2	TVAG_096350	22.97	21.43	3	27.5/5.73
	Cisteína protease, TvCP2 , Clan CA, familia C1, Catepsina L-like	TVAG_057000	15.04	17.20	4	34.6/8.13
	Cisteína protease, TvCP3 , Clan CA, familia C1, Catepsina L-like	TVAG_090100	13.18	15.41	2	35.7/7.59
Carril 7 Proteínas/humano	Keratina tipo 2, citoesqueleto 1	IPI00220327.4	134.95	34.63	19	66/8.12
	Keratina tipo 2, citoesqueleto 2, epidermal	IPI00021304.1	95.87	40	17	65.8/8
	Keratina tipo 2, citoesqueleto 10	IPI00009865.4	85.61	30.99	12	58.8/5.21
	Proteína IGK inmunoglobulina kappa	IPI00784985.1	82.10	39.57	8	25.5/6.55
	Proteína IGL inmunoglobulina lambda	IPI00154742.6	52.57	32.05	5	24.8/6.37
	Albúmina sérica, isoforma I	IPI00745872.2	59.08	20.03	10	69.3/6.28
Carril 10 Proteínas/ <i>T. vaginalis</i>	Triosafosfato isomerasa, TvTIM2	TVAG_096350	15.39	15.87	3	27.4/6.01
	Fosfoglucomutasa	TVAG_205910	24.49	8.87	5	65.6/6.61
	Malato deshidrogenasa	TVAG_204360	11.93	15.36	3	35.7/6.46
	Proteína ribosomal L10	TVAG_344700	11.44	13.88	3	34.3/6.65
	Cisteína protease, TvCP2 , Clan CA, familia C1, Catepsina L-like	TVAG_057000	12.04	12.74	3	34.6/8.13
Carril10 Proteínas/Humano	Proteína IGK inmunoglobulina kappa	IPI00784985.1	71.69	36.60	7	25.5/6.55
	Proteína IGL inmunoglobulina lambda	IPI00154742.6	42.42	27.78	4	24.8/6.37
	Keratina tipo 2, citoesqueleto 2, epidermal	IPI000021204.1	24.05	12.09	4	65.8/8
	HSPA5 (proteína de 78 kDa, regulada por glucosa)	IPI00003362.3	17.81	6.88	4	72.3/5.16
	Triosafosfato isomerasa, isoforma I	IPI00797270.4	19.90	29.72	5	26.7/6.90

9.14 Localización de las proteínas TvTIM en células epiteliales vaginales (VECs) humanas.

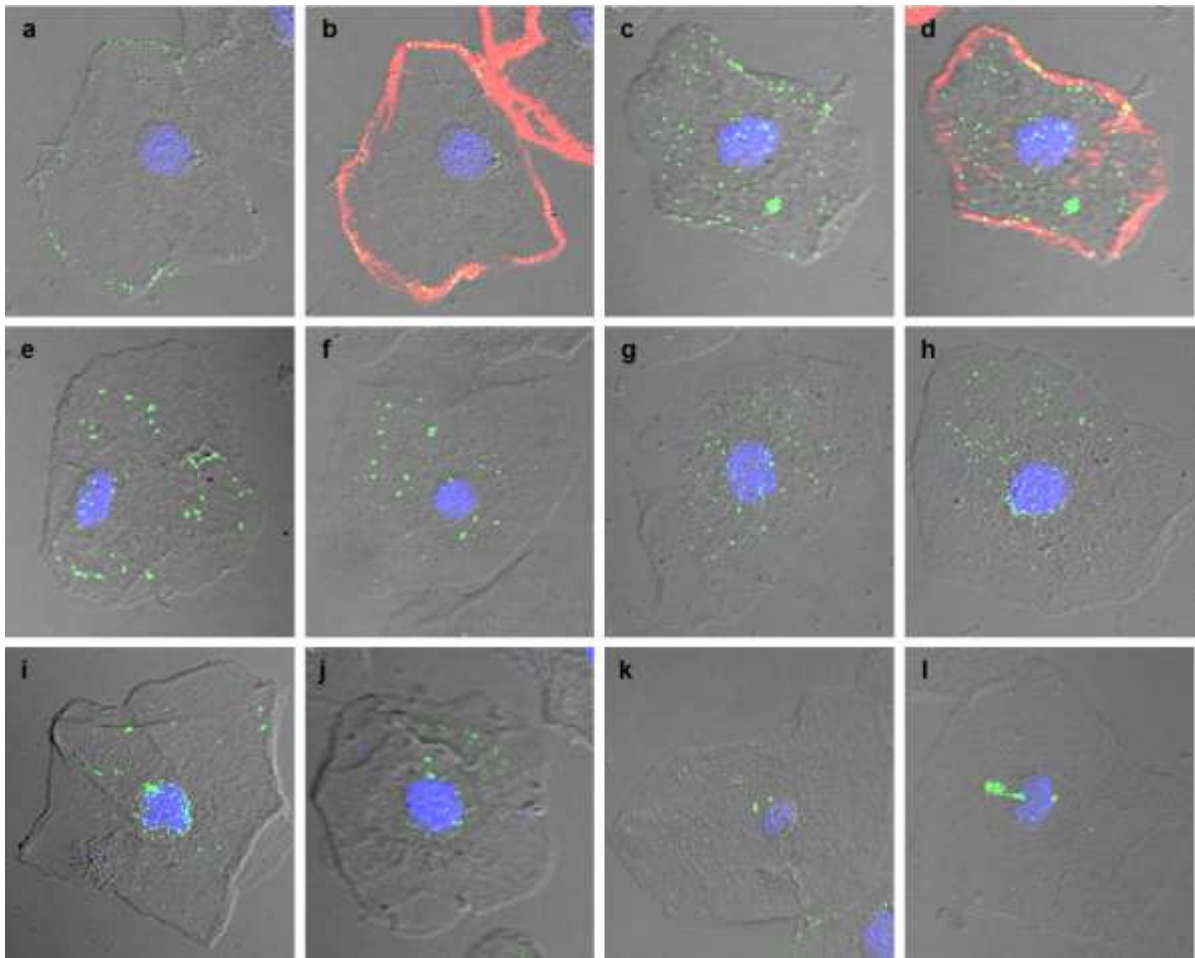
Los resultados muestran que TvTIM2 se secreta tanto *in vitro* como *in vivo* por *T. vaginalis*, por lo que nos preguntamos si TvTIM interactuaba con las células VECs durante la infección. Para ello, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo anti-TvTIMr en células VEC aisladas de SV obtenidas de mujeres con tricomoniasis (Tv +) y mujeres con microbiota normal (Tv -). Las células VEC de mujeres con infección por *T. vaginalis* (Tv +) fijadas e incubadas con el anticuerpo anti-TvTIM, mostraron puntos de localización de TvTIM (en verde) en la superficie, en el citoplasma y rodeando los núcleos de las células VEC (Fig. 16A, paneles j-q), mientras que las células VEC de mujeres sanas (Tv -) no mostraron reactividad con el anticuerpo α -TvTIM (Fig. 16A, paneles a-i), indicando la ausencia de reactividad cruzada con la proteína TIM de humano. Para observar mejor la localización de TvTIM en las células VEC (Tv +) se realizó un zoom de las imágenes (Fig. 16B, paneles a-l) lo que confirmó la localización de la TvTIM (en verde) en la superficie de las células VEC (Fig. 16B, panel A y C) ya que se detectó colocalización en amarillo de TvTIM (en verde) con el marcador de superficie DIL (en rojo) (Fig. 16B, paneles b y d). La tinción de los núcleos con DAPI (en azul), permitió corroborar la localización de TvTIM alrededor y dentro de los núcleos donde se observó colocalización en blanco (Fig. 16B, e-l). En los controles de especificidad utilizando células HeLa fijadas e incubadas con el anticuerpo anti-TvTIMr no se observó señal (en verde) en el citoplasma (Fig. 16C), en el núcleo, ni en la superficie de las células teñidas con DIL (Fig. 16D), demostrando que el anticuerpo anti-TvTIMr no tiene un reconocimiento cruzado con la TIM de humano y que el anticuerpo secundario acoplado a FITC no se une de manera inespecífica. Por lo tanto, se confirmó que la señal observada en las células VEC (Tv+) corresponde a la presencia de las proteínas TvTIM de *T. vaginalis* en estas células, que posiblemente podría tratarse de TvTIM2 según los resultados de secreción *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, se requiere de nueva evidencia experimental para demostrarlo.

Figura 16. Localización de las proteínas TvTIM de *T. vaginalis* en células VECs de pacientes con tricomoniasis. (A) Las imágenes de inmunofluorescencia indirecta y microscopía nomarsky muestran células VEC aisladas de secreciones vaginales (SV) de tres mujeres con infección activa por *T. vaginalis* (Tv +) (paneles, j-q) y de tres mujeres con microbiota normal (Tv -) (paneles, a-i). Las células VEC fijadas con paraformaldehído al 4%, se incubaron con el anticuerpo primario anti-TvTIMr (dilución 1:50), seguido de un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo acoplado a FITC (dilución 1:100). Las imágenes traslape de células VEC (Tv +) con la diferentes localizaciones de la proteína TvTIM en verde; superficie (**A**, paneles j-l), citoplasma (**A**, paneles o-q) y rodeando y en el interior de los núcleos (**A**, paneles m-ñ); células VEC (Tv -) (**A**, paneles a-i). (**B**) Zooms ópticos de la localización de TvTIM (en verde) en la superficie de células VEC (Tv +) (**B**, paneles a y c), colocalización en amarillo con el marcador de superficie DIL (dilución 1:200, en rojo) (**B**, paneles b y d). Los paneles e-l muestran la localización de la proteína TvTIM en el citoplasma y cercana o rodeando a los núcleos de las células VEC. La tinción de los núcleos en azul con DAPI, muestran puntos de colocalización en blanco de TvTIM con los núcleos (**B**, paneles e, g, h, i y j). (**C y D**) Controles negativos de células HeLa fijadas con paraformaldehído al 4%, incubadas con el anticuerpo anti-TvTIM (dilución 1:50), seguido del anticuerpo secundario acoplado a FITC (dilución 1:100). Las imágenes muestran los diferentes fluorocromos para localización de membrana (rojo), de los nucleos (azul) y de TvTIM (verde), tanto en el citoplasma (**C**, paneles a-d), como en la superficie de las células HeLa (**D**, paneles a-f). Las imágenes se analizaron por microscopía confocal. El tamaño de las barras se indica en 20 μm .

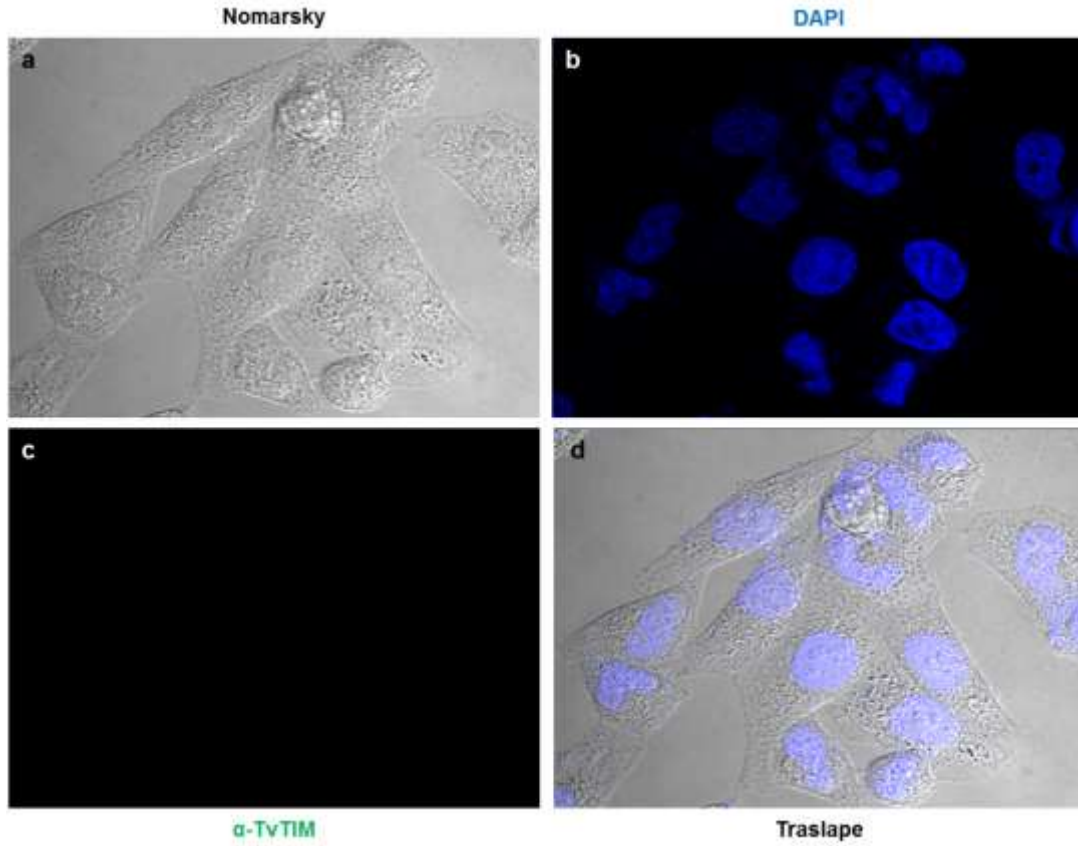
A



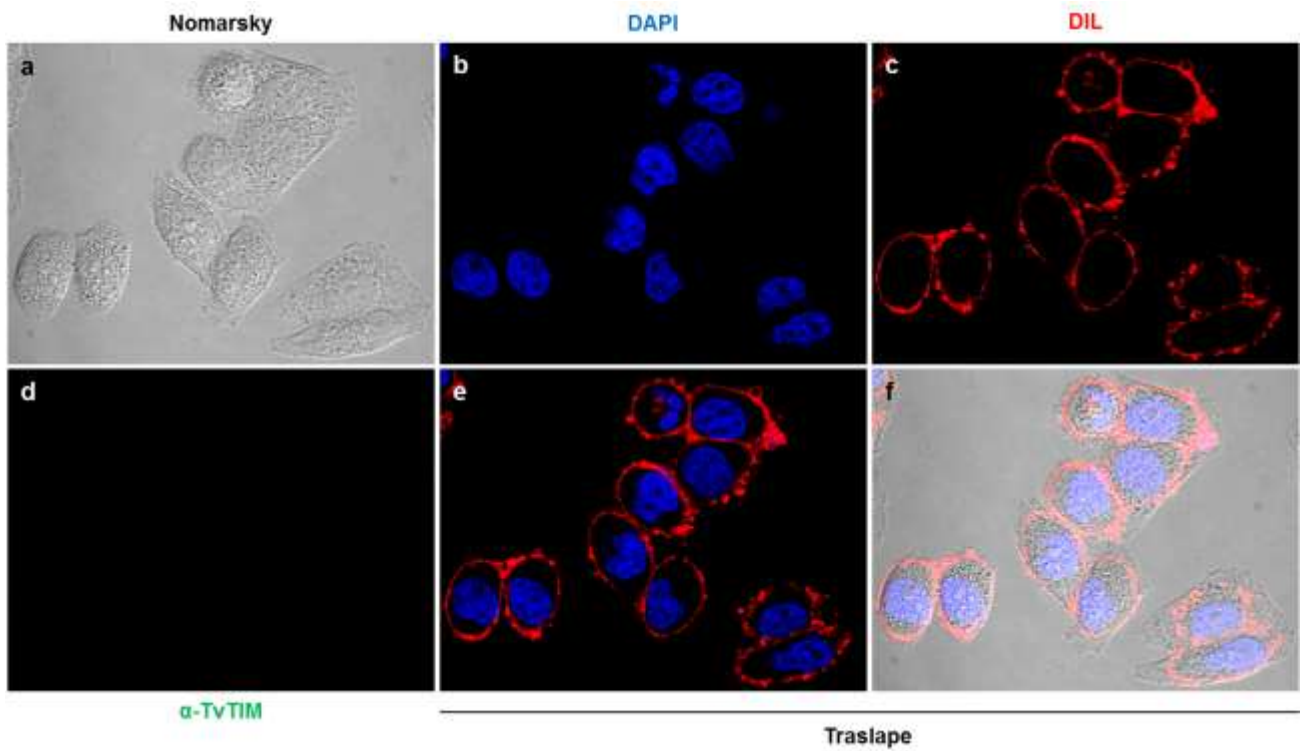
B



C



D



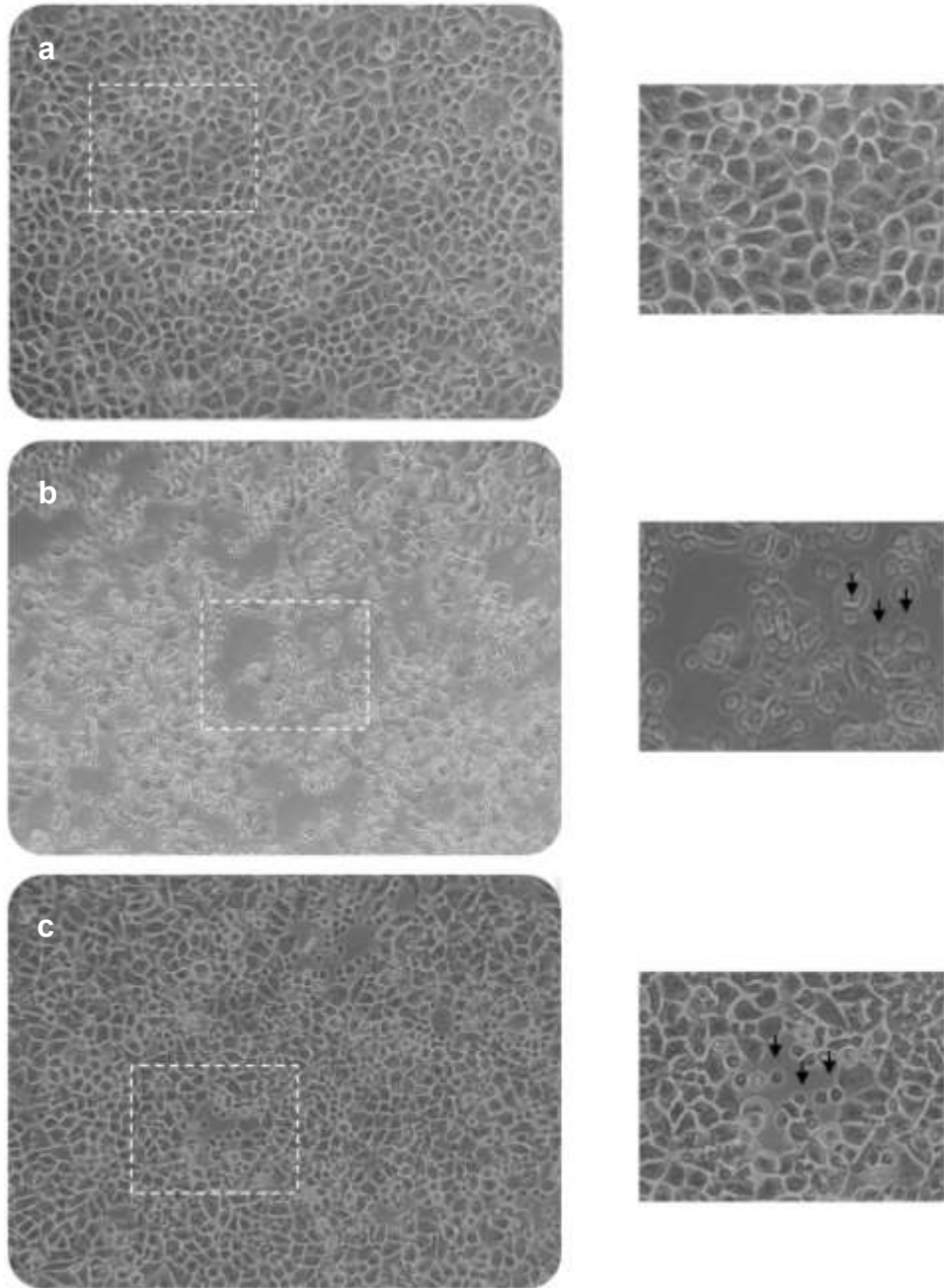
9.15 Efecto de la glucosa en los niveles de citotoxicidad de *T. vaginalis*.

La glucosa es la principal fuente de carbono para la generación de energía y para el óptimo crecimiento de *T. vaginalis*. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que *T. vaginalis* podría estar expuesta a cambios drásticos en los niveles de glucosa (0.3-36.65 mM) durante la infección (Tabla 1). Por esta razón, en los próximos objetivos nos enfocamos a estudiar el efecto de la glucosa en la modulación de la virulencia de *T. vaginalis*, específicamente en los niveles de citotoxicidad, actividad proteolítica y cantidad de cisteína proteinasas.

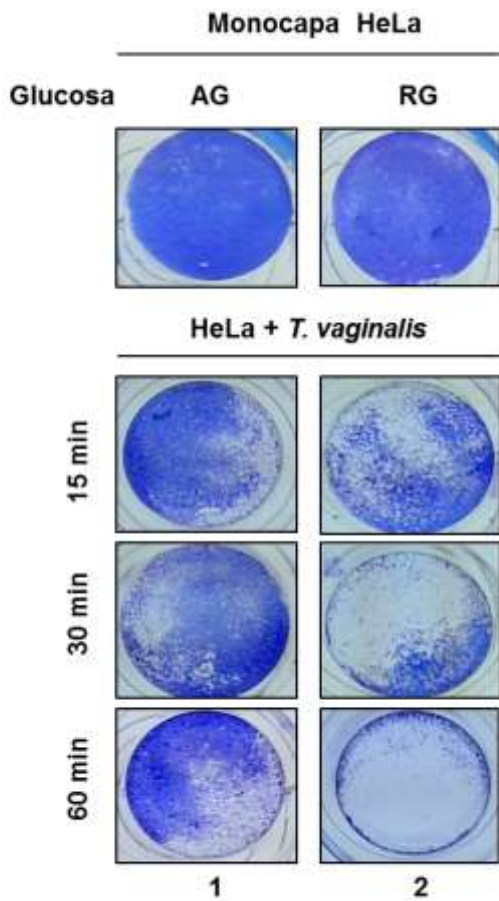
Los ensayos de citotoxicidad entre parásitos vivos crecidos en diferentes concentraciones de glucosa (RG y AG) y monocapas de células HeLa vivas por 15, 30 y 60 min mostraron que la mayor destrucción de las monocapas se observó con los parásitos crecidos en RG (Fig. 17A, panel b), en contraste con los parásitos crecidos en AG, que no mostraron un daño significativo de las monocapas (Fig. 17A, panel c), comparado con el control de células HeLa sin tratamiento (Fig. 17A, panel a). La confirmación visual del efecto citotóxico de *T. vaginalis* después de la tinción de las monocapas con el colorante cristal violeta mostró la destrucción total de las monocapas a los 60 min de incubación con los parásitos en RG, comparado con los parásitos en AG que exhibieron una destrucción parcial (Fig. 17B). El porcentaje de citotoxicidad corroboró lo observado en el análisis microscópico, con valores de 98% de citotoxicidad de los parásitos en RG, comparada con 45% de citotoxicidad por los parásitos en AG (Fig. 17C). Estos datos sugieren que la glucosa modula de manera negativa la citotoxicidad de *T. vaginalis*, posiblemente regulando la expresión y actividad proteolítica de algunas cisteína proteinasas involucradas en esta propiedad de virulencia de *T. vaginalis*.

Figura 17. Efecto de la glucosa en la citotoxicidad de *T. vaginalis* a monocapas de células HeLa. (A) Ensayos de citotoxicidad de parásitos vivos ($\sim 2 \times 10^5$ /pozo) crecidos en restricción (RG, ≤ 1 mM) y alta (AG, 50 mM) glucosa incubados con monocapas de células HeLa vivas ($\sim 5 \times 10^4$ células/pozo) por 30 min a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. Las imágenes de microscopía óptica, muestran monocapas íntegras de células HeLa antes de la interacción con los parásitos (panel a), células HeLa incubadas con parásitos en RG (panel b) y células HeLa incubadas con parásitos en AG (panel c). El efecto citotóxico de los parásitos se muestra como la pérdida en la integridad de las monocapas. Las flechas señalan la localización de parásitos entre las células HeLa. **(B)** Imágenes representativas del efecto citotóxico de *T. vaginalis*, se muestran los controles de monocapas íntegras de células HeLa teñidas con cristal violeta (en azul); células HeLa incubadas con parásitos en AG (línea 1), o con parásitos en RG (línea 2) por 15, 30 y 60 min. La destrucción de las monocapas se visualiza como la pérdida de células teñidas en azul, con respecto al tiempo. **(C)** La gráfica representa el porcentaje de destrucción de las monocapas de células HeLa por los parásitos en ambas condiciones de glucosa. Las barras de error indican la desviación estándar (DE) determinada a partir de tres experimentos independientes. Los asteriscos (***) muestran las diferencias significativas ($P < 0.05$) de los porcentajes de citotoxicidad entre ambas condiciones de glucosa determinadas por ANOVA.

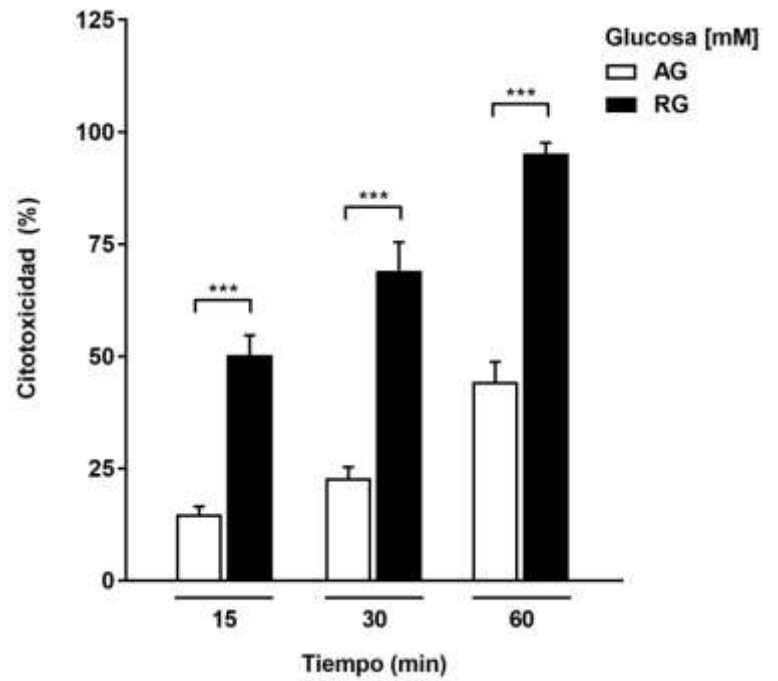
A



B



C



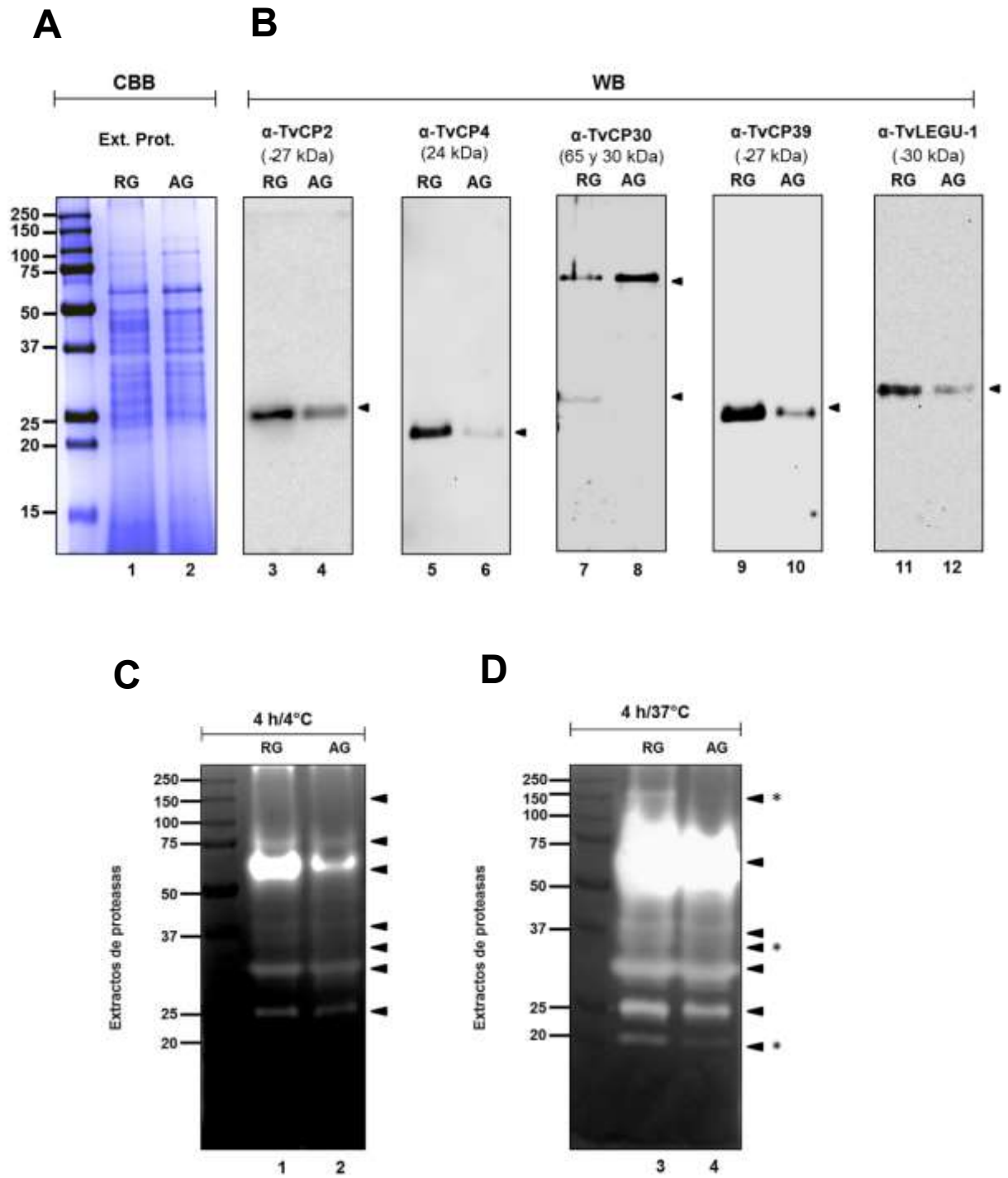
9.16 Efecto de la glucosa sobre la cantidad y actividad proteolítica de cisteína proteinasas (CPs) de *T. vaginalis*.

Los resultados de la Figura 17 indican que la restricción de glucosa (RG) en el medio es una condición que promueve mayor actividad citotóxica de *T. vaginalis* hacia las células epiteliales que podría estar directamente relacionada con un incremento en la cantidad y actividad proteolítica de algunas de las cisteína proteinasas (CPs) involucradas en el daño celular. Para demostrarlo se realizaron ensayos de WB con extractos resistentes a proteasas de parásitos crecidos en RG y AG. En la figura 18A se muestran los resultados del WB de cinco CPs previamente reportadas en la virulencia de *T. vaginalis*, entre las que se incluyen a: TvCP2 implicada en los procesos de apoptosis y citotoxicidad (83, 84); TvCP4 responsable de la inducción de hemólisis en alto hierro (76); TvCP39 implicada en la citotoxicidad y degradación de inmunoglobulinas (85, 86); TvCP30 involucrada en citoadherencia y degradación de proteínas (87); y TvLEGU-1 que participa en la citoadherencia de *T. Vaginalis* (75). Los WB muestran una mayor cantidad de proteína TvCP2 (línea 3), TvCP4 (línea 5), TvCP39 (línea 9) y TvLEGU-1 (línea 11) en los parásitos crecidos en RG, comparado con la menor cantidad de estas CPs en los parásitos crecidos en AG (líneas 4, 6, 10 y 12, respectivamente). En el caso de TvCP30 se observó el reconocimiento de una banda de 24 kDa en RG (línea 7) y una banda de 65 kDa que muestra un incremento en su cantidad en AG (línea 8). Estos resultados muestran que las cantidades de las CPs TvCP2, TvCP4, TvCP39 y TvLEGU-1 son moduladas negativamente por glucosa (Fig. 18).

Para confirmar que la mayor cantidad de estas CPs en RG se relacionaba directamente con un incremento en la actividad proteolítica se realizaron zimogramas a partir de extractos resistentes a proteasas obtenidos de parásitos en RG y AG. Los resultados muestran la aparición de al menos 7 bandas con actividad proteolítica en la condición de RG (Fig. 18C, línea 1) y 5 bandas con actividad en AG (Fig. 18C, línea 2), observándose la mayor intensidad de actividad en la región de 65 kDa en parásitos crecidos en RG. Para favorecer la actividad proteolítica y confirmar las bandas observadas, un duplicado de estos geles se

activaron 4 h a 37°C (Fig. 18D). Los resultados muestran un incremento en la intensidad de las bandas con actividad, lo que permitió identificar al menos 3 bandas extras con actividad proteolítica, en RG (*) (línea 3) que están ausentes en AG (línea 4). Estos resultados sugieren que estas nuevas bandas podrían también estar involucradas en el efecto citotóxico de *T. vaginalis*, observado en RG. En conjunto, estos datos sugieren que la citotoxicidad, cantidad y actividad proteolítica de CPs son moduladas negativamente por la glucosa.

Figura 18. Efecto de la glucosa en la cantidad y actividad proteolítica de algunas cisteína proteinasas de *T. vaginalis*. **(A)** Extractos resistentes a proteasas de parásitos (20×10^6) crecidos en restricción (RG, ≤ 1 mM; línea 1) y alta (AG, 50 mM; línea 2) concentración de glucosa analizados por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12% y teñidos con CBB. **(B)** Ensayos de WB de geles duplicados de (A), transferidos a membranas de NC e incubados con diferentes anticuerpos dirigidos contra cisteína proteinasas de *T. vaginalis*, entre los que se incluye: anti-TvCP2 (dilución, 1:200; banda 27 kDa), (líneas 3 y 4); anti-TvCP4 (dilución, 1:200; banda de 24 kDa) (líneas 5 y 6); anti-TvCP30 (dilución, 1:200; dos bandas 30 y 65 kDa)(líneas, 7 y 8); anti-TvCP39 (dilución, 1:200; banda de 27 kDa) (líneas, 9 y 10) y anti-TvLEGU-1 (dilución, 1:500; banda de 30 kDa) (líneas, 11 y 12). **(C y D)** Zimogramas de extractos resistentes a proteasas de parásitos (20×10^6) crecidos en RG (líneas 1 y 3) y AG (línea 2 y 4) por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12% copolimerizados con gelatina al 0.2% y teñidos con CBB. Las proteasas separadas en los geles se activaron 4 h a 4°C **(A)**, o 4 h a 37°C **(B)**. La actividad proteolítica se visualiza como bandas blancas contra un fondo oscuro. Los asteriscos (*) indican la detección de bandas diferenciales con actividad entre ambas condiciones de glucosa.



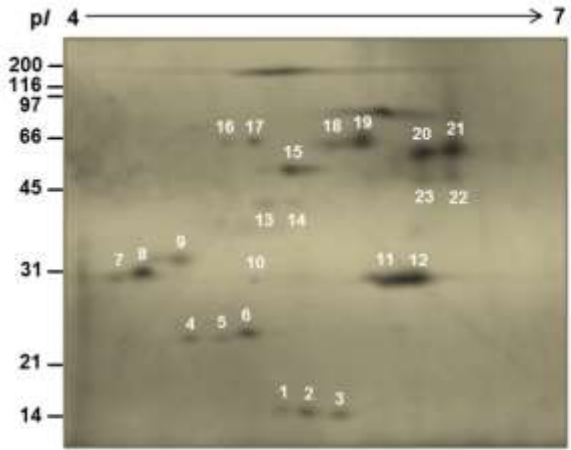
9.17 Identificación de CPs en los degradomas en doble dimensión de extractos resistentes a proteasas de *T. vaginalis* cultivada en diferentes condiciones de glucosa.

Para la identificación de las CPs de *T. vaginalis* en condiciones de AG y RG, los extractos resistentes a proteasas se separaron por electroforesis en doble dimensión y tinción de plata, se cortaron las manchas de los geles y se identificaron por MS/MS. Las figuras 19A y C muestran los perfiles de las proteínas (puntos), en ambas condiciones de glucosa. Los resultados muestran 23 puntos identificados por espectrometría de masas (EM) en AG de los cuales solo 17 puntos correspondieron a CPs (Tabla 6). En RG se identificaron 25 puntos de los cuales 23 correspondieron a CPs (Tabla 7). Las figuras 19B y D muestran el patrón de distribución de las diferentes CPs identificadas por EM en AG (B) y RG (D). El mayor número de puntos se observó entre las masas moleculares de 30-100 kDa y entre los *pI* de 5-7. Las CPs TvCP2 y TvCP4, fueron las más abundantes y ampliamente distribuidas en ambas condiciones de glucosa (Fig. 19B y D). Entre las proteínas que conservaron su masa molecular y *pI* en ambas condiciones de glucosa se encuentran TvCP12, TvLEGU-1, TvLEGU-2 y TvCP39 (Tabla 6 y 7). Sin embargo, un incremento significativo en la cantidad de estas proteínas se observó en RG, comparada con AG. De manera interesan se identificó una catepsina D del tipo de las aspártico peptidasa (TvCatD; TVAG_336300) en la condición de RG. También se identificó al inhibidor tricosistatina-2 (TC-2; TVAG_272260) en un punto de ~65 kDa junto con proteasas (TvCP2, TvCP3 y TvCP4), en AG; mientras que en la condición de RG, TC-2 se localizó en dos puntos de ~40 y 65 kDa acompañado por TvCP2 y TvCP4 (Tabla 7). En conjunto, estos datos muestran un incremento en el número y cantidad de CPs en RG comparado con AG. Adicionalmente, los resultados muestran que TvCP2 y TvCP4 fueron las más abundantes y ampliamente distribuidas en ambas condiciones de glucosa, sugiriendo la posible participación de estas CPs en los procesos de citotoxicidad de *T. vaginalis*. Además, la localización de CPs en un mismo punto, o con diferentes masas moleculares que no corresponden con la proteína (Tabla 6 y 7) sugiere la formación de estructuras poliméricas, o la

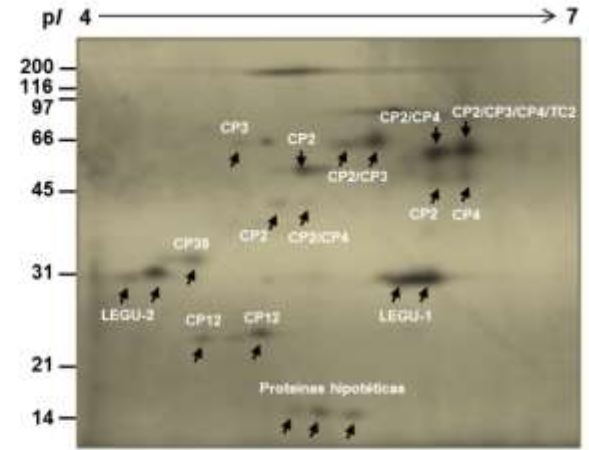
formación de complejos entre diferentes CPs posiblemente promovidas por cambios en las concentraciones de glucosa.

Figura 19. Identificación de CPs de *T. vaginalis* por espectrometría de masas en los degradomas de parásitos crecidos en diferentes concentraciones de glucosa. (A-D). Extractos resistentes a proteasas de parásitos (60×10^6) crecidos en AG (panel **A** y **B**) y RG (panel **C** y **D**) separados en geles de poliacrilamida al 12% después del isoelectroenfoque (IEF) en tiras IPG con un gradiente lineal de pH 4-7. (**A** y **C**) Perfiles de los puntos de proteínas en geles teñidos con plata, marcados con números consecutivos en AG (**A**) y RG (**C**). (**B** y **D**) Identificación de los puntos de proteínas por espectrometría de masas (EM) en geles teñidos con plata que muestran los patrones representativos de la distribución de las CPs para AG (**B**) y RG (**D**). El resumen de los resultados obtenidos por la EM para cada condición de glucosa se muestra en las Tablas 6 y 7.

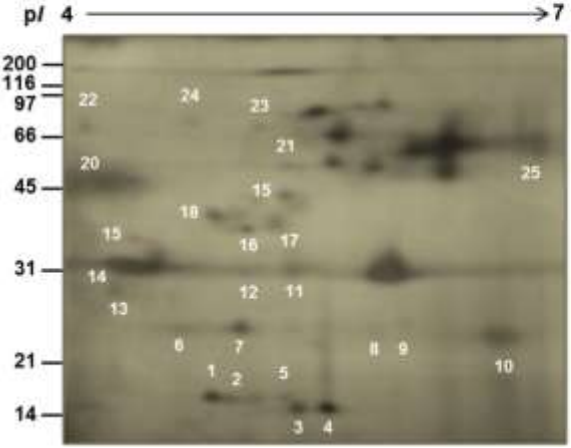
A



B



C



D

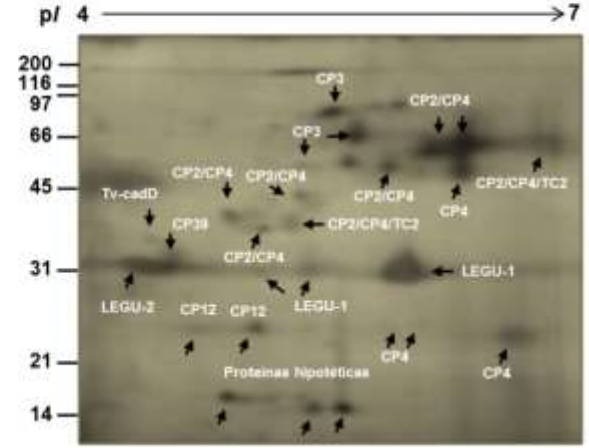


Tabla 6. Identificación por LC MS/MS de proteínas en los extractos resistentes a proteasas de parásitos crecidos en AG.

Spot	Proteína	TrichDB (ID)	Score	Covertura (%)	# Péptidos	MW [kDa] / pI
1	Proteína hipotética	TVAG_487100	195,74	25,15	4	17.9 / 6.30
2	Proteína hipotética	TVAG_487100	264,58	17,79	3	17.9 / 6.30
3	Proteína hipotética	TVAG_487100	280,63	17,79	3	17.9 / 6.30
4	TvCP12	TVAG_410260	85,78	9,52	2	35.0 / 7.23
5	No identificado					
6	TvCP12	TVAG_410260	188,87	16,83	3	35.0 / 7.23
7	Purina nucleoside fosforilasa	TVAG_127180	72,15	10,17	2	25.9 / 6.33
	TvLEGU-2	TVAG_385340	58,14	10,20	3	43.5 / 6.40
	Adenosil homocisteinasa	TVAG_210320	14,69	5,56	2	53.5 / 5.94
8	TvLEGU-2	TVAG_385340	98,64	10,20	3	43.5 / 6.40
9	TvCP39	TVAG_298080	370,47	17,38	5	33.6 / 6.62
10	Transaldolasa	TVAG_272910	144,59	18,10	4	35.0 / 5.63
11	TvLEGU-1	TVAG_426660	349,62	13,40	3	42.9 / 6.60
12	TvLEGU-1	TVAG_426660	410,07	13,40	3	42.9 / 6.60
13	TvCP2	TVAG_057000	126,78	17,20	4	34.6 / 8.13
	Alanina dehidrogenasa 2	TVAG_235800	63,62	9,92	2	27.8 / 8.16
14	TvCP2	TVAG_057000	224,64	17,20	4	34.6 / 8.13
	TvCP4-like	TVAG_355480	65,42	12,13	2	33.8 / 7.25
15	Adenosil homocisteinasa	TVAG_210320	694,55	46,09	6	53.5 / 5.94
	Adenosil homocisteinasa	TVAG_405240	495,65	35,39	2	53.4 / 5.82
	TvCP2	TVAG_057000	52,67	8,28	2	34.6 / 8.13
16	Transaldolasa	TVAG_272910	139,20	18,73	4	35.0 / 5.63
	TvCP3	TVAG_090100	48,70	9,12	2	35.7 / 7.59
17	Transaldolasa	TVAG_272910	250,52	33,33	7	35.0 / 5.63
18	TvCP3	TVAG_090100	384,66	15,72	3	35.7 / 7.59
	TvCP2	TVAG_057000	56,17	12,74	3	34.6 / 8.13
	Adenosil homocisteinasa	TVAG_210320	14,25	5,35	2	53.5 / 5.94
19	TvCP3	TVAG_090100	497,53	20,13	4	35.7 / 7.59
	TvCP2	TVAG_057000	109,03	17,20	3	34.6 / 8.13
20	TvCP2	TVAG_057000	486,48	17,83	5	34.6 / 8.13
	TvCP4-like	TVAG_355480	255,02	12,13	3	33.8 / 7.25
21	TvCP2	TVAG_057000	607,62	24,84	7	34.6 / 8.13
	TvCP4-like	TVAG_355480	239,45	13,77	3	33.8 / 7.25
	TvCP3	TVAG_090100	238,24	13,52	2	35.7 / 7.59
	TvICP-2	TVAG_272260	64,56	40,66	3	9.8 / 7.01
22	TvCP4-like	TVAG_355480	207,15	19,67	5	33.8 / 7.25
23	TvCP4-like	TVAG_355480	159,17	15,08	4	33.8 / 7.25
	TvCP2	TVAG_057000	87,76	8,28	2	34.6 / 8.13

Tabla 7. Identificación por LC MS/MS de proteínas en los extractos resistentes a proteasas de parásitos crecidos en RG.

Spot	Proteína	TrichDB (ID)	Score	Covertura (%)	# Péptidos	MW [kDa] / pI
1	Tautomerasa	TVAG_150280	65,15	21,83	2	16.0 / 6.38
2	Tautomerasa	TVAG_150280	77,04	15,49	1	16.0 / 6.38
	Proteína hipotética	TVAG_369910	18,31	0,34	1	657.7 / 5.47
	Proteína contenedora del dominio DnaJ	TVAG_032470	3,70	2,52	1	91.7 / 8.47
	Proteína de inclusión viral tipo-A	TVAG_350080	3,39	0,50	1	209.8 / 4.86
3	Proteína hipotética	TVAG_487100	309,64	17,79	3	17.9 / 6.30
4	Proteína hipotética	TVAG_487100	406,67	25,15	4	17.9 / 6.30
5	Proteína hipotética	TVAG_487100	103,54	25,15	4	17.9 / 6.30
6	TvCP12	TVAG_410260	131,37	9,52	2	35.0 / 7.23
7	TvCP12	TVAG_410260	142,12	9,52	2	35.0 / 7.23
8	Proteína hipotética	TVAG_487100	124,07	8,59	2	17.9 / 6.30
	TvCP4-like	TVAG_355480	55,36	9,18	2	33.8 / 7.25
9	TvCP4-like	TVAG_355480	147,86	9,18	3	33.8 / 7.25
10	TvCP4-like	TVAG_355480	251,54	15,08	5	33.8 / 7.25
11	TvLEGU-1	TVAG_426660	231,97	13,40	3	42.9 / 6.60
12	Transaldolasa	TVAG_272910	249,78	31,43	7	35.0 / 5.63
13	TvLEGU-2	TVAG_385340	184,55	14,80	4	43.5 / 6.40
14	TvLEGU-2	TVAG_385340	352,57	14,80	4	43.5 / 6.40
15	TvcadD	TVAG_336300	176,83	27,57	6	40.8 / 5.05
16	Transaldolasa	TVAG_272910	426,98	41,90	9	35.0 / 5.63
	TvCP4	Q27109	102,30	9,59	3	32.3 / 7.50
	TvCP2	TVAG_057000	53,97	12,74	3	34.6 / 8.13
17	TvCP2	TVAG_057000	187,54	17,20	4	34.6 / 8.13
	TvCP4-like	TVAG_355480	86,86	13,77	2	33.8 / 7.25
	TvICP-2	TVAG_272260	83,53	30,77	2	9.8 / 7.01
	Adenosil homocisteinasa	TVAG_210320	83,02	5,35	2	53.5 / 5.94
18	TvCP2	TVAG_057000	79,18	12,74	3	34.6 / 8.13
	TvCP4	Q27109	56,52	13,01	4	32.3 / 7.50
19	TvCP2	TVAG_057000	83,95	12,74	3	34.6 / 8.13
	TvCP4-like	TVAG_355480	34,87	8,52	1	33.8 / 7.25
20	Glicosil hidrolasa	TVAG_088640	136,76	20,20	3	22.3 / 4.68
	Piridina nucleotide disulfuro oxidorreductasa	TVAG_049830	101,68	6,77	5	94.9 / 6.04
21	Adenosil homocisteinasa	TVAG_210320	417,97	21,60	3	53.5 / 5.94
	Adenosil homocisteinasa	TVAG_405240	293,46	19,34	2	53.4 / 5.82
	TvCP4	Q27109	42,17	5,48	2	32.3 / 7.50
	TvCP2	TVAG_057000	36,11	8,92	2	34.6 / 8.13
22	No indentificado					
23	Transaldolasa	TVAG_272910	112,69	26,67	6	35.0 / 5.63
	Piridina nucleotide disulfuro oxidorreductasa	TVAG_049830	85,44	9,18	5	94.9 / 6.04
	Piridina nucleotide disulfuro oxidorreductasa	TVAG_263800	53,96	5,28	4	95.5 / 5.40
24	Laminina A	TVAG_215920	291,64	11,76	6	71.3 / 5.63
25	TvCP2	TVAG_057000	78,88	8,92	2	34.6 / 8.13
	TvICP-2	TVAG_272260	54,96	23,08	2	9.8 / 7.01

Capítulo X

Discusión

En este estudio demostramos que la glucosa regula de manera diferencial la expresión de los dos genes que codifican para la proteína TvTIM en *T. vaginalis* e induce la expresión y relocalización de TvTIM hacia la superficie del parásito. Además, la proteína TvTIM asociada a la superficie de tricomonas funciona uniéndose de manera específica a Lm y Fn, una función alternativa como receptor, mediando la adhesión de los parásitos a componentes de matriz extracelular.

La mayoría de las enzimas que participan en el metabolismo de la glucosa son codificadas por una o más copias de genes en el genoma de *T. vaginalis* (38). Esta es una característica que en otros microorganismos se ha asociado con la expresión diferencial de genes, la relocalización subcelular de proteínas y la adquisición de nuevas funciones (88, 89). En este trabajo estudiamos a la proteína TvTIM de *T. vaginalis* codificada por genes duplicados (*tvtim1* y *tvtim2*). A pesar de que las secuencias de nucleótidos de ambos genes “*tvtim*” son 97.6% idénticas, nuestros resultados mostraron que se expresan diferencialmente en respuesta a glucosa (*tvtim1* se regula negativamente y *tvtim2* se regula positivamente) (Fig. 4). Estos resultados son consistentes con otros estudios transcriptómicos que muestran la sobreexpresión de *tvtim2*, pero no de *tvtim1* en parásitos crecidos en alta glucosa (73), o parásitos en contacto con células epiteliales vaginales (14), sugiriendo que la transcripción de los genes *tvtim* es regulada diferencialmente por glucosa y durante la infección *in vitro*.

El efecto de la glucosa sobre la expresión diferencial de genes *tim* se ha reportado en otros microorganismos. Por ejemplo, la expresión del gen *tim* de *S. cerevisiae* es regulada positivamente por glucosa (90), similar al gen *tvtim2* de *T. vaginalis*. Sin embargo, en *C. albicans*, otro patógeno que causa infección vaginal,

la expresión del gen *tim* es constitutiva independientemente de la concentración de glucosa (90).

En levaduras la expresión diferencial de genes duplicados se ha descrito como un mecanismo mediado por diferencias en los elementos reguladores que controlan la expresión de cada gen. Una característica que además se ha asociado con la aparición de proteínas con nuevas funciones (91). Por lo tanto, es necesario el estudio de los elementos reguladores que controlan la expresión de los genes *tvtim* en *T. vaginalis*, para entender los mecanismos de expresión diferencial de estos genes inducidos por glucosa y el contacto celular.

También demostramos que TvTIM es modulada positivamente por glucosa a nivel de proteína (Fig. 5). Las secuencias de aminoácidos entre ambas proteínas TvTIM son 98.4% idénticas, difiriendo solo en 4 aminoácidos. Estas pequeñas diferencias son responsables de alteraciones en las propiedades fisicoquímicas, estabilidad del dímero y actividad enzimática, entre ambas TvTIM (71 y 92). En este estudio nos fue imposible diferenciar entre TvTIM1 y TvTIM2 utilizando el anticuerpo anti-TvTIMr generado contra la proteína TvTIM2r y que reconoce a ambas proteínas recombinantes. Sin embargo, tomando en cuenta el efecto opuesto de la glucosa sobre la expresión de los genes *tvtim*; nuestros datos sugieren que el aumento en la cantidad de proteína TvTIM en parásitos crecidos en AG podría corresponder a la proteína TvTIM2. Esto también podría aplicarse para la proteína TvTIM asociada a la superficie de *T. vaginalis*, donde observamos un incremento de TvTIM en superficie en AG. Esta hipótesis es consistente con los resultados del análisis proteómico de exosomas, donde TvTIM2, pero no TvTIM1, se encontró asociada con las proteínas exosomales de *T. vaginalis* (93), sugiriendo que TvTIM2 es parte de las proteínas secretadas a través de una vía de tráfico vesicular no convencional (94). Por lo tanto, experimentos futuros ayudarán a determinar si solo una o ambas proteínas TvTIM se localizan en la superficie de *T. vaginalis* para adquirir funciones “moonlighting” como proteínas de unión a Lm y Fn en AG.

También encontramos que la hexoquinasa es modulada positivamente por glucosa, mientras que la cantidad de proteína α -enolasa y enzima málica/AP65, no se vieron afectadas por la glucosa (Fig. 3), demostrando que los niveles de glucosa en el medio regulan la cantidad de algunas proteínas glucolíticas en *T. vaginalis*. El comportamiento de las proteínas TvTIM de *T. vaginalis* es similar al observado en la proteína TIM de *Fusobacterium varium*, que se incrementa específicamente en respuesta a la presencia de glucosa en el medio (95) que es consistente con la regulación positiva de la TvTIM2 por glucosa observada también en *T. vaginalis*.

Además de la localización citoplasmática esperada, TvTIM también mostró una segunda localización en la superficie de *T. vaginalis* en AG, adquiriendo además una nueva función como receptor de Lm y Fn (Fig. 6). Este comportamiento es similar al de otras proteínas glucolíticas de *T. vaginalis* como TvGAPDH y TvENO con localizaciones alternativas en la superficie del parásito, en respuesta a la exposición a hierro y al contacto celular con células VECs, respectivamente (43, 44). En este trabajo demostramos que la glucosa es otro factor ambiental que regula diferencialmente la expresión de genes, así como la cantidad y localización en superficie de enzimas glucolíticas en *T. vaginalis* como la TvTIM.

El mecanismo por el cual TvTIM llega a la superficie de *T. vaginalis* en diferentes condiciones ambientales no es claro, debido a que esta enzima no tiene dominios transmembranales, ni secuencia señal de exporte, similar a otras proteínas “moonlighting” (50, 56). Sin embargo, se han propuesto vías alternativas para su transporte hacia la membrana del parásito. Por ejemplo, a través de vesículas de secreción como exosomas que se generan a partir de cuerpos multivesiculares intracelulares y que son liberados tras la fusión con la membrana plasmática (94, 102).

Nuestros resultados a partir de inmunomarcaje con oro y MET para localizar a la proteína TvTIM apoyan la presencia de vías secretoras no convencionales involucradas en el tráfico de TvTIM del citoplasma hacia la membrana plasmática, principalmente a través de vesículas de secreción. Sin embargo, una vía independiente de vesículas también fue evidente (Fig. 7). Encontramos que TvTIM también se une a la cara interna y externa de vesículas cercanas o en proceso de fusión con la membrana plasmática (Fig. 7). Además encontramos que después de la fusión de estas vesículas con la membrana plasmática, TvTIM se encuentra expuesta a la cara externa de la membrana de los parásitos. De manera interesante TvTIM2 pero no TvTIM1 se ha encontrado asociada con proteínas contenidas en los exosomas de *T. vaginalis*, lo que sugiere que TvTIM2 es la proteína que se relocaliza a la membrana del parásito para adquirir funciones alternativas como receptor de Lm y Fn en AG.

La posibilidad de que la afinidad de TvTIM por los lípidos de las membranas esté relacionada a modificaciones postraduccionales es una hipótesis factible que necesita ser confirmada. En apoyo a esta hipótesis, análisis *in silico* de las secuencias TvTIM muestran que ambas proteínas contienen sitios putativos para S-palmitoilación (cluster C) y N-miristoilación; ambas modificaciones podrían estar involucradas en la interacción de las proteínas TvTIM con las membranas celulares (96-98). Adicionalmente identificamos sitios putativos para fosforilación (en S y T) que podrían ser importantes para la interacción con otras proteínas o sustratos, y sitios para N- y O- glicosilación que podrían ser relevantes para la secreción de las proteínas (79-81). Sin embargo, futuros experimentos son necesarios para confirmar estas posibles modificaciones postraduccionales y evaluar su aportación en la localización de superficie y función “moonlighting” de TvTIM y otras enzimas glucolíticas.

Otros estudios han demostrado que algunas proteínas glucolíticas están directamente asociadas con la superficie extracelular. Estas proteínas pueden interactuar, ya sea con los lípidos de la membrana o con proteínas integrales de

membrana, a través de una combinación de interacciones no covalentes, incluidas interacciones hidrofóbicas y electrostáticas (60, 64). Un típico ejemplo de proteínas glucolíticas asociadas directamente con la superficie son las proteínas GAPDH y TIM, que se unen de manera no covalente a la cara externa de la pared celular de *Lactobacillus plantarum* (60).

Los resultados de los ensayos de inhibición y de competencia (Fig. 13) mostraron la inhibición de la adhesión de parásitos vivos a Lm y Fn por el anticuerpo α -TvTIMr, o por la competencia con ambas recombinantes TvTIM, confirmando la participación de las proteínas TvTIM asociadas a la superficie de *T. vaginalis* como un nuevo receptor de Lm y Fn que es utilizado por el parásito para interactuar con estas proteínas de MEC (99) en presencia de altas concentraciones de glucosa. Estos resultados son consistentes con la función identificada para la proteína TIM en la superficie de otros microorganismos patógenos como *P. brasiliensis* (58) y *S. aureus* (59). Estudios adicionales son necesarios para identificar y caracterizar los sitios de unión de TvTIM a Lm y Fn.

Nuestros resultados *in vitro* muestran que la glucosa es un importante nutriente para la biología de *T. vaginalis*: sin embargo, desconocíamos si *T. vaginalis* se exponía a cambios en los niveles de glucosa durante la infección. En este estudio determinamos la concentración de glucosa en secreciones vaginales de mujeres Mexicanas con tricomoniasis y con otras infecciones (Tabla 1). Nuestros resultados muestran que el nivel medio de glucosa libre fue de 10.25 mM, con valores individuales entre 0.3-36.65 mM. Estos valores están en el rango de los reportados recientemente (56.57 mM) (33). Comparado con el valor más alto de glucosa detectado en las secreciones vaginales (36.65 mM), 50 mM de glucosa utilizada *in vitro* para la condición de AG, no se encontró en estas muestras. Sin embargo, como se demostró en la Fig. 6B, los parásitos son capaces de responder solo con la presencia de glucosa exógena en el medio, promoviendo la relocalización de TvTIM a la membrana plasmática como se observó en las colocalizaciones con el marcador de superficie (Fig. 6).

En este trabajo utilizamos la concentración máxima de glucosa (50 mM) previamente reportada (73) para fines comparativos entre las condiciones de RG y AG (Fig. 6). Sin embargo, nuestros datos muestran que las concentraciones de glucosa encontradas en al menos el 67% de las mujeres con tricomoniasis (Tabla 1) pueden disparar la relocalización de TvTIM a la superficie de los parásitos durante la infección y promover la adhesión a Lm y Fn (Fig. 12). Sin embargo, no descartamos la posibilidad de que el parásito se encuentre con concentraciones cercanas a 50 mM en otros grupos de mujeres infectadas como personas con diabetes mellitus (56 mM de glucosa en secreciones vaginales).

Por otro lado, la condición de RG (≤ 1 mM) se detectó en el 33% de las muestras con tricomoniasis, en el 20% de las mujeres con microbiota normal, pero con otros problemas ginecológicos, en el 32% de mujeres con cervicovaginitis, pero sin *T. vaginalis* y en el 7% de las mujeres con infección vaginal por otros patógenos. Nuestros resultados muestran una gran variabilidad en los niveles de glucosa libre entre las mujeres incluidas en este estudio que son consistentes con reportes previos (33), sugiriendo que *T. vaginalis* podría estar expuesta a fluctuaciones de glucosa durante la infección. Teniendo en cuenta estos resultados se propone que cambios en los niveles glucosa vaginal podrían modular la interacción *in vivo* de *T. vaginalis* con moléculas de MEC. Similar a *T. vaginalis*, estudios en *C. albicans* otro patógeno responsable de la candidiasis vulvo-vaginal muestran que este hongo tiene una alta prevalencia entre las mujeres con diabetes mellitus, posiblemente relacionado a su estado hiperglicémico que promueve la colonización del tracto vaginal en este grupo (100, 101).

A pesar de ser un tema controversial para muchos investigadores en el campo de *T. vaginalis*, se ha incrementado el número de reportes que demuestran la presencia de enzimas glucolíticas, ya sea secretadas o asociadas a la superficie de bacterias, parásitos protozoarios, helmintos y hongos incluyendo a la TIM (47,

56). La TIM también tiene funciones “moonlighting” en la superficie de otros microorganismos patógenos (60, 61, 62) como *P. brasiliensis* (58) que también se une a las mismas proteínas de MEC y *S. aureus* que une a plasminógeno humano (59). La proteína TIM en la superficie de *L. plantarum* funciona como una adhesina que tiene un importante papel en la citoadherencia a células Caco-2 (60). Una función similar ha sido descrita para la proteína TIM localizada en la superficie de *Mycoplasma gallisepticum* que juega un importante papel en la citoadherencia a células DF-1 (61). Recientemente, la proteína TIM también se identificó en el proteoma de superficie de *E. histolytica* (64) y en el proteoma de la pared celular de *C. albicans* (62); en este último participa junto con otras proteínas de superficie, en un mecanismo de protección contra estrés oxidativo.

Una posible explicación a la localización de enzimas glucolíticas sobre la superficie de patógenos son las ventajas adaptativas que este mecanismo proporciona a los microorganismos durante la infección; por ejemplo, las enzimas glucolíticas pueden actuar como ligandos para una variedad de componentes del hospedero. Esta unión permitiría a los patógenos el reconocimiento de la célula hospedera para la citoadherencia e invasión, modular los sistemas hemostáticos e inmunológicos, promover la angiogénesis y la adquisición de nutrientes (102); incluso como moléculas protectoras de estrés oxidativo, como ocurre para *C. albicans* (62). En el caso de *T. vaginalis*, podemos postular lo mencionado previamente (43, 44), que los sitios focales de erosión en el epitelio vaginal debido a la actividad proteolítica del parásito pueden resultar en el acceso de *T. vaginalis* a componentes de MEC y proteínas de la membrana basal, tales como Lm y Fn, donde la proteína TvTIM asociada a la superficie podría entonces contribuir a la adhesión de los parásitos a MEC, una interacción que parece ser requerida para el mantenimiento de una infección crónica por este parásito de transmisión sexual.

La proteína TIM también tiene funciones “moonlighting” extracelulares en parásitos helmintos. Por ejemplo, TIM es secretada por *Brugia malayi* y *Schistosoma mansoni* durante la infección, adquiriendo nuevas funciones como

blanco de anticuerpos como un mecanismo de evasión de la respuesta inmune del hospedero (65-67). Nuestros resultados *in vitro* mostraron la secreción de TvTIM en condiciones de AG (Fig. 14), a través de una vía mediada por vesículas de secreción (Fig. 7). Confirmamos además que TvTIM2 es la proteína presente en los productos de secreción de *T. vaginalis* (Tabla 3), así como en las secreciones vaginales de mujeres con tricomoniasis (Tabla 5). Estos datos son consistentes con la identificación de TvTIM2 entre las proteínas contenidas en los exosomas de *T. vaginalis* (93), además de que observamos marca de TvTIM en vesículas tipo MVB (Fig. 7). Experimentos adicionales son necesarios para identificar posibles funciones extracelular de TvTIM durante la infección.

En *T. vaginalis* la secreción de proteínas glucolíticas se ha propuesto como un mecanismo implicado en la reasociación de estas proteínas a la membrana del parásito después de ser secretadas (43, 44). De manera interesante, en nuestros resultados de secreción *in vitro*, además de TvTIM, identificamos otras enzimas glucolíticas, entre ellas a la TvGAPDH (Tabla 3), previamente reportada como una proteína que se secreta y se reasocia a la superficie de *T. vaginalis* donde exhibe funciones “moonlighting” como receptor para Fn (43), una función también demostrada para la proteína TvTIM asociada a la superficie del parásito.

Un hallazgo sorprendente en este trabajo fue la localización de las proteínas TvTIM de *T. vaginalis* en el interior de las células epiteliales de la vagina de pacientes con tricomoniasis, en la membrana, en el citoplasma y rodeando o dentro de los núcleos (Fig. 16). Hasta el momento no existen reportes que soporten la localización nuclear de TIM en otros microorganismos o células; sin embargo, si existen numerosos reportes de proteínas glucolíticas con localización nuclear en células de mamíferos, hongos y parásitos protozoarios, exhibiendo funciones “moonlighting” (103-105). Por ejemplo, la localización de GAPDH en el núcleo de células de mamífero es esencial para la fusión de membranas nucleares y en la regulación transcripcional de genes de histonas en condiciones de estrés hiperglicémico (103). La proteína hexoquinasa se localiza en el núcleo de *S.*

cerevisiae en condiciones de restricción de glucosa, adquiriendo funciones “moonlighting” como regulador transcripcional de genes *Mig1* (104). Otros reportes muestran que la enolasa se localiza en el núcleo de *E. histolytica* en restricción de glucosa, exhibiendo funciones “moonlighting” como un regulador de la actividad enzimática de la metiltransferasa *Dnmt2* (105). Estos reportes sugieren que es posible la localización nuclear de la proteína TvTIM. Por lo tanto, nuestra hipótesis es que la proteína TvTIM de *T. vaginalis* se secreta durante la infección posiblemente en exosomas e interacciona, se internaliza y se localiza en los núcleos de las célula VEC, exhibiendo funciones “moonlighting” posiblemente alterando la regulación de la célula hospedera. Sin embargo, experimentos adicionales son necesarios para demostrarlo.

Nuestros resultados mostraron que *T. vaginalis* está expuesta a cambios drásticos en la concentración de glucosa libre durante la infección vaginal (Tabla 1). En este estudio evaluamos el efecto de la glucosa sobre la virulencia de *T. vaginalis* y encontramos que en RG se incrementa la capacidad citotóxica (Fig. 17), así como la cantidad y actividad proteolítica de algunas cisteína proteinasas (Fig. 18) que participan en la virulencia de *T. vaginalis*. De manera interesante se encontró RG en el 33% las muestras de SV obtenidas de mujeres con tricomoniasis, sugiriendo que la glucosa podría estar modulando los mecanismos de virulencia de *T. vaginalis* durante la infección vaginal. La regulación de la virulencia por los niveles de glucosa en el medio, se ha reportado para otros patógenos. Por ejemplo, condiciones de RG, incrementan la capacidad citotóxica, hemolítica y de adhesión de *E. histolytica* (106).

T. vaginalis posee múltiples proteinasas principalmente del tipo cisteína (CPs). Algunas CPs son diferencialmente moduladas por hierro y juegan un rol esencial en la virulencia de *T. vaginalis*, incluida la citoadherencia (TvLEGU-1 y TvCP30), hemólisis (TvCP4), citotoxicidad (TvCP39 y TvCP65) e inducción de apoptosis (TvCP2) (34, 107). En este estudio analizamos el degradoma por 2-DE y espectrometría de masas de las proteínas presentes en extractos resistentes a

proteasas de *T. vaginalis* en RG y AG (Fig. 19). Nuestros resultados mostraron perfiles diferenciales de proteínas en 2-D observándose un mayor número de puntos de proteínas en RG (Fig. 19). La identificación por espectrometría de masas de los puntos reveló que TvCP2 y TvCP4 fueron las CPs más abundantes y ampliamente distribuidas en ambas condiciones de glucosa. Reportes indican que TvCP4 es regulada positivamente por hierro y media la actividad hemolítica de *T. vaginalis* en esta condición (76). Sin embargo, en este estudio demostramos que TvCP4 es regulada negativamente por glucosa, sugiriendo su participación en los mecanismos de citotoxicidad de *T. vaginalis*. De manera interesante, este resultado sugiere que las CPs de *T. vaginalis* pueden cambiar entre funciones dependiendo de estímulos ambientales y su posible asociación con otras CPs de *T. vaginalis*.

Capítulo XI

Conclusión

La glucosa es otro factor ambiental que afecta la biología de *Trichomonas vaginalis*, promueve el crecimiento de los parásitos, modula negativamente la citotoxicidad y favorece la interacción de *T. vaginalis* con las proteínas de matriz extracelular, Lm y Fn. Altas concentraciones de glucosa modulan la expresión y relocalización de las TvTIMs a la superficie de los parásitos donde participan como receptores para Lm y Fn. Las TvTIM se encuentran presentes en las secreciones vaginales y en las células VECs de mujeres con tricomoniasis sugiriendo su participación durante la infección.

Capítulo XII

Perspectivas

1. Demostrar cuál de las dos proteínas TvTIM (TvTIM1 o TvTIM2) se localiza en la superficie de *T. vaginalis*.
2. Identificar y caracterizar los elementos de respuesta a glucosa que modulan la expresión diferencial de los genes *tvTim*.
3. Estudiar las vía de secreción y/o localización a la membrana de TvTIM en el parásito, así como posibles modificaciones postraduccionales (lipidación, fosforilación y glicosilación) que lo promuevan.
4. Identificar y caracterizar los dominios en las proteínas TvTIM responsables de la unión a laminina y fibronectina.
5. Determinar si la TvTIM es inmunogénica en pacientes con tricomoniasis..

6. Caracterizar la vía de entrada y la función de las proteínas TvTIM en células VECs.
7. Corroborar la localización de TvTIM en el núcleo de las células VEC, e identificar su función.

Capítulo XIII

Referencias.

1. World Health Organization. (2012) Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections-2008.
2. Poole DN, and McClelland RS. (2013) Global epidemiology of *Trichomonas vaginalis*. Sex Transm Infect 89:418-422.
3. Harp DF, Chowdhury I. (2011) Trichomoniasis: evaluation to execution. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 157:3-9.
4. Petrin D, Delgaty K, Bhatt R, Garber G. (1998) Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. Clin Microbiol Rev 11:300-317.
5. Garber GE, Sibau L, Ma R, Proctor EM, Shaw CE, Bowie WR. (1987) Cell culture compared with broth for detection of *Trichomonas vaginalis*. J Clin Microbiol 25:1275-1279.
6. McCann JS. (1974) Comparison of direct microscopy and culture in the diagnosis of trichomoniasis. Br J Vener Dis 50:450-452.
7. Rivers CA, Muzny CA, Schwebke JR. (2013) Diagnostic rates differ on the basis of the number of read days with the use of the InPouch culture system for *Trichomonas vaginalis* screening. J Clin Microbiol 51:3875-3876.
8. Huppert JS, Mortensen JE, Reed JL, Kahn JA, Rich KD, Miller WC, Hobbs MM. (2007) Rapid antigen testing compares favorably with transcription-mediated amplification assay for the detection of *Trichomonas vaginalis* in young women. Clin Infect Dis 45:194-198.
9. Hobbs MM, Seña AC. (2013) Modern diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection. Sex Transm Infect. 89:434-438.
10. Löfmark S, Edlund C, Nord CE. (2010) Metronidazole is still the drug of choice for treatment of anaerobic infections. Clin Infect Dis 1.S16-23.
11. Honigberg BM, and King VM. (1964) Structure of *Trichomonas vaginalis* Donne. J Parasitol 50:345-364.

12. Arroyo R, González-Robles A, Martínez-Palomo A, Alderete JF. (1993) Signalling of *Trichomonas vaginalis* for amoeboid transformation and adhesion synthesis follows cytoadherence. *Mol Microbiol* 7:299-309.
13. Benchimol M. (2004) Trichomonads under microscopy. *Microsc Microanal* 10:528-550.
14. Gould SB, Woehle C, Kusdian G, Landan G, Tachezy J, Zimorski V, Martin W. F (2013) Deep sequencing of *Trichomonas vaginalis* during the early infection of vaginal epithelial cells and amoeboid transition. *Int J Parasitol* 43:707-719.
15. Müller M. (1988) Energy metabolism of protozoa without mitochondria. *Annu Rev Microbiol* 42:465-488.
16. Ter Kuile BH (1994) Adaptation of the carbon metabolism of *Trichomonas vaginalis* to the nature and availability of the carbon source. *Microbiology* 140:2503-2510.
17. Huffman RD, Nawrocki LD, Wilson WA, Brittingham A. (2015) Digestion of glycogen by a glucosidase released by *Trichomonas vaginalis*. *Exp Parasitol* 159:151-159.
18. Ter Kuile, BH, and Müller M. (1995) Maltose utilization by extracellular hydrolysis followed by glucose transport in *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology* 110:37-44.
19. Ter Kuile BM, and Müller M. (1993) Interaction between facilitated diffusion of glucose across the plasma membrane and its metabolism in *Trichomonas vaginalis*. *FEMS Microbiol Lett* 110:27-31.
20. Lindmark DG, Eckenrode BL, Halberg LA, Dinbergs, ID. (1989) Carbohydrate, energy and hydrogenosomal metabolism of *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. *J Protozool* 36:214-216.
21. Steinbuchel A, and Müller M. (1986) Anaerobic pyruvate metabolism of *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes. *Mol Biochem Parasitol* 20:57-65.
22. Lowe PN and Rowe AF. (1986) Aminotransferase activities in *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol* 21:65-74.

23. Knodler LA, Edwards MR, Schofield PJ. (1994) The intracellular amino acid pools of *Giardia intestinalis*, *Trichomonas vaginalis*, and *Crithidia luciliae*. *Exp Parasitol* 79:117-125.
24. Gorrell TE. (1985) Effect of culture medium iron content on the biochemical composition and metabolism of *Trichomonas vaginalis*. *J Bacteriol* 161:1228-1230.
25. Huffman RD, Nawrocki LD, Wilson WA, Brittingham A. (2015) Digestion of glycogen by a glucosidase released by *Trichomonas vaginalis*. *Exp Parasitol* 159:151-159.
26. Gregoire AT. (1963) Carbohydrates of human vaginal tissue. *Nature* 198:996.
27. Gregoire AT, Kandil O, Ledger WJ. (1971) The glycogen content of human vaginal epithelial tissue. *Fertil Steril* 22:64-68.
28. Sumawong V, Gregoire AT, Johnson WD, Rakoff AE. (1962) Identification of carbohydrates in the vaginal fluid of normal females. *Fertil Steril* 13:270-80.
29. Rajan N, Cao Q, Anderson BE, Pruden DL, Sensibar J, Duncan JL, Schaeffer AJ. (1999) Role of glycoproteins and oligosaccharides found in human vaginal fluid in bacterial adherence. *Infect Immun* 67:5027-5032.
30. Mirmonseft P, Hotton AL, Gilbert D, Burgad D, Landay A, Weber KM, Cohen M, Ravel J, Spear GT. (2014) Free Glycogen in vaginal fluids is associated with *Lactobacillus* colonization and low vaginal pH. *PLoS One* 9:e102467.
31. Rendón-Maldonado JG, Espinosa-Cantellano M, González-Robles A, Martínez-Palomo A. (1998) *Trichomonas vaginalis*: in vitro phagocytosis of lactobacilli, vaginal epithelial cells, leukocytes, and erythrocytes. *Exp Parasitol* 89:241-250.
32. Lehker MW, Chang TH, Dailey DC, Alderete JF. (1990) Specific erythrocyte binding is an additional nutrient acquisition system for *Trichomonas vaginalis*. *J Exp Med* 171:2165-2170.
33. Ehrström S, Yu A, Rylander, E. (2006) Glucose in vaginal secretions before and after oral glucose tolerance testing in women with and without recurrent vulvovaginal candidiasis. *Obstet Gynecol* 108:1432-1437.

34. Figueroa-Angulo EE, Rendón-Gandarilla FJ, Puente-Rivera J, Calla-Choque JS, Cárdenas-Guerra RE, Ortega-López J, Quintas-Granados LI, Álvarez-Sánchez ME, Arroyo R. (2012) The effects of environmental factors on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. *Microbes Infect* 14:1411-1427.
35. Ryan CM, de Miguel N, Johnson PJ. (2011) *Trichomonas vaginalis*: current understanding of host-parasite interaction. *Essays Biochem* 51:161-175.
36. Bastida-Corcuera FD, Okumura CY, Colocoussi A, Johnson PJ. (2005) *Trichomonas vaginalis* lipophosphoglycan mutants have reduced adherence and cytotoxicity to human ectocervical cells. *Eukaryot Cell* 4:1951-1958.
37. Okumura CY, Baum LG, Johnson PJ. (2008) Galectin-1 on cervical epithelial cells is a receptor for the sexually transmitted human parasite *Trichomonas vaginalis*. *Cell Microbiol* 10:2078-2090.
38. Carlton JM, Hirt RP, Silva JC, Delcher AL, Schatz M, Zhao Q, Wortman JR, Bidwell SL, Alsmark UCM, Besteiro S, Sicheritz-Ponten T, Noel CJ, Dacks JB, Foster PG, Simillion C, Van de Peer Y, Miranda-Saavedra D, Barton GJ, Westrop GD, Müller S, Dessi D, Fiori PL, Ren Q, Paulsen I, Zhang H, Bastida-Corcuera FD, Simoes-Barbosa A, Brown MT, Hayes RD, Mukherjee M, Okumura CY, Schneider R, Smith AJ, Vanacova S, Villalvazo M, Haas BJ, Perteua M, Feldblyum TV, Utterback TR, Shu CL, Osoegawa K, de Jong PJ, Hrdy I, Horvathova L, Zubacova Z, Dolezal P, Malik SB, Logsdon JM Jr, Henze K, Gupta A, Wang CC, Dunne RL, Upcroft JA, Upcroft P, White O, Salzberg SL, Tang P, Chiu CH, Lee YS, Embley TM, Coombs GH, Mottram JC, Tachezy J, Fraser-Liggett CM, Johnson PJ. (2007) Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science* 315:207-212.
39. Hirt RP, Noel CJ, Sicheritz-Ponten T, Tachezy J, Fiori PL (2007) *Trichomonas vaginalis* surface proteins: a view from the genome. *Trends Parasitol.* 23:540-547.
40. Arroyo R, Engbring J, Alderete JF (1992) Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*. *Mol Microbiol.* 6:853-862.

41. Moreno-Brito V, Yáñez-Gómez C, Meza-Cervantez P, Ávila-González L, Rodríguez MA, 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.* 7:245-258.
42. Garcia AF, Chang TH, Benchimol M, Klumpp DJ, Lehker MW, Alderete JF (2003) Iron and contact with host cell induce expression of adhesins on surface of *Trichomonas vaginalis*. *Mol Microbiol* 47:1207-1224.
43. Lama A, Kucknoor A, Mundodi V, Alderete JF (2009) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a surface-associated, fibronectin-binding protein of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun.* 77:2703-2711.
44. Mundodi V, Kucknoor AS, Alderete JF (2008) Immunogenic and plasminogen-binding surface-associated alpha-enolase of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun.* 76:523-531.
45. Jeffery CJ (1999). Moonlighting proteins. *Trends Biochem Sci* 24:8-11.
46. Jeffery CJ (2014). An introduction to protein moonlighting. *Biochem Soc Trans* 42:1679-1683.
47. Main M, Chen C, Amblee V, Liu H, Mathur T, Zwicke G, Zabad S, Patel B, Thakkar J, Jeffery CJ (2015) MoonProt: a database for proteins that are known to moonlight. *Nucleic Acids Res* 43:D277-282.
48. Jeffery CJ (2015). Why study moonlighting proteins? *Front Genet* 6:211.
49. Meyer-Siegler K, Mauro DJ, Seal G, Wurzer J, deRiel JK, Sirover MA (1991). A human nuclear uracil DNA glycosylase is the 37-kDa subunit of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:8460-8464.
50. Jeffery CJ (2016) Protein species and moonlighting proteins: very small changes in a protein's covalent structure can change its biochemical function. *J Proteomics* 134: 19-24.

51. Ostrovsky de Spicer P, Maloy S (1993) PutA protein, a membrane-associated flavin dehydrogenase, acts as a redox dependent transcriptional regulator. Proc Natl Acad Sci USA 90:4295-4298.
52. Wolff C, Parkinson JS (1988) Aspartate taxis mutants of the *Escherichia coli* tar chemoreceptor. J Bacteriol 170:4509-4515.
53. Mowbray SL, Koshland DE Jr (1990) Mutations in the aspartate receptor of *Escherichia coli* which affect aspartate binding. J Biol Chem 265:15638-15643.
54. Henderson B, Martin A (2011) Bacterial virulence in the moonlight: multitasking bacterial moonlighting proteins are virulence determinants in infectious disease. Infect Immun 79: 3476–3491.
55. Karkowska-Kuleta J, Kozik A (2014) Moonlighting proteins as virulence factors of pathogenic fungi, parasitic protozoa and multicellular parasites. Mol Oral Microbiol 29:270-283.
56. Amblee V, Jeffery CJ (2015) Physical features of intracellular proteins that moonlight on the cell surface. PLoS One 10:e0130575.
57. Wierenga RK, Kapetaniou EG, Venkatesan R. (2010) Triosephosphate isomerase: a highly evolved biocatalyst. Cell Mol Life 67:3961-3982.
58. Pereira LA, Bão SN, Barbosa MS, da Silva JL, Felipe MS, de Santana JM, Mendes-Giannini MJ, de Almeida Soares CM (2007) Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function. FEMS Yeast Res 7:1381-1388.
59. Furuya H, Ikeda R (2011) Interaction of triosephosphate isomerase from *Staphylococcus aureus* with plasminogen. Microbiol Immunol 55:855-862.
60. Ramiah K, van Reenen CA, Dicks LM (2008) Surface-bound proteins of *Lactobacillus plantarum* 423 that contribute to adhesion of Caco-2 cells and their role in competitive exclusion and displacement of *Clostridium sporogenes* and *Enterococcus faecalis*. Res Microbiol 159:470-475.

61. Bao S, Chen D, Yu S, Chen H, Tan L, Hu M, Qiu X, Ding C (2015) Characterization of triosephosphate isomerase from *Mycoplasma gallisepticum*. FEMS Microbiol Lett 362:fnv140.
62. Serrano-Fujarte I, López-Romero E, Cuéllar-Cruz M (2016) Moonlight-like proteins of the cell wall protect sessile cells of *Candida* from oxidative stress. Microb Pathog 90:22-33.
63. Seweryn K, Karkowska-Kuleta J, Wolak N, Bochenska O, Kedracka-Krok S, Kozik A, Rapala-Kozik M (2015) Kinetic and thermodynamic characterization of the interactions between the components of human plasma kinin-forming system and isolated and purified cell wall proteins of *Candida albicans*. Acta Biochim Pol 62:825-835.
64. Biller L, Matthiesen J, Kühne V, Lotter H, Handal G, Nozaki T, Saito-Nakano Y, Schümann M, Roeder T, Tannich E, Krause E, Bruchhaus I (2014) The cell surface proteome of *Entamoeba histolytica*. Mol Cell Proteomics 13:132-144.
65. Hewitson JP, Ruckerl D, Harcus Y, Murray J, Webb LM, Babayan SA, Allen JE, Kurniawan A, Maizels RM (2014) The secreted triosephosphate isomerase of *Brugia malayi* is required to sustain microfilaria production *in vivo*. PLoS Pathog 10:e1004133.
66. Cass CL, Johnson JR, Califf LL, Xu T, Hernandez HJ, Stadecker MJ, Yates JR, Williams DL (2007) Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* egg secretions. Mol Biochem Parasitol 155:84-93.
67. Harn DA, Gu W, Oligino LD, Mitsuyama M, Gebremichael A, Richter D (1992) A protective monoclonal antibody specifically recognizes and alters the catalytic activity of *Schistosoma* triosephosphate isomerase. J Immunol 148:562-567.
68. Henze K, Schnarrenberger C, Kellermann J, Martin W. 1994. Chloroplast and cytosolic triosephosphate isomerases from spinach: purification,

- microsequencing and cDNA cloning of the chloroplast enzyme. *Plant Mol Biol* 26:1961–1973.
69. Poysti NJ, Oresnik IJ. 2007. Characterization of *Sinorhizobium meliloti* triosephosphate isomerase genes. *J Bacteriol* 189:3445–3451.
70. Figueroa-Angulo EE, Estrella-Hernández P, Salgado-Lugo H, Ochoa-Leyva A, Gómez-Puyou A, Campos SS, Montero-Moran G, Ortega-López J, Saab-Rincón G, Arroyo R, Benítez-Cardoza CG, Briebe LG (2012) Cellular and biochemical characterization of two closely related triosephosphate isomerases from *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology* 139:1729 –1738.
71. Lara-González S, Estrella-Hernández P, Ochoa-Leyva A, Portillo-Téllez Del Carmen M, Caro-Gómez LA, Figueroa-Angulo EE, Salgado-Lugo H, Miranda-Ozuna JFT, Ortega-López J, Arroyo R, Briebe LG, Benítez-Cardoza CG (2014) Structural and thermodynamic folding characterization of triosephosphate isomerases from *Trichomonas vaginalis* reveals the role of destabilizing mutations following gene duplication. *Proteins* 82:22-33.
72. Huang KY, Huang PJ, Ku FM, Lin R, Alderete JF, Tang P (2012) Comparative transcriptomic and proteomic analyses of *Trichomonas vaginalis* following adherence to fibronectin. *Infect Immun* 80:3900-3911.
73. Huang KY, Chen YY, Fang YK, Cheng WH, Cheng CC, Chen YC, Wu TE, Ku FM, Chen SC, Lin R, Tang P (2014) Adaptive responses to glucose restriction enhance cell survival, antioxidant capability, and autophagy of the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. *Biochim Biophys Acta* 1840:53–64.
74. Meza-Cervantez P, González-Robles A, Cárdenas-Guerra RE, Ortega-López J, Saavedra E, Pineda E, Arroyo R (2011) Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase (PFO) is a surface-associated cell-binding protein in *Trichomonas vaginalis* and is involved in trichomonal adherence to host cells. *Microbiology* 157:3469-3482.

75. Rendón-Gandarilla FJ, Ramón-Luing 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.
76. Cárdenas-Guerra RE, Arroyo R, Rosa de Andrade I, Benchimol M, Ortega-López J (2013) The iron-induced cysteine proteinase TvCP4 plays a key role in *Trichomonas vaginalis* haemolysis. *Microbes Infect* 15:958-968.
77. Chamberlain LH, Lemonidis K, Sanchez-Perez M, Werno MW, Gorleku OA, Greaves J (2013) Palmitoylation and the trafficking of peripheral membrane proteins. *Biochem Soc Trans* 41:62-66.
78. Linder ME, Deschenes RJ (2007) Palmitoylation: policing protein stability and traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:74-84.
79. Kim YH, Kwak MS, Park JB, Lee SA, Choi JE, Cho HS, Shin JS (2016) N-linked glycosylation plays a crucial role in the secretion of HMGB1. *J Cell Sci* 129: 29-38.
80. Peter-Katalinic J (2005) Methods in enzymology: O-glycosylation of proteins. *Methods Enzymol* 405:139-171.
81. Schmidt C, Pommerenke H, Dürr F, Nebe B, Rychly J (1998) Mechanical stressing of integrin receptors induces enhanced tyrosine phosphorylation of cytoskeletally anchored proteins. *J Biol Chem* 273:5081-5085.
82. Garcia AF, Alderete J (2007) Characterization of the *Trichomonas vaginalis* surface-associated AP65 and binding domain interacting with trichomonads and host cells. *BMC Microbiol* 7:116.
83. Kummer S, Hayes GR, Gilberto RO, Beach DH, Lucas JJ, Singh BN (2008) Induction of human host cell apoptosis by *Trichomonas vaginalis* cysteine proteases is modulated by parasite exposure to iron. *Microb Pathog* 44:197-203.
84. Sommer U, Costello CE, Hayes GR, Beach DH, Gilbert RO, Lucas JJ, Singh BN (2005) Identification of *Trichomonas vaginalis* cysteine proteases that

- induce apoptosis in human vaginal epithelial cells. *J Biol Chem* 208:23853-23860.
85. Ramón-Luig L de L, Rendón-Gandarilla FJ, Puente-Rivera J, Ávila-González L, Arroyo R (2011) Identification and characterization of the immunogenic cytotoxic TvCP39 proteinase gene of *Trichomonas vaginalis*. *Int J Biochem Cell Biol* 43:1500-1511.
86. Arroyo R, Alderete JF, (1995) Two *Trichomonas vaginalis* surface proteinases bind to host epithelial cells and are related to levels of cytoadherence and cytotoxicity. *Arch Med Res* 26:279e285.
87. Mendoza-Lopez MR, Becerril-García C, Fattel-Facenda LV, Avila-Gonzalez L, Tachiquin-Ruiz ME, Ortega-Lopez J, Arroyo R (2000) CP30 a cysteine proteinase involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Infect Immun* 68: 4907e4912.
88. Li WH, Yang J, Gu X (2005) Expression divergence between duplicate genes. *Trends Genet* 21:602-607.
89. Qian W, Zhang J 2009. Protein subcellular relocalization in the evolution of yeast singleton and duplicate genes. *Genome Biol Evol* 1:198-204.
90. Rodaki A, Bohovych IM, Enjalbert B, Young T, Odds FC, Gow NA, Brown AJ. (2009) Glucose promotes stress resistance in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* 20:4845-4855.
91. Papp B, Pál C, Hurst LD (2003) Evolution of cis-regulatory elements in duplicated genes of yeast. *Trends Genet* 19:417-422.
92. Lara-González S, Estrella P, Portillo C, Cruces ME, Jimenez-Sandoval P, Fattori J, Migliorini-Figueira AC, Lopez-Hidalgo M, Diaz-Quezada C, Lopez-Castillo M, Trasviña-Arenas CH, Sanchez-Sandoval E, Gómez-Puyou A, Ortega-Lopez J, Arroyo R, Benítez-Cardoza CG, Briebe LG. (2015) Substrate-induced dimerization of engineered monomeric variants of triosephosphate isomerase from *Trichomonas vaginalis*. *PLoS One* 10:e0141747.

93. Twu O, de Miguel N, Lusting G, Stevens GC, Vashisht AA, Wohlschlegel JA, Johnson PJ. (2013) *Trichomonas vaginalis* exosomes deliver cargo to host cell and mediate host:parasite interactions. PLoS Pathog 9:e1003482.
94. Ding Y, Wang J, Wang J, Stierhof YD, Robinson DG, Jiang L. (2012) Unconventional protein secretion. Trends Plant Sc. 17: 606-615.
95. Potrykus J, Mahaney B, White RL, Bearne SL (2007) Proteomic investigations of glucose metabolism in the butyrate-producing gut anaerobe *Fusobacterium varium*. Proteomics 7:1839-1853.
96. Varland S, Osberg C, Arnesen T (2015) N-terminal modifications of cellular proteins: the enzymes involved their substrate specificities and biological effects. Proteomics 15:2385–2401.
97. Aicart-Ramos C, Valero RA, Rodriguez-Crespo I (2011) Protein palmitoylation and subcellular trafficking. Biochim Biophys Acta 1808:2981-2994.
98. Linder ME, Deschenes RJ (2007) Palmitoylation: policing protein stability and traffic. Nat Rev Mol Cell Biol 8:74-84.
99. Crouch ML, Alderete JF. (1999) *Trichomonas vaginalis* interactions with fibronectin and laminin. Microbiology 145:2835–2843.
100. Goswami R, Dadhwal V, Tejaswi S, Datta K, Paul A, Haricharan RN, Banerjee U, Kochupillai NP. (2000) Species-specific prevalence of vaginal candidiasis among patients with diabetes mellitus and its relation to their glycaemic status. J Infect 41:162-166.
101. Goswami D, Goswami R, Banerjee U, Dadhwal V, Miglani S, Lattif AA, Kochupillai N. 2006. Pattern of Candida species isolated from patients with diabetes mellitus and vulvovaginal candidiasis and their response to single dose oral fluconazole therapy. J Infect 52:111-117.
102. Gómez-Arreaza A, Acosta H, Quiñones W, Concepción JL, Michels PA, Avilán L. 2014. Extracellular functions of glycolytic enzymes of parasites: unpredicted use of ancient proteins. Mol Biochem Parasitol. 193:75-81.

103. Sirover MA. (2005) New nuclear functions of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in mammalian cells. *J Cell Biochem* 95:45-52.
104. Peláez R, Herrero P, Moreno F. (2009) Nuclear export of the yeast hexokinase 2 protein requires the Xpo1 (Crm1)-dependent pathway. *J Biol Chem* 284:20548-20555.
105. Tovy A, Siman Tov R, Gaentzsch R, Helm M, Ankri S. (2010) A new nuclear function of the *Entamoeba histolytica* glycolytic enzyme enolase: the metabolic regulation of cytosine-5 methyltransferase 2 (Dnmt2) activity. *PLoS Pathog* 6:e1000775.
106. Tovi 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.
107. Arroyo R, Cárdenas-Guerra RE, Figueroa-Angulo EE, Puente-Rivera J, Zamudio-Prieto O, Ortega-López J. (2015) *Trichomonas vaginalis* cysteine proteinases: iron response in gene expression and proteolytic activity. *Biomed Res Int* 2015:946787.

Capítulo XIV

Anexos

14.1 Publicación de resultados.

Parte del trabajo correspondiente a resultados obtenidos en los objetivos 1, 2, 3 y 4 del proyecto de investigación realizado durante el periodo doctoral se publicó en la revista "Infection and Immunity" y se anexa una copia a continuación. También incluimos una copia del artículo en el que participamos como coautor, con los resultados correspondientes a la localización celular de TvTIM en *T. vaginalis*.



The Glycolytic Enzyme Triosephosphate Isomerase of *Trichomonas vaginalis* Is a Surface-Associated Protein Induced by Glucose That Functions as a Laminin- and Fibronectin-Binding Protein

Jesús F. T. Miranda-Ozuna,^a Mar S. Hernández-García,^a Luis G. Brieba,^b Claudia G. Benítez-Cardoza,^c Jaime Ortega-López,^d Arturo González-Robles,^a Rossana Arroyo^a

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), Mexico City, Mexico^a; Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad, CINVESTAV-IPN, Irapuato, Guanajuato, Mexico^b; Laboratorio de Investigación Bioquímica, Programa Institucional en Biomedicina Molecular, ENMyH-IPN, Mexico City, Mexico^c; Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN, Mexico City, Mexico^d

Triosephosphate isomerase of *Trichomonas vaginalis* (TvTIM) is a 27-kDa cytoplasmic protein encoded by two genes, *tvtim1* and *tvtim2*, that participates in glucose metabolism. TvTIM is also localized to the parasite surface. Thus, the goal of this study was to identify the novel functions of the surface-associated TvTIM in *T. vaginalis* and to assess the effect of glucose as an environmental factor that regulates its expression and localization. Reverse transcription-PCR (RT-PCR) showed that the *tvtim* genes were differentially expressed in response to glucose concentration. *tvtim1* was overexpressed under glucose-restricted (GR) conditions, whereas *tvtim2* was overexpressed under glucose-rich, or high-glucose (HG), conditions. Western blot and indirect immunofluorescence assays also showed that glucose positively affected the amount and surface localization of TvTIM in *T. vaginalis*. Affinity ligand assays demonstrated that the recombinant TvTIM1 and TvTIM2 proteins bound to laminin (Lm) and fibronectin (Fn) but not to plasminogen. Moreover, higher levels of adherence to Lm and Fn were detected in parasites grown under HG conditions than in those grown under GR conditions. Furthermore, pretreatment of trichomonads with an anti-TvTIMr polyclonal antibody or pretreatment of Lm- or Fn-coated wells with both recombinant proteins (TvTIM1r and TvTIM2r) specifically reduced the binding of live parasites to Lm and Fn in a concentration-dependent manner. Moreover, *T. vaginalis* was exposed to different glucose concentrations during vaginal infection of women with trichomoniasis. Our data indicate that TvTIM is a surface-associated protein under HG conditions that mediates specific binding to Lm and Fn as a novel virulence factor of *T. vaginalis*.

Trichomonas vaginalis is a protozoan parasite responsible for human trichomoniasis, the most common nonviral sexually transmitted infection, which affects over 276 million people annually worldwide (1). Infection with this organism is associated with severe health complications, such as vaginitis, preterm delivery, urethritis, prostatitis, infertility, and increases in the risks of prostate and cervical cancer. It has also been implicated in facilitating the infection and transmission of human immunodeficiency virus (HIV) (2–4).

To establish an infection in the vagina, *T. vaginalis* must cross the vaginal mucus, adhere to the vaginal and cervical epithelia, and multiply in and colonize the urogenital tract (2, 5). The vagina is one of the most complex mucosal microenvironments and is constantly changing during the menstrual cycle. However, *in vitro* studies have shown that *T. vaginalis* adapts and responds to these changes, modulating the expression of multiple genes, including those encoding virulence factors, to maintain a chronic infection (6).

Energy generation is vital to the maintenance of chronic infection and depends on the availability of nutrients, such as iron and a carbon source. For *T. vaginalis*, glucose is the major energy source under both anaerobic and aerobic conditions. Within the cytoplasm, glycolysis is the initial step of the breakdown of glucose to pyruvate. Pyruvate is metabolized by fermentative oxidation in the hydrogenosome, which generates ATP through substrate-level phosphorylation (7).

These energetic pathways are regulated by the activity of multiple enzymes, some of which are classified as “moonlight-

ing” proteins that have alternative functions in the host-parasite relationship of *T. vaginalis*. For example, several hydrogenosomal enzymes (pyruvate:ferredoxin oxidoreductase [PFO]/AP120, malic enzyme/AP65, and α - and β -succinyl-coenzyme A [CoA] synthetase subunits/AP33 and AP51, respectively) can switch functions, depending on their cellular localizations, acting as metabolic enzymes in the hydrogenosome and cytoplasm or as adhesins on the parasite surface (8–10). Importantly, iron and cellular contact positively regulate the level of adherence by directly increasing adhesion synthesis (10).

Other cytoplasmic glycolytic enzymes of *T. vaginalis*, such as glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (TvGAPDH) and α -enolase (TvENO-1), are also moonlighting proteins with dual functions depending on their cellular localization. On the surface of *T. vaginalis*, TvGAPDH functions as a fibronectin (Fn)-binding protein under iron-rich conditions (11), whereas TvENO-1 func-

Received 26 June 2016 · Accepted 13 July 2016

Accepted manuscript posted online 1 August 2016

Citation Miranda-Ozuna JFT, Hernández-García MS, Brieba LG, Benítez-Cardoza CG, Ortega-López J, González-Robles A, Arroyo R. 2016. The glycolytic enzyme triosephosphate isomerase of *Trichomonas vaginalis* is a surface-associated protein induced by glucose that functions as a laminin- and fibronectin-binding protein. Infect Immun 84:000–000. doi:10.1128/IAI.00538-16.

Editor: J. A. Appleton, Cornell University

Address correspondence to Rossana Arroyo, rarrojo@cinvestav.mx.

Copyright © 2016, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

zli01016/zli1848d16z xppws S=1 8/6/16 5:48 4/C Fig: 2,3 Facing: 5-6,9-10 ArtID: 00538-16 NLM: research-article CE: jaw

Miranda-Ozuna et al.

tions as a plasminogen (Plg)-binding protein during cellular contact (12). Both TvGAPDH and TvENO-1 play important roles in supporting colonization and persistence in the urogenital tract in different host environments. In spite of multiple reports in which dual localization and novel functions were demonstrated for metabolic enzymes such as those also described for *T. vaginalis*, these trichomonad proteins are considered controversial surface-associated proteins due to the lack of transmembrane domains (TMDs) and/or signal peptides (SPs), the typical characteristics of the integral membrane proteins (13). In addition, a list of moonlighting proteins was recently updated by Amblee and Jeffery (14) and included the GAPDH and the AP120/PFO adhesin. With regard to the majority of the identified moonlighting proteins of other organisms, one of the open avenues of investigation is to identify the pathway that these molecules, including the proteins described for *T. vaginalis*, follow to relocalize to the cell surface to perform a new function.

Triosephosphate isomerase (TIM) is a cytoplasmic glycolytic enzyme involved in the reversible interconversion of dihydroxyacetone phosphate (DHAP) and glyceraldehyde-3-phosphate (G3P), and it plays essential roles in glycolysis (Embden-Meyerhof-Parnas pathway), gluconeogenesis, and the pentose phosphate pathways (15). TIM is an important virulence factor when localized to the cellular surfaces of pathogenic organisms. For example, it is an adhesin for epithelial cells and a laminin (Lm)- and Fn-binding protein during the parasitic phase of *Paracoccidioides brasiliensis* (16). Similarly, TIM is a Plg-binding protein in *Staphylococcus aureus* (17). Moreover, TIM has extracellular functions in parasitic helminths; i.e., it is secreted during infection by *Brugia malayi* and *Schistosoma mansoni* and acts as an antibody target during infection, and it has been considered a potential target for drug and/or vaccine development (18–20). TIM can also acquire functional diversity as a result of gene duplication. In the majority of organisms, it is encoded by a single gene; however, in plants, it is encoded by two *tim* genes that are differentially expressed in the cytosol and the chloroplasts (21). Similarly, in the bacterium *Sinorhizobium meliloti*, TIM is also encoded by two *tim* genes, one involved in erythritol catabolism and the other functioning in gluconeogenesis (22).

In *T. vaginalis*, TIM is encoded by two functional *tvTim* genes (*tvTim1* and *tvTim2*) that are translated into two 27-kDa proteins (TvTIM1 and TvTIM2). The two proteins were recently identified and characterized as recombinant proteins, and their crystal structure and stability were determined (23, 24). TvTIM1 and TvTIM2 are dimeric proteins of 254 amino acids in length. Despite a difference of only four amino acids between these two proteins, the difference significantly affects their structural stability. The TvTIM1r dimer is more stable and less dissociable than the TvTIM2r dimer, which is easily dissociable, suggesting that these changes could directly affect protein function (23, 24). TvTIMs exhibit dual cellular localizations (in the cytoplasm and on the surface of *T. vaginalis*) under regular growth conditions, suggesting that these proteins could have alternative novel functions when they are localized to the parasite surface (24). Evidence suggests that in addition to their enzymatic activities, these two proteins could also have alternative functions in the parasite. For example, recent transcriptomic analyses have reported that *tvTim2* is highly expressed in amoeboid parasites upon binding to Fn (25) as well as in parasites grown under glucose-rich, i.e., high-glucose (HG), conditions compared with *tvTim1* (26). Taken together,

these data suggest that TvTIM could be an additional moonlighting metabolic enzyme in *T. vaginalis*. Thus, the main goal of this study was to identify the novel functions of TvTIM localized to the *T. vaginalis* surface and the effect of glucose on its expression and surface localization. Our results showed that TvTIM is a glycolytic enzyme that is positively regulated by glucose and is localized to the cytoplasm and on the surface of *T. vaginalis*, where it functions as an Lm- and Fn-binding protein under HG conditions.

MATERIALS AND METHODS

T. vaginalis culture. *T. vaginalis* parasites from the fresh clinical isolate CNC188 (9) were maintained for 3 days by daily passaging in Trypticase-yeast extract-glucose (TYG) medium (modified TYM medium) supplemented with 10% heat-inactivated bovine serum (HIBS) and 25 mM glucose (normal glucose [NG]) at 37°C. For growing the parasites in different glucose concentrations, TYG-HIBS medium was either supplemented with 50 mM glucose (glucose rich [HG]) or not supplemented with glucose, so that only ≤ 1 mM glucose was present, which was derived from medium components (glucose restricted [GR]). Glucose measurements were verified by the automated glucose-hexokinase method (26) (clinical diagnostic laboratory, MICRO-TEC, Mexico City, Mexico).

Growth kinetics. To assess growth kinetics, 1×10^6 parasites were grown in 5 ml of HG, NG, or GR TYG-HIBS medium. The cultures were incubated at 37°C, and the cell density was determined at 6-h intervals during 24 h of growth using a hemocytometer counting method. Regular TYM (13 mM maltose) was used as a normal growth control (27). Cell viability was monitored by the trypan blue exclusion method.

RNA isolation and reverse transcription (RT)-PCR analysis. Total RNA was isolated from parasites (2×10^7) grown under GR, NG, or HG conditions using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). To obtain cDNA, 5 μ g of total RNA was treated with DNase I (3 U) and reverse transcribed using a RevertAid first-strand cDNA synthesis kit (Thermo Scientific-Pierce, Rockford, IL) and oligo(dT) primers, as recommended by the manufacturer. For PCR amplification, 500 ng of cDNA, *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), and primers specific for the reported sequences in TRICHDB for the *tvTim1* (TVAG_497370) and *tvTim2* (TVAG_096350) genes were used, as previously described (23). The *tvTim1* primers were 5'-ACATTCTTTGTCGGAGGC-3' (sense) and 5'-AATGTTGATGAAA CCTGG-3' (antisense), and the *tvTim2* primers were 5'-ACATTCTTCG TCGGTGGT-3' (sense) and 5'-AATGTTGATGAAGCCTGG-3' (antisense). A 726-bp fragment was amplified for both the *tvTim1* and *tvTim2* genes. The amplification program consisted of 25 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 55°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min. The 112-bp amplicon of the β -tubulin gene of *T. vaginalis* (28) was used as an internal control. These experiments were performed at least three independent times, with similar results.

WB analysis. Total protein extracts from *T. vaginalis* (2×10^7) grown under GR, NG, or HG conditions were obtained using the previously described deoxycholic acid (DOC) method (8, 9). Briefly, the parasites were resuspended in 500 μ l of NET (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl and 5 mM EDTA) buffer (pH 7.4) in the presence of proteinase inhibitors (1 mM Na-p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone [TLCK] and 0.2 mM leupeptin), lysed with 0.5% DOC for 20 min at 4°C, and then brought up to a final volume of 1 ml with TDSET (10 mM Tris-Cl [pH 7.8], 0.2% DOC, 0.1% SDS, 10 mM EDTA, and 1% Triton X-100) buffer. The lysate was layered on a sucrose cushion and centrifuged at $16,000 \times g$ for 30 min at 4°C. Protein extracts (supernatants) were analyzed by SDS-PAGE, blotted onto a nitrocellulose (NC) membrane (0.2 μ m pore size; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), blocked with 10% nonfat dried milk in phosphate-buffered saline (PBS)-0.1% Tween 20 (PBS-T) overnight at 4°C, washed with PBS-T, and incubated with different primary antibodies for 18 h at 4°C. After incubation for 2 h at room temperature with a peroxidase-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (1:3,000 dilution; Bio-Rad), reactive bands were developed using a chemiluminescence system (SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate; Thermo Scien-

zli01016/zli1848d16z	xppws	S=1	8/6/16	5:48	4/C Fig: 2,3	Facing: 5-6,9-10	ArtID: 00538-16	NLM: research-article	CE: jaw
----------------------	-------	-----	--------	------	--------------	------------------	-----------------	-----------------------	---------

TvTIM is a Receptor for Lm and Fn of *T. vaginalis*

tific-Pierce). Images were captured with a ChemiDoc XRS system (Bio-Rad) and analyzed using Quantity One software (Bio-Rad). Preimmune (PI) serum was used as a negative control, and other primary antibodies were used to detect TvTIM and the control proteins in Western blotting (WB), including the following: anti-TvTIMr, an antibody previously generated against the recombinant TvTIM2 protein that recognizes both recombinant TvTIM proteins (23); anti-AP65, an antibody generated against the native AP65 trichomonad adhesin; anti-EhHKr, an antibody generated against the *Entamoeba histolytica* recombinant hexokinase that cross-reacts with *T. vaginalis* hexokinase (TvHK); and anti-TvENOr, an antibody generated against the recombinant *T. vaginalis* anti-enolase (TvENO; TVAG_329460). The control proteins included the loading control; the adhesin AP65; TvHK, which is upregulated by glucose; and TvENO, which is not affected by glucose (12, 29, 30). These experiments were performed at least three independent times, with similar results.

Immunolocalization of TvTIM. To determine the localization of TvTIM in *T. vaginalis* grown under different glucose conditions (GR and HG), indirect immunofluorescence assays and confocal microscopy analysis were performed. Parasites were cultured on coverslips for 20 h at 37°C and fixed with 2% paraformaldehyde in PBS for 30 min at room temperature. We used a type of fixation that produces a partial permeabilization of cells, which allowed us to identify both intracellular and surface-associated localization in the same parasite, as previously reported (31). The parasites were washed with 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS and blocked with 0.5 M glycine for 1 h and 1% fetal bovine serum for 15 min at room temperature. The parasites were incubated with an anti-TvTIMr antibody or PI serum (both at a 1:50 dilution) for 16 h at 4°C, washed five times with PBS, and incubated with a fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-rabbit secondary antibody (1:100 dilution) (Thermo Scientific-Pierce) for 2 h at room temperature. The parasite surface phospholipids were stained with DIL (DIL-CM-38 at a 1:2,000 dilution; Molecular Probes-Invitrogen) for 30 min at room temperature. To label the nuclei, the coverslips were mounted with Vectashield-4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) mounting solution (Vector Laboratories, Burlingame, CA), and the parasites were analyzed by confocal microscopy using a Zeiss microscope and ZEN 2012 software (Carl Zeiss, Germany). These experiments were performed at least three independent times, with similar results.

To confirm the glucose effect on the localization of TvTIM to the surface of *T. vaginalis*, parasites were maintained for 3 days by daily passaging under GR conditions before supplementation with different glucose concentrations ($\leq 1, 2.5, 5, 10, 25, \text{ and } 50 \text{ mM}$) on coverslips for 1 h at 37°C. After that, the same protocols as described above for indirect immunofluorescence assays and confocal microscopy analyses were performed.

Immunogold labeling and transmission electron microscopy. For immunogold labeling assays, parasites grown in HG medium for 20 h at 37°C were fixed with 4% paraformaldehyde–0.2% glutaraldehyde in serum-free Dulbecco modified Eagle medium (DMEM). Afterward, the parasites were dehydrated in ethanol and embedded in LR white resin (London Resin Co. Ltd., United Kingdom), and then the parasite samples were polymerized under UV light at 4°C overnight. Ultrathin sections were mounted on mesh nickel grids and incubated with the anti-TvTIMr antibody (1:30 dilution) overnight. After several washes in 1% PBS-BSA, the sections were incubated with secondary 10- or 20-nm gold-conjugated goat anti-rabbit IgG (Ted Pella, Inc., USA) for 1 h at room temperature. Parasites incubated only with secondary antibody conjugated to gold particles were used as a negative control. Ultrathin sections were analyzed by transmission electron microscopy (TEM) using a JEOL JEM-1011 transmission electron microscope (JEOL Ltd., Tokyo, Japan).

Affinity ligand assays. To determine the binding of the recombinant TvTIM proteins (TvTIM1r and TvTIM2r) to Lm, Fn, and Plg, far-Western blotting (FWB) assays were performed as previously described (16), with minor modifications. TvTIM1r and TvTIM2r (1 μg) were subjected to SDS-PAGE, blotted onto NC membranes (0.2- μm pore size; Bio-Rad),

and blocked with 10% nonfat dried milk in PBS-T overnight at 4°C. The blots were washed with PBS-T and incubated with Lm from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma basement membrane (L2020; Sigma Co., St. Louis, MO), Fn from human plasma (F2006; Sigma), human Plg (STA-239; Cell Bio-Labs, San Diego, CA), or ppTvCP4r (32) (an unrelated protein used as a negative control) (30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ each) in PBS-T–1% BSA (PBS-T-BSA) overnight at 4°C. The blots were then washed extensively with PBS-T and incubated overnight at 4°C with the corresponding anti-Lm (L9393; Sigma), anti-Fn (F3348; Sigma), anti-Plg (STA-139; Cell Bio-Labs), or anti-ppTvCP4r (32) primary antibody in PBS-T-BSA (all at 1:1,000 dilutions). The blots were washed extensively with PBS-T and incubated for 2 h at room temperature with a peroxidase-conjugated goat anti-rabbit or donkey anti-goat secondary antibody (1:3,000 or 1:2,000 dilution, respectively; Bio-Rad or Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Reactive bands were developed using a chemiluminescence system (Thermo Scientific-Pierce). Images were captured with a ChemiDoc XRS system (Bio-Rad) and analyzed with Quantity One software (Bio-Rad). A recombinant anti-enolase protein (TvENOr) previously shown to interact with Plg (12) was obtained by cloning the TVAG_329460 gene into the pET19b plasmid, expressed in the *E. coli* BL21(DE3) Star Rosetta II strain, affinity purified by immobilized-metal affinity chromatography (IMAC) and used as an FWB positive control (23). The unrelated recombinant protein ppTvCP4r was used as an FWB negative control (32). A WB assay of the Lm, Fn, and Plg proteins directly incubated with a secondary antibody conjugated to peroxidase was used as an additional negative control to evaluate the presence of nonspecific binding of the secondary antibody to the Lm, Fn, and Plg proteins. TvTIM1r and TvTIM2r were directly incubated with an anti-Lm, anti-Fn, anti-Plg, or anti-ppTvCP4r antibody as other negative controls for specificity. As positive controls, TvTIM1r, TvTIM2r, TvENOr, or ppTvCP4r were directly incubated with the corresponding anti-TvTIMr (1:1,500 dilution), anti-TvENOr (1:2,000 dilution), or anti-ppTvCP4r (1:2,000 dilution) antibodies. These experiments were performed at least three independent times, with similar results.

Dot blot binding assays. Dot blot binding assays were performed to confirm the abilities of the recombinant TvTIM proteins to bind to Lm and Fn but not to Plg. Different amounts (0, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 2.0, and 4.0 μg) of TvTIM1r and TvTIM2r were transferred onto NC membranes (0.2- μm pore size; Bio-Rad) using a Bio-Dot microfiltration blotting device (Bio-Rad). The membranes were blocked with 5% skim milk in Tris-buffered saline-Tween 20 (0.1%) (TBS-T) overnight at 4°C, washed with TBS-T, and incubated with Lm, Fn (30 $\mu\text{g ml}^{-1}$), or Plg (30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and 60 $\mu\text{g ml}^{-1}$) in TBS-T-BSA with gentle shaking overnight at 4°C. After extensive washing with TBS-T, the blots were incubated with the corresponding primary antibody (anti-Lm, anti-Fn, or anti-Plg; 1:1,000 dilution) in TBS-T overnight at 4°C, washed, and incubated for 2 h at room temperature with a peroxidase-conjugated goat anti-rabbit or donkey anti-goat secondary antibody (1:3,000 or 1:2,000 dilution; Bio-Rad or Jackson ImmunoResearch, respectively). Reactive spots were developed using a chemiluminescence system (Thermo Scientific-Pierce). Images were captured with a ChemiDoc XRS system (Bio-Rad) and analyzed using Quantity One software (Bio-Rad). As dot blot positive and negative controls, different amounts of TvTIM1r and TvTIM2r, or TvCP4r (33) as an unrelated protein, were directly incubated with anti-TvTIMr or anti-TvCP4r antibody, respectively. Additional positive (TvENOr) and negative (TvCP4r) controls were used for the dot blot binding assays. The experiments were performed at least three independent times, with similar results.

Fn and Lm binding assays. For Fn and Lm binding assays, 96-well microtiter plates (Jet Biofilm, USA) were coated with Lm or Fn (2 μg per well) diluted in carbonate buffer (pH 9.6) overnight at 4°C. The wells were washed five times with PBS-T, blocked with 5% skim milk in PBS-T for 2 h at room temperature, and washed five times with PBS-T. To verify that the wells were coated with Fn or Lm, incubation with an anti-Lm or anti-Fn antibody (both at a 1:200 dilution) followed by a FITC-conjugated secondary anti-rabbit antibody was performed. The fluorescence

zli01016/zli1848d16z xppws S=1 8/6/16 5:48 4/C Fig: 2,3 Facing: 5-6,9-10 ArtID: 00538-16 NLM: research-article CE: jaw

Miranda-Ozuna et al.

emission per well was quantified at 520 nm by using a Gemini EM spectrofluorometer (Molecular Devices SpectraMax) and indicated that wells were completely coated with Lm or Fn (data not shown). BSA (2 µg per well), an unrelated protein, was also used to coat the 96-well microtiter plates as an additional control for parasite binding specificity.

To determine the effects of glucose on the binding of *T. vaginalis* to Lm and Fn, adherence assays using live parasites grown under GR, NG, and HG conditions were performed. The parasites (1×10^6 parasites ml^{-1}) were resuspended in serum-free TYG medium, labeled with 75 µM Cell-Tracker Blue CMAC (CTB; Molecular Probes, OR) for 45 min at 37°C with gentle shaking (100 rpm), and then washed extensively with TYG medium supplemented with 10% HBS. Labeled parasites (5×10^5 per well) from each glucose condition were added to microtiter wells coated with 2 µg of Lm, Fn, or BSA and incubated for 30 min at 37°C. Unbound parasites were removed, the wells were washed with PBS, and the fluorescence emission from the parasites attached to Lm, Fn, or BSA was quantified at 466 nm with a Gemini EM spectrofluorometer (Molecular Devices SpectraMax) and taken as the value for 100% attached parasites under each glucose condition. For the protein binding inhibition assays, labeled parasites grown under HG conditions were preincubated with anti-TvTIM IgGs (0, 100, 200, 300, and 400 µg ml^{-1}) for 30 min at 4°C. The same concentrations of PI rabbit serum or anti-ppTvCP4r IgGs were used as negative controls. Untreated parasites were taken as 100% attached parasites. The experiment was performed in triplicate at least three independent times, with similar results. Another inhibition experiment was performed using the recombinant TvTIM proteins as competitors. The Lm- or Fn-coated wells were preincubated for 1 h at 4°C with increasing amounts (0 to 1.6 µg) of the TvTIM1r or TvTIM2r protein to compete for the specific binding of trichomonads to these ECM proteins. Then, live parasites grown under HG conditions were added to the wells and incubated for 30 min at 37°C. The same amounts of the unrelated recombinant protein ppTvCP4r were used as negative competitor controls.

Glucose concentration measurement in VSs. To determine the glucose concentrations in vaginal secretions (VSs) from women with trichomoniasis, a total of 85 samples were included in this study. The VSs were obtained from women who were enrolled at the Hospital General de Mexico under an institutional review board (IRB)-approved protocol (DU/14/204/03/010) and who provided written informed consent. The enrolled subjects had received the diagnosis of cervicovaginitis and other gynecological disorders as determined by clinical examination. The VSs were collected from vaginal discharge using sterile cotton swabs, and the samples were diluted in saline solution (at a 1:5 dilution). The presence of cellular components such as vaginal epithelial cells (VECs), white blood cells (WBCs), bacteria, and yeasts was determined by microscopic analysis. The pH was determined using indicator strips with pH ranges of 0 to 14 and 4 to 7 (ColorpHast indicator strips; Merck). The presence of *T. vaginalis* and other pathogens, such as *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans*, or enterobacteria, was determined by microscopic analysis and *in vitro* culture. For *T. vaginalis* culture, the InPouch Tv test (Biomed Diagnostic, White City, OR) was used. To determine the glucose concentration in the VS samples, the samples were clarified by centrifugation at $12,000 \times g$ for 5 min at 4°C, the supernatants were transferred to new microtubes, and glucose measurements were performed by the glucose-hexokinase automated method (MICRO-TEC).

Statistical analysis. Statistically significant differences between means were determined by analysis of variance (ANOVA) using GraphPad Prism 5.0. The data were analyzed by one-way ANOVA using the Tukey method comparing all pairs of columns ($P < 0.05$) for Fig. 1 and 5 to 7. The scores showing statistical significance are indicated in the figures with asterisks. The corresponding *P* values are indicated in the figure legends.

RESULTS

Glucose promotes the growth of *T. vaginalis*. To assess the growth of *T. vaginalis* in different glucose concentrations, we performed growth kinetic assays using *T. vaginalis* parasites from the

fresh clinical isolate CNCD188 grown under GR, NG, or HG conditions. Parasite numbers were counted at 6-h intervals for 24 h. The parasites grown under HG conditions reached a cellular density at 24 h of $4.78 \times 10^6 \pm 0.16 \times 10^6$ cells ml^{-1} , compared with $3.73 \times 10^6 \pm 0.06 \times 10^6$ cells ml^{-1} and $1.97 \times 10^6 \pm 0.14 \times 10^6$ cells ml^{-1} for those grown under NG and GR conditions, respectively, and $3.78 \times 10^6 \pm 0.12 \times 10^6$ cells ml^{-1} for those grown in regular TYM medium (Fig. 1A1). Cell viability was monitored by the trypan blue exclusion method and showed that the numbers of viable cells did not significantly differ between the parasites grown in the various glucose concentrations and those grown in the control TYM medium (Fig. 1A2). These data also show that the growth of *T. vaginalis* increased significantly with glucose concentration ($P \leq 0.05$) compared with the parasite growth under GR conditions.

Glucose induces differential expression of the *tvtim* genes.

To evaluate the effects of glucose on the expression of the TvTIM-encoding genes (*tvtim1* and *tvtim2*), we performed semiquantitative RT-PCR assays (Fig. 1B1) using total RNA isolated from parasites grown under GR, NG, or HG conditions. Densitometric analysis was also performed to assess the differences observed in the amplicons. Our results showed that *tvtim1* was the most highly expressed in the parasites grown under GR conditions (Fig. 1B1, lane 1) and *tvtim2* was overexpressed in the parasites grown under HG conditions (Fig. 1B1, lane 3). These differences were corroborated by densitometric analysis of the amplicons (Fig. 1B2) normalized against the β-tubulin amplicon for each glucose concentration. The differences were significant ($P < 0.05$ [Fig. 1B2]), demonstrating that the *tvtim* genes were differentially expressed in *T. vaginalis*, depending on the glucose concentration.

Expression of TvTIM is upregulated by glucose. To determine the effects of glucose on the protein expression of TvTIM, total protein extracts from parasites grown under different glucose conditions were analyzed by WB assays using an anti-TvTIMr antibody that recognizes a 27-kDa band corresponding to both TvTIM proteins of *T. vaginalis*. Our results showed an increase in the amount of the TvTIM band in the parasites grown under NG and HG conditions (Fig. 1C1, lanes 2 and 3, respectively) compared with those grown under GR conditions (Fig. 1C1, lane 1). These differences were corroborated by densitometric analysis of the bands detected by WB normalized against the AP65 band (Fig. 1C1) and were found to be significant ($P < 0.05$) (Fig. 1C2). To confirm that glucose affected the expression of other trichomonad glycolytic enzymes, such as hexokinase (TvHK) and enolase (TvENO), which participate in the first and ninth reactions of the glycolytic pathway, respectively, WB assays were also performed using the same protein extracts from the parasites grown under different glucose conditions. The expression of TvENO did not change (Fig. 1C1), whereas similar to TvTIM expression, the expression of TvHK exhibited a marked increase in the parasites grown under HG conditions (Fig. 1C1, lane 3) compared with those grown under GR conditions (Fig. 1C1, lane 1). These differences were corroborated by densitometric analysis of the bands detected by WB normalized against the AP65 band (Fig. 1C2) and were found to be significant ($P < 0.05$) for TvHK but not for TvENO. These data showed that TvTIM and TvHK, two glycolytic enzymes of *T. vaginalis*, are modulated by the glucose concentrations, whereas TvENO and AP65 are not affected by glucose levels.

TvTIM surface localization is affected by glucose. To assess the cellular localization of TvTIM in trichomonads grown under

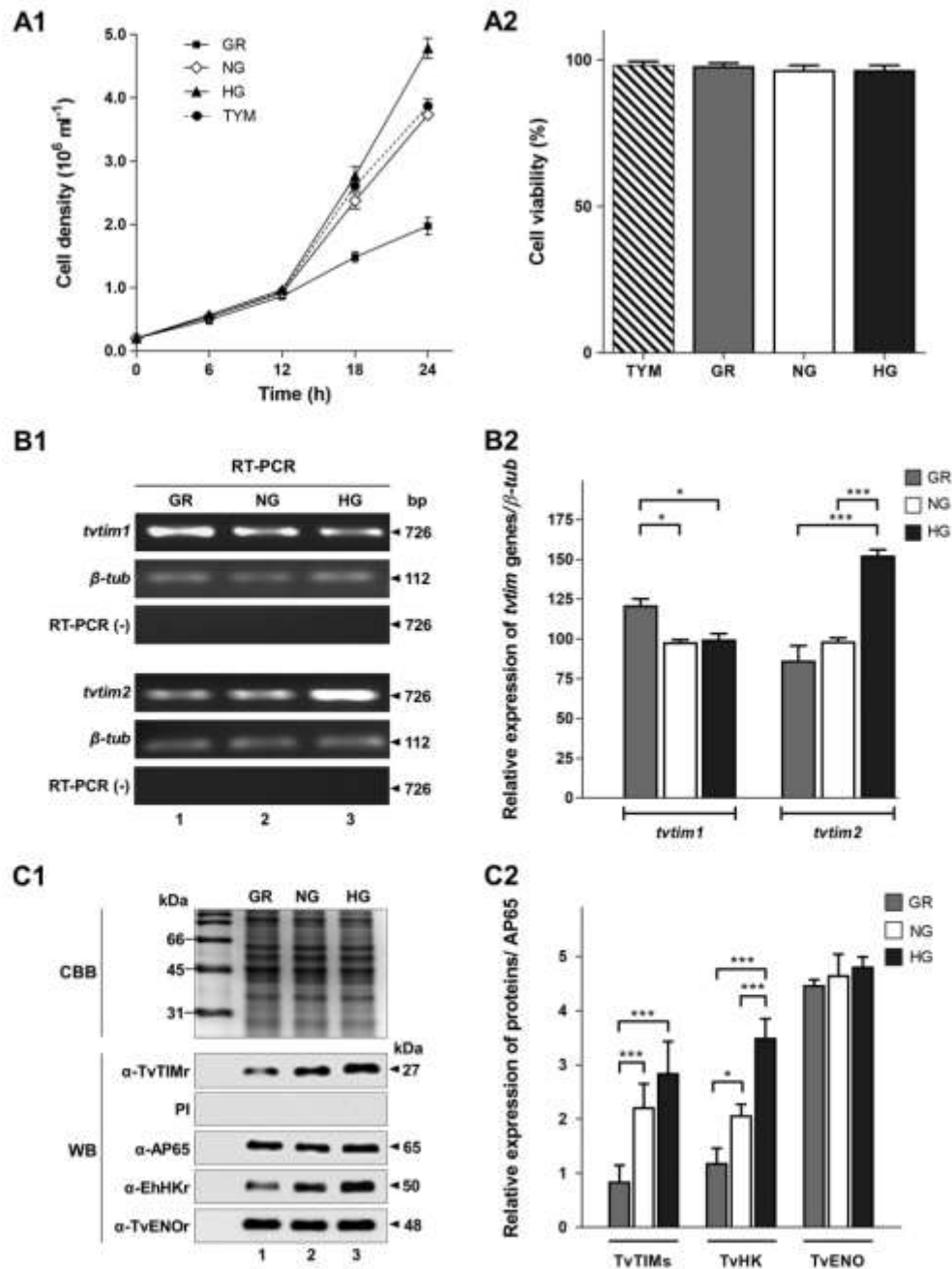


FIG 1 Glucose promotes the growth of *Trichomonas vaginalis* and differentially modulates *tvtim1* and *tvtim2* gene expression and amount of TvTIM. (A1) Effects of GR (≈ 1 mM), NG (25 mM) and HG (50 mM) conditions on *T. vaginalis* growth. The initial number of parasites cultivated under the different glucose conditions was 2×10^3 cells ml⁻¹. TYM (13 mM maltose) regular medium was used as a normal growth control. Cell density was determined at 6-h intervals during 24 h of growth at 37°C. (A2) Cell viability was monitored by trypan blue exclusion via hemocytometer counts after 24 h of incubation. All data (A1 and A2) are the means \pm SDs of three independent experiments in duplicates. (B1) Semiquantitative RT-PCR using primers specific for the *tvtim1* and *tvtim2* genes (726 bp) and cDNA from parasites grown under GR (lane 1), NG (lane 2), and HG (lane 3) conditions. The β -tubulin gene (β -*tub*; 112 bp) was amplified as an internal control, using the cDNA from the parasites grown under different glucose conditions. RT-PCR was the negative (-) control, for which DNase-treated RNA without reverse transcriptase was used as a template. The sizes of the amplicons are given in base pairs. (B2) Densitometric analysis of the RT-PCR

zli01016/zli1848d16z xppws S=1 8/6/16 5:48 4/C Fig: 2,3 Facing: 5-6,9-10 ArtID: 00538-16 NLM: research-article CE: jaw

Miranda-Ozuna et al.

different glucose conditions, we performed indirect immunofluorescence assays on paraformaldehyde-fixed parasites, using an anti-TvTIMr antibody. The images were analyzed by confocal microscopy. Consistent with the WB data, Fig. 2A shows the increased fluorescence intensity of cytoplasmic and surface-associated TvTIM (in green; panels d and i), which colocalized with the membrane marker (Dil, in red; panels c and h) as yellow label (merge; panels e and j) of parasites grown under HG conditions (Fig. 2A, panels a to e) compared with those grown under GR conditions (Fig. 2A, panels f to j), which showed a reduced green fluorescent signal in the cytoplasm and parasite surface (Fig. 2A, panels i and j). In those grown under HG conditions but treated with PI serum, used as a negative control (Fig. 2A, panels k to o), no green fluorescent signal was observed, as expected. Thus, TvTIM showed a patchy distribution and colocalization (in yellow) on the surface of parasites grown under HG conditions (Fig. 2A, panels a to e), while those grown under GR conditions showed less TvTIM on the cell surface (Fig. 2A, panels f to j). These data suggest that in *T. vaginalis*, the amount and surface localization of TvTIM are positively regulated by glucose.

Our next goal was to confirm the glucose effect on the localization of TvTIM to the surface of *T. vaginalis*. Thus, we performed indirect immunofluorescence assays on paraformaldehyde-fixed parasites grown in different glucose concentrations (≤ 1 , 2.5, 5, 10, 25, and 50 mM) for 1 h, supplemented after glucose starvation. Figure 2B shows that TvTIM localized on the surface of *T. vaginalis* after 1 h of glucose supplementation; this is better visualized at 25 and 50 mM glucose (Fig. 2B, panels q to t and u to x, respectively), with colocalization points in yellow that increased proportionally to the glucose concentration up to ~ 3 -fold. The coefficient of colocalization varied from 6.5% at ≤ 1 mM glucose (10.2% and 10.8% at 2.5 and 5.0 mM glucose and 14.9% and 15.8% at 10 and 25 mM glucose, respectively) to 16.8% at 50 mM glucose (Fig. 2B, panels h, l, p, t, and x). These data suggest that in *T. vaginalis*, the amount and surface localization of TvTIM are positively regulated by glucose. Thus, our next aim was to identify the possible pathway followed by TvTIM to the parasite surface under HG conditions.

TvTIM follows an unconventional pathway to the surface of *T. vaginalis* under HG conditions. To explore the possible cellular trafficking pathway of TvTIM to the plasma membrane of *T. vaginalis* despite of the lack of transmembrane domains and signal peptides in the protein, we performed immunogold localization assays on fixed parasites grown under HG conditions using the anti-TvTIMr antibody and transmission electron microscopy (TEM). Figure 3 shows the immunogold particles of TvTIM in the

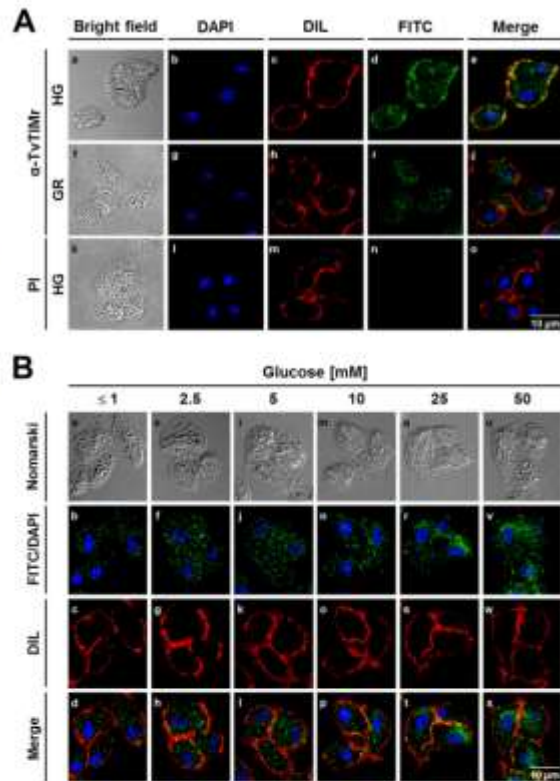


FIG 2 Glucose promotes the localization of TvTIM to the surface of *T. vaginalis*. (A) Indirect immunofluorescence and bright-field microscopy showed the cytoplasmic and surface localization and expression of TvTIM in parasites grown under HG (a to e) and GR (f to j) conditions for 24 h at 37°C. Paraformaldehyde-fixed parasites were incubated with a primary anti-TvTIMr antibody (1:50 dilution) followed by a FITC-conjugated secondary antibody (1:100 dilution). Parasites grown in HG were incubated with preimmune (PI) rabbit serum (1:50 dilution) followed by a FITC-conjugated secondary antibody as a negative control (k to o). (B) Cytoplasmic and surface localization of TvTIM in parasites grown in increasing glucose concentrations (≤ 1 , 2.5, 5, 10, 25, and 50 mM) for 1 h at 37°C. Paraformaldehyde-fixed parasites were incubated with a primary anti-TvTIMr antibody (1:50 dilution) followed by a FITC-conjugated secondary antibody (1:100 dilution). In both panels A and B, the confocal microscopy (Zeiss) images show TvTIM labeled with FITC (in green), nuclei labeled with DAPI (in blue), and the parasite membrane labeled with DIL (1:2,000 dilution, in red). The merged images show colocalization between the TvTIM protein and the parasite surface in yellow. Bar size: 10 μ m. These experiments were performed three independent times, with similar results.

amplicons, as detected by ethidium bromide staining after electrophoresis in 1% agarose gels in panel B1 performed using Quantity One software (Bio-Rad). The bar graphs show the relative amounts of *tvim1* and *tvim2* transcripts normalized to the β -tubulin gene transcript level. The error bars indicate SDs, determined from three independent experiments. The asterisks (* and ***) show the significant differences ($P < 0.05$) of the amplicons obtained under the three glucose conditions for each *tvim* gene as determined by ANOVA. (C1) SDS-PAGE and Coomassie brilliant blue (CBB) staining of 12% polyacrylamide gels were performed to assess the total protein extracts from parasites grown under GR (lane 1), NG (lane 2), and HG (lane 3) conditions. For WB assays, duplicated gels from panel C1 transferred onto NC membranes were incubated with different antibodies, including an anti-TvTIMr antibody (1:1,000 dilution) that recognized a 27-kDa band corresponding to the native TvTIM proteins. An anti-AP65 adhesin (anti-AP65) antibody (1:1,500 dilution) that recognized a 65-kDa band was used as a loading control, and preimmune rabbit serum (PI) (1:1,500 dilution) was used as a negative control. An anti-*Entamoeba histolytica* hexokinase (α -EhHKr) antibody (1:1,000 dilution) that recognized a 50-kDa band in *T. vaginalis* that corresponds to the *T. vaginalis* hexokinase (TvHK) was used as a control for glucose-induced modulation. An anti-enolase (α -TvENor) antibody (1:1,500 dilution) that recognized a 48-kDa band was used as a control for the absence of glucose-induced effects. (C2) Densitometric analysis of the bands detected by WB (C1) performed with Quantity One software (Bio-Rad). The bar graphs show the relative amounts of TvTIM, TvHK, and TvENO proteins normalized to the level of the AP65 protein, which was used as a loading control. The error bars indicate the SDs of three independent experiments. The asterisks (* and ***) show significant differences ($P < 0.05$) among the protein bands detected by the antibodies under HG and NG conditions compared with GR conditions, as determined by ANOVA.

zli01016/zli1848d16z xppws S=1 8/6/16 5:48 4/C Fig: 2,3 Facing: 5-6,9-10 ArtID:00538-16 NLM: research-article CE: jaw

TvTIM is a Receptor for Lm and Fn of *T. vaginalis*

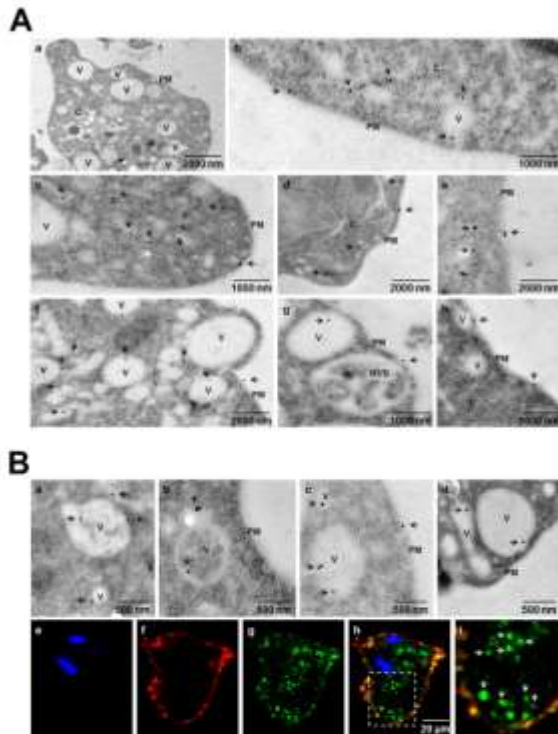


FIG 3 TvTIM shows two possible unconventional trafficking routes to the plasma membrane under HG conditions. (A) Immunogold labeling of parasites grown under HG conditions using a primary anti-TvTIMr antibody at a 1:30 dilution and a secondary antibody conjugated to 10- or 20-nm gold particles. The samples were analyzed by TEM. The TEM images show parasites directly incubated with a secondary antibody conjugated to gold particles as a negative control (a). In general, the TvTIM gold labeling shows localization free in the cytoplasm (C), in vacuoles (V), and on the parasite surface, associated with the plasma membrane (PM). Additionally, TEM images show two possible unconventional trafficking routes of TvTIM from the cytoplasm to the plasma membrane (b). Panels c to e show the trafficking of TvTIM to the plasma membrane through an unconventional pathway independent of vesicles. Panels f to h show the trafficking of TvTIM to the plasma membrane through an unconventional pathway dependent on vesicles or multivesicular body (MVB)-like structures. The arrows point to the gold particles. (B) The TEM images show TvTIM labeling localized on the inner or outer face of the vesicle membranes (a). TvTIM labeling also localized in vesicles with or without cytoplasmic content and near the plasma membrane (b and c). TvTIM labeling also localized in vesicles that were in the process of fusing with the plasma membrane (d). Bar size: 500 nm. The confocal microscopy images show the green TvTIM label in compartments similar to cytoplasmic vesicles, vesicles near the plasma membrane, and vesicles in the process of fusion with the plasma membrane (g to i). The images show TvTIM labeled with FITC (g; in green), nuclei labeled with DAPI (e; in blue), and the parasite membrane labeled with DIL (f; in red). The merged images show colocalization of the TvTIM protein with the parasite surface in yellow (h and i). The arrows point to vesicular structures. The framed region in panel h is magnified in panel i. Bar size: 20 μ m.

cytoplasm, free or inside vacuoles, and on the parasite membrane (Fig. 3A, panel b, arrows). Additionally, we identified two possible unconventional trafficking pathways of TvTIM that could explain its relocalization from the cytoplasm to the parasite membrane, through a dependent or an independent vesicular unconventional

pathway (Fig. 3A, panel b, arrows). TvTIM was detected in a possible trafficking route to the plasma membrane free of cytoplasmic vesicles (Fig. 3A, panel c, arrows); TvTIM signal was also detected close to or exposed on the outer face of the plasma membrane (Fig. 3A, panels d and e, arrows). Moreover, we detected TvTIM signal in different-sized vesicles (Fig. 3A, panel f, arrows), and TvTIM was present in putative secretory vesicles or multivesicular body (MVB)-like structures in the process of being fused with the plasma membrane (Fig. 3B, panels g and h, arrows), in contrast with the negative control, where no gold particles were observed (Fig. 3A, panel a). Figure 3B shows that TvTIM associates with the membranes of vesicles (panel a), in vesicles with or without cytoplasmic content close to the plasma membrane (panels b and c), or in vesicles fused with the plasma membrane (panel d). The localization of TvTIM in vesicles was corroborated by indirect immunofluorescence assays (Fig. 3B, panels e to i). The images show TvTIM (in green) in cytoplasmic vesicles, in vesicles close to the plasma membrane (Fig. 3B, panels g to i), and in merge with DIL (red), a surface marker, in yellow (Fig. 3B, panels h and i). These data suggest the possible unconventional trafficking and secretory pathways followed by TvTIM to relocalize to the plasma membrane under HG conditions. They also suggest that TvTIM could be a multifunctional protein with dual localization modulated by glucose concentration. Thus, our next goal was to determine whether the surface-associated TvTIM is able to bind to extracellular matrix (ECM) proteins such as Lm and Fn or to Plg under HG conditions and play a key role in the host-parasite interaction.

Recombinant TvTIMs bind to ECM proteins. To assess the abilities of recombinant TvTIM proteins (TvTIMr) to bind to Lm, Fn, and Plg (Fig. 4A), we performed FWB assays (Fig. 4C to F). TvTIM1r and TvTIM2r were subjected to SDS-PAGE, electroblotted onto NC membranes, and incubated with Lm, Fn, Plg, or ppTvCP4r (an unrelated protein used as a negative control). Specific protein-protein interactions were detected by WB using an anti-Lm, anti-Fn, anti-Plg, or anti-ppTvCP4r antibody. Figure 4 shows that TvTIM1r and TvTIM2r bound to Lm (Fig. 4C and D, lane 7) and Fn (Fig. 4C and D, lane 8) but not to Plg (Fig. 4C and D, lane 9) or ppTvCP4r (Fig. 4C and D, lane 10). The positive control, TvENO, had a positive reaction to Plg (Fig. 4E, lane 8), and the negative control, ppTvCP4r, had no reaction when incubated with the different proteins tested (Fig. 4F, lanes 6 to 8). The WB positive controls were directly incubated with anti-TvTIMr, anti-TvENO, or anti-ppTvCP4r antibodies (Fig. 4C to F, lanes 2). An additional negative control (Fig. 4C and D, lanes 3 to 6, and Fig. 4E and F, lanes 3 to 5, respectively) demonstrated that the primary antibodies used that recognized the corresponding proteins by WB (Fig. 4B, lanes 4 to 6) did not cross-react with the recombinant proteins tested (TvTIM1r, TvTIM2r, TvENOr, and ppTvCP4r), nor did the secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase (HRPO) react with the proteins tested (Lm, Fn, and Plg), as shown in Fig. 4B, lanes 7 to 9.

To confirm the specific binding of recombinant TvTIMs to Lm and Fn and the lack of binding to Plg, dot blot binding assays were performed (Fig. 5). Increasing amounts (0 to 4 μ g) of TvTIM1r (Fig. 5A) and TvTIM2r (Fig. 5B) were immobilized onto NC membranes and incubated with (30 μ g ml⁻¹) Lm, Fn, or Plg. As positive controls, TvTIM1r and TvTIM2r were directly incubated with anti-TvTIMr antibody. Similarly, protein-protein interactions were detected by WB using anti-Lm, anti-Fn, or anti-Plg antibodies, accordingly. Figure 5 shows the concentration-depen-

Miranda-Ozuna et al.

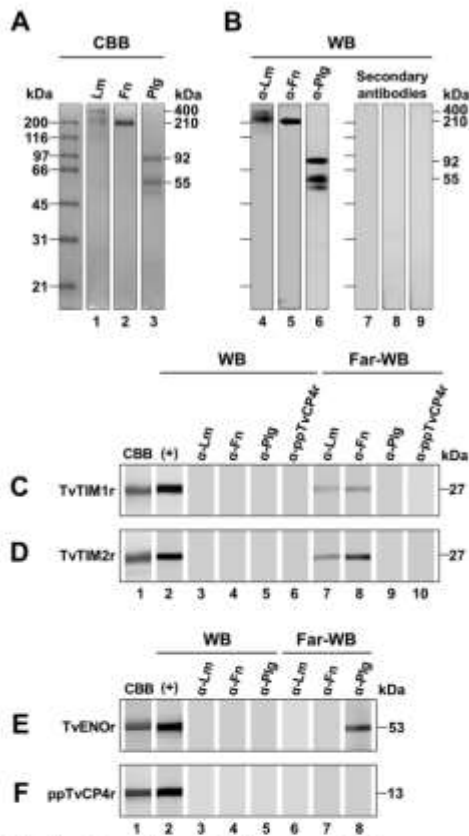


FIG 4 Binding of recombinant TvTIM proteins to ECM components. (A) Electrophoretic analysis of laminin (Lm), fibronectin (Fn), and plasminogen (Plg) proteins. SDS-PAGE and Coomassie brilliant blue (CBB) staining of 10% polyacrylamide gels show the pattern of each protein (lanes 1 to 3). (B) For WB assays, duplicated gels from panel A transferred onto NC membranes were incubated with the specific primary antibodies anti-Lm (lane 4), anti-Fn (lane 5), and anti-Plg (lane 6), followed by incubation with the HRPO-conjugated secondary antibody. Duplicated NC membranes were directly incubated with secondary antibodies conjugated to HRPO, as a negative control for nonspecific signal (lanes 7 to 9). For far-Western blotting assays, the recombinant proteins (1 μg) TvTIM1r (C), TvTIM2r (D), TvENOr (E), and ppTvCP4r (F) were subjected to SDS-PAGE, blotted onto NC membranes, and incubated with (30 $\mu\text{g ml}^{-1}$) Lm (C and D, lane 7; E and F, lane 6), Fn (C and D, lane 8; E and F, lane 7), Plg (C and D, lane 9; E and F, lane 8), or ppTvCP4r (C and D, lane 10). The specific protein-protein interactions were detected by WB using the appropriate antibody, anti-Lm (C and D, lanes 3 and 7; E and F, lanes 3 and 6), anti-Fn (C and D, lanes 4 and 8; E and F, lanes 4 and 7), anti-Plg (C and D, lanes 5 and 9; E and F, lanes 5 and 8), or anti-ppTvCP4r (C and D, lanes 6 and 10) (1:500 dilution). The positive controls (+) were incubated with an anti-TvTIMr, anti-TvENOr, or anti-ppTvCP4r antibody, accordingly (lane 2). The controls stained with Coomassie brilliant blue are shown in lane 1. The recombinant TvENO protein (TVAG_32460) was used as a specific positive control for the interaction with Plg (E, lane 8). The negative controls were obtained by incubating the unrelated recombinant protein ppTvCP4r (F) with Lm (lane 6), Fn (lane 7), and Plg (lane 8) and the corresponding antibodies. Additional negative controls (C and D, lanes 3 to 6; E and F, lanes 3 to 5) were obtained by directly incubating the recombinant proteins tested with the different antibodies used. The protein bands detected by WB were visualized using Quantity One software (Bio-Rad). These experiments were performed at least three independent times, with similar results.

dent binding of TvTIM1r and TvTIM2r to Lm and Fn, as corroborated by densitometric analysis of the black spots detected by WB (Fig. 5A and B). The lack of binding to Plg (Fig. 5) was confirmed using twice as much Plg protein (60 $\mu\text{g ml}^{-1}$), and the binding observed was compared with the positive reaction of TvENOr used as an additional positive control for Plg binding, as corroborated by densitometric analysis of the black spots detected by WB (Fig. 5C) with the anti-Plg antibody. Moreover, to assess nonspecific binding, TvCP4r, an unrelated protein, was incubated in increasing amounts (0 to 4 μg) with the three target proteins (Lm, Fn, and Plg) and the corresponding antibodies (anti-Lm, anti-Fn, and anti-Plg). The results showed that none of the three proteins bound to TvCP4r by dot blot binding assays (Fig. 5D). All together, these data demonstrate the ability of both recombinant TvTIM proteins to specifically bind to the Lm and Fn ECM proteins. Thus, our next aim was to determine whether surface-associated TvTIM can help *T. vaginalis* to bind to Lm and Fn under different glucose conditions.

Adherence of *T. vaginalis* to immobilized Lm and Fn is influenced by glucose. To determine the effect of glucose on the adherence of *T. vaginalis* to Lm and Fn, protein binding assays were performed with live parasites. Parasites grown under GR, NG, or HG conditions were labeled with CellTracker Blue (a fluorescent reagent) and added to microtiter wells coated with Lm, Fn, or BSA, used as an unrelated protein and specificity control. Attached parasites were analyzed by optical microscopy (Fig. 6A and B). The images showed that greater numbers of parasites were attached to Lm and Fn when they were grown under NG and HG conditions than under GR conditions; however, the numbers of BSA-attached parasites grown under different glucose concentrations appear to be similar (data not shown). These results were corroborated by quantifying the total fluorescence of the parasites attached to Lm, Fn, and BSA. The bar graphs show the increases in the relative fluorescence units of the parasites attached to Lm (Fig. 6C) and Fn (Fig. 6D), according to the glucose condition, but no increase was observed for BSA, which remained similar (Fig. 6C and D). The highest adherence to Lm and Fn was observed for the parasites grown under HG conditions. These differences in adherence were significant ($P < 0.05$). These data show that glucose promotes the adherence of *T. vaginalis* to Lm and Fn.

Anti-TvTIM antibody inhibits the binding of *T. vaginalis* to Lm and Fn. To demonstrate the role of the surface-associated TvTIM protein in the attachment of *T. vaginalis* to Lm and Fn, adherence inhibition assays using an anti-TvTIMr antibody were performed. As shown in Fig. 2A and 6, the surface localization of TvTIM and the maximum binding of live parasites to Lm and Fn occurred at the highest glucose concentration. Therefore, parasites under HG conditions that had been previously labeled with CellTracker Blue were incubated with increased concentrations (0 to 400 $\mu\text{g ml}^{-1}$) of anti-TvTIMr IgGs before being added to microtiter wells coated with Lm and Fn. IgGs from PI rabbit serum and an unrelated anti-ppTvCP4r antibody were used as negative controls. After 30 min of interaction of the parasites with Lm and Fn, the fluorescence emission at 466 nm from attached parasites was quantified and compared with the values obtained for the attachment to Lm- or Fn-coated wells of parasites without any treatment (0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of IgG), which was taken as a 100% adherence to ECM proteins. Figure 7A and B show that the anti-TvTIMr antibody specifically inhibited the binding of *T. vaginalis* to immobilized Lm and Fn in a concentration-dependent manner. No

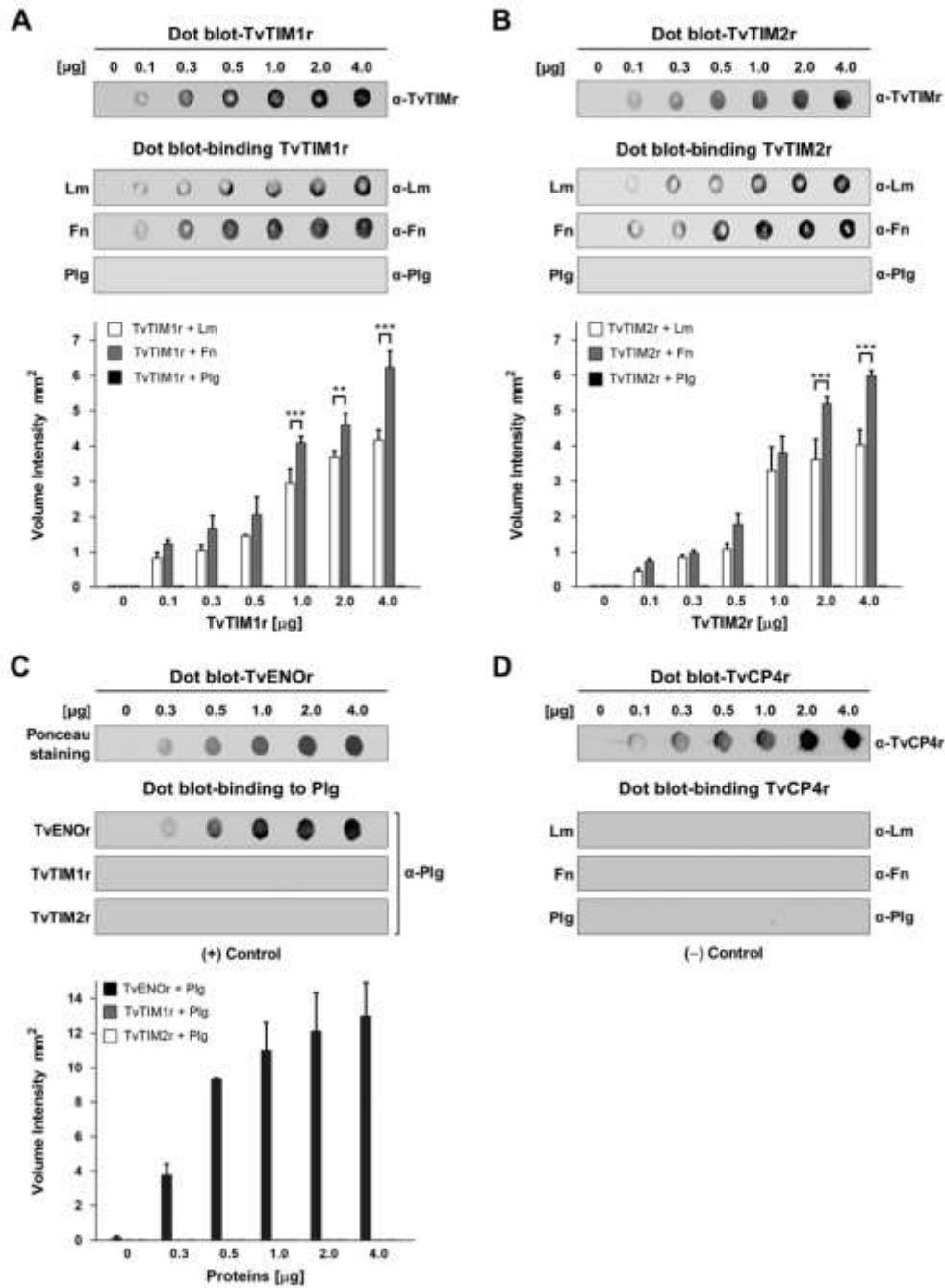


FIG 5 Dot blot-binding assay confirmed the interaction of Lm and Fn with the recombinant TvTIM proteins of *T. vaginalis*. (A and B) For dot blot binding assays, increasing amounts (0 to 4 μg) of TvTIM1r and TvTIM2r were immobilized onto NC membranes and incubated with Lm, Fn, or Plg (30 μg ml⁻¹). The binding of Lm, Fn, and Plg to TvTIM1r or TvTIM2r was detected by WB using an anti-Lm, anti-Fn, or anti-Plg antibody, respectively, followed by a peroxidase-conjugated secondary antibody. The intensities of the black spots indicate positive interactions in relation to the amount of immobilized protein. (C) Different amounts (0 to 4 μg) of TvENOr (positive control), TvTIM1r, and TvTIM2r were immobilized onto NC membranes and incubated with 30 μg ml⁻¹ of Plg for TvENOr or 60 μg ml⁻¹ of Plg for TvTIM1r and TvTIM2r. The specific protein-protein interactions were detected by WB using an anti-Plg antibody, and positive

zll01016/zll1848d16z xppws S=1 8/6/16 5:48 4/C Fig: 2,3 Facing: 5-6,9-10 ArtID: 00538-16 NLM: research-article CE: jaw

Miranda-Ozuna et al.

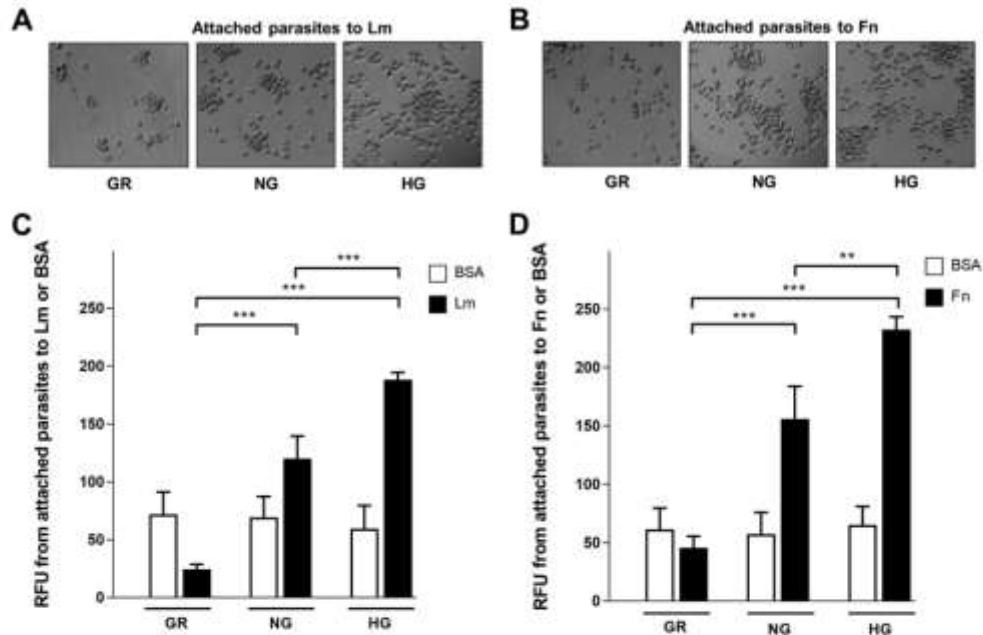


FIG 6 Glucose promotes the adherence of *T. vaginalis* to Lm and Fn. For adherence assays, live parasites (5×10^5 cells per well) grown under GR, NG, or HG conditions were labeled with CellTracker Blue (CTB), added to microtiter wells coated with Lm or Fn ($2 \mu\text{g}$), and incubated for 30 min at 37°C . The light microscopy images show the attachment of the parasites to Lm (A) and Fn (B) under the different glucose conditions. The number of bound parasites was estimated indirectly by measuring the fluorescence at 466 nm using a Gemini EM spectrofluorometer. The bar graphs show the relative fluorescence units (RFUs) of the parasites attached to Lm (C) or Fn (D) under each glucose condition. The negative specificity controls were obtained using parasites attached to BSA-coated wells under each glucose condition. The error bars indicate the SDs determined from three independent experiments performed in triplicate wells for each condition. The asterisks (** and ***) show the significant differences ($P < 0.05$) among the attached parasites under the three glucose conditions, as determined by ANOVA.

similar inhibition was observed with the anti-ppTvCP4r or PI serum IgGs. In both cases, $400 \mu\text{g ml}^{-1}$ of anti-TvTIMr IgGs resulted in the maximal inhibition of *T. vaginalis* adherence to Lm and Fn (43.8% and 53.5% inhibition, respectively), indicating that the anti-TvTIMr antibody specifically blocked the binding of the TvTIM proteins on the trichomonad surface to these ECM proteins.

TvTIM recombinant proteins also inhibit *T. vaginalis* binding to Lm and Fn. To confirm the abilities of TvTIM proteins associated with the surface of *T. vaginalis* to bind to Lm and Fn, competition assays were also performed using purified recombinant TvTIM proteins. To this end, 96-well plates coated with Lm and Fn were preincubated with increasing amounts (0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, and $1.6 \mu\text{g}$) of TvTIM1r or TvTIM2r before interaction with live parasites. Similar increasing amounts of ppTvCP4r were used as negative controls. Parasites grown under HG conditions

that had been previously labeled with CellTracker Blue were added to the protein-coated wells, and the fluorescence emission from the attached parasites was quantified and compared with the values obtained from the attachment of parasites to Lm- or Fn-coated wells without any treatment, which was taken as a 100% adherence to ECM proteins. Figure 7 also shows that TvTIM1r (Fig. 7C) and TvTIM2r (Fig. 7D) blocked the binding of *T. vaginalis* to Lm and Fn via concentration-dependent ligand competition, while no competition was observed with ppTvCP4r. Moreover, $1.6 \mu\text{g}$ of TvTIM1r and TvTIM2r inhibited the binding of *T. vaginalis* to Lm by ~39 and 47%, respectively (Fig. 7C) and the binding to Fn by ~47 and 60%, respectively (Fig. 7D). These results are consistent with the inhibition found using the anti-TvTIMr IgGs (Fig. 7A and B), confirming the additional role of TvTIM proteins in Lm and Fn binding of *T. vaginalis*.

interactions are shown as black spots. (D) Different amounts (0 to $4 \mu\text{g}$) of TvCP4r (an unrelated recombinant protein) were incubated with Lm, Fn, and P1g ($30 \mu\text{g ml}^{-1}$). The specific protein-protein interactions were detected by WB using the corresponding antibodies. The absence of black spots indicates that TvCP4r did not bind Lm, Fn, or P1g. This assay was used as a negative control for dot blot binding. As an additional positive control, different amounts (0 to $4 \mu\text{g}$) of TvTIM1r (A), TvTIM2r (B), and TvCP4r (D) were directly incubated with anti-TvTIMr or anti-TvCP4r antibody, respectively, followed by a peroxidase-conjugated secondary antibody. The bar graphs show densitometric analysis results for each spot as volume intensity per square millimeter, as determined using Quantity One software (Bio-Rad). The error bars indicate the SDs determined from three independent experiments. For the dot blot positive control, increasing concentrations of TvTIM1r and TvTIM2r were incubated with an anti-TvTIMr antibody, followed by a peroxidase-conjugated secondary antibody. The asterisks (** and ***) show significant differences ($P < 0.05$) among the spots detected by WB, as determined by ANOVA.

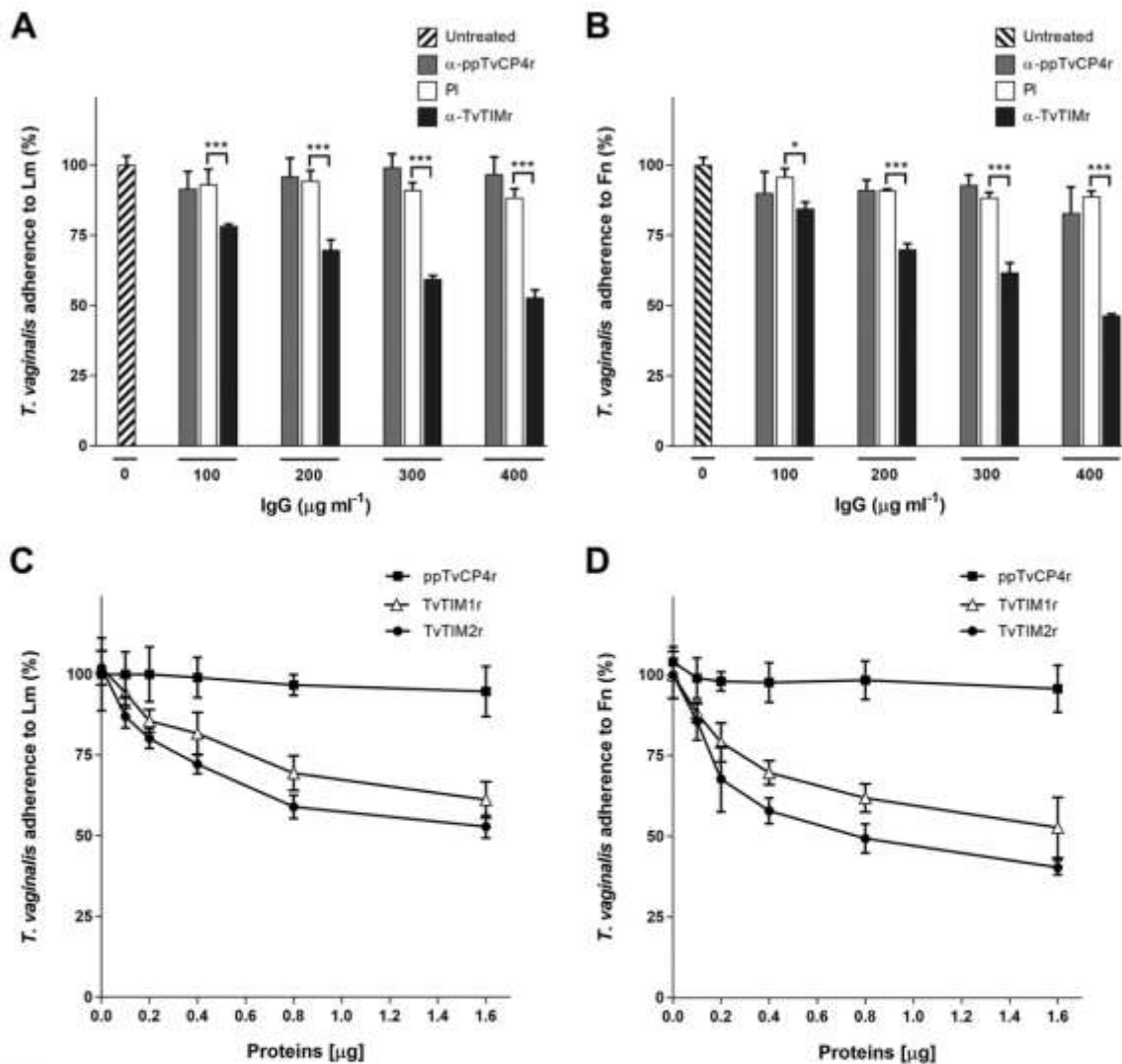


FIG 7 TvTIM on the parasite surface mediates the specific binding of *T. vaginalis* to Lm and Fn, under HG conditions. (A and B) For inhibition assays performed using an anti-TvTIMr antibody, parasites grown in HG (5×10^7 cell ml^{-1}) that had been previously labeled with CellTracker Blue were incubated with increasing concentrations (0 to 400 $\mu\text{g ml}^{-1}$) of anti-TvTIMr, PI serum, or α -ppTvCP4r IgGs before interaction with immobilized Lm (A) or Fn (B) for 30 min at 37°C. The fluorescence emission at 466 nm from the attached parasites was quantified using a Gemini EM spectrofluorometer. The direct binding of untreated CTB-labeled parasites to Lm- or Fn-coated wells (with absolute values of 171.74 and 209.48 RFU, respectively) was taken as 100% binding. IgGs from the PI serum and an unrelated anti-ppTvCP4r antibody were used as negative controls. The bar graphs show the mean percentages of adherence obtained from three independent experiments using triplicate samples. The error bars indicate the SDs, and the asterisks (* and ***) show the significant differences ($P < 0.05$) as determined by ANOVA. (C and D) For competition assays using the recombinant TvTIM proteins as competitors, the Lm- or Fn-coated wells were preincubated with increasing amounts (0 to 1.6 μg per well) of TvTIM1r, TvTIM2r, or ppTvCP4r as a negative control, before interaction for 30 min at 37°C with live parasites grown under HG conditions and labeled with CTB. Finally, the fluorescence emission from the attached parasites at 466 nm was quantified using a Gemini EM spectrofluorometer. The direct binding of CTB-labeled parasites to Lm- or Fn-coated wells in the absence of competitors (with absolute values of 171.74 and 209.48 RFU, respectively) was taken as 100% binding. Each point represents the mean percentage of attached parasites in the presence of a competitor (TvTIM1r, TvTIM2r, or ppTvCP4r). The error bars indicate the SDs from three independent experiments performed in triplicate wells for each condition.

T. vaginalis is exposed to different glucose concentrations during vaginal infection. To determine the glucose concentration that *T. vaginalis* could be exposed to during infection, we measured the amount of glucose present in vaginal secretions of 85

Mexican women that had either healthy vaginal microbiotas or vaginal infections by *T. vaginalis* or by other pathogens. Table 1 shows the individual glucose values of the vaginal glucose concentration for each person tested. For the group of women with healthy vag-

Influencia de la glucosa en la citotoxicidad y en la interacción de Trichomonas vaginalis con laminina y fibronectina mediada por la enzima triosafosfato isomerasa TvTIM

zll01016/zll1848d16z xppws S=1 8/6/16 5:48 4/C Fig: 2,3 Facing: 5-6,9-10 ArtID: 00538-16 NLM: research-article CE: jaw

Miranda-Ozuna et al.

TABLE 1 Summary of glucose levels in vaginal secretions of women with healthy vaginal microbiotas and vaginal infections

Sample no.	Age of subject (yrs)	pH	Clinical diagnosis	Microscopic analysis ^a					In vitro culture ^c	Glucose (mM) ^d
				VECs ^b	WBCs	Bacteria	Yeasts	<i>T. vaginalis</i>		
Normal microbiotas										
1	37	4	Ovarian cyst	+	+	++	-	-	NPI	0.3
2	38	8	Uterine myomatosis	+	+	+	-	-	NPI	0.55
3	42	5	Cystocele	+	+	+	-	-	NPI	0.55
4	33	4	Pregnancy	++	+	+	-	-	NPI	0.55
5	31	5	Urinary tract infection, cervicovaginitis	++	++	++	-	-	NPI	2.2
6	24	4	Cervicovaginitis, pregnancy	+	+	+	-	-	NPI	2.2
7	35	7	Cervicovaginitis, ovarian dysfunction	+	+	+	-	-	NPI	2.8
8	54	7	Uterine myomatosis	+	+	+	-	-	NPI	2.8
9	65	7	Cystocele	++	++	++	-	-	NPI	3.05
10	36	5	Dysmenorrhea	+	+++	+++	-	-	NPI	3.9
11	60	7	Cystocele	+	+++	+++	-	-	NPI	3.9
12	24	4	Painful intercourse	++	++	+	-	-	NPI	7.5
13	33	4	Urinary tract infection, infertility	++	+	++	-	-	NPI	18.3
14	30	4	Pregnancy	+++	+	++	-	-	NPI	21.65
15	40	4	Uterine myomatosis	+++	++	++	-	-	NPI	23.05
16	29	5	Urinary tract infection	++	++	++	-	-	NPI	25.25
17	38	7	Chronic vaginitis, polycystic ovary	++	+	+++	-	-	NPI	25.8
18	37	4	Ovarian cyst	++	+	+++	-	-	NPI	26.35
19	37	4	Chronic vulvovaginitis	+	+	+	-	-	NPI	30.25
20	45	6	Cystocele	+	+	+	-	-	NPI	38.3
Trichomonas vaginalis										
21	25	4	Cervicovaginitis	++	++	++	-	-	<i>T. vaginalis</i> (-) ^e	0.3
22	26	4	Cervicovaginitis	++	+	++	-	-	<i>T. vaginalis</i> (-) ^e	0.3
23	43	5	Cervicovaginitis	++	++	++	-	-	<i>T. vaginalis</i> (-) ^e	0.3
24	44	6	Cervicovaginitis	+++	+++	++	-	-	<i>T. vaginalis</i> (-) ^e	0.3
25	50	5	Cervicovaginitis	+	+	+	-	-	<i>T. vaginalis</i> (-) ^e	0.3
26	65	7	Cervicovaginitis	+	+	+	-	-	<i>T. vaginalis</i> (-) ^e	0.3
27	23	6	Cervicovaginitis	+	+	+	-	-	<i>T. vaginalis</i> (-) ^e	0.55
28	33	5	Cervicovaginitis	++	++	++	-	-	<i>T. vaginalis</i> (-) ^e	0.55
29	38	4	Cervicovaginitis	+	+++	++	-	-	<i>T. vaginalis</i> (-) ^e	0.55
30	42	5	Cervicovaginitis	+	+	+	-	-	<i>T. vaginalis</i> (-) ^e	0.55
31	25	6	Cervicovaginitis	+++	+++	+++	-	-	<i>T. vaginalis</i> (-) ^e	0.85
32	42	7	Cervicovaginitis	++	++	+	-	-	<i>T. vaginalis</i> (-) ^e	0.85
33	23	5	Cervicovaginitis	+	+	+	-	-	<i>T. vaginalis</i> (-) ^e	1.95
34	29	6	Cervicovaginitis	+	+	+	+	-	<i>T. vaginalis</i> (-) ^e	1.95
35	29	6	Cervicovaginitis	++	++	+++	-	-	<i>T. vaginalis</i> (-) ^e	2.2
36	27	4	Cervicovaginitis	+++	++	++	+	-	<i>T. vaginalis</i> (-) ^e	2.2
37	44	5	Cervicovaginitis	++	++	+++	+	-	<i>T. vaginalis</i> (-) ^e	2.5
38	42	5	Cervicovaginitis	++	++	+	-	-	<i>T. vaginalis</i> (-) ^e	3.05
39	20	5	Cervicovaginitis	++	++	++	-	-	<i>T. vaginalis</i> (-) ^e	3.35
40	58	6	Cervicovaginitis	++	++	++	-	-	<i>T. vaginalis</i> (-) ^e	3.6
41	33	5	Cervicovaginitis	+	+	++	-	-	<i>T. vaginalis</i> (-) ^e	3.9
42	43	4	Cervicovaginitis	++	+	+++	-	-	<i>T. vaginalis</i> (-) ^e	17.2
43	25	5	Cervicovaginitis	+	++	++	-	-	<i>T. vaginalis</i> (-) ^e	22.2
44	50	5	Cervicovaginitis	++	+	++	-	-	<i>T. vaginalis</i> (-) ^e	22.75
45	34	6	Cervicovaginitis	++	+	+++	-	-	<i>T. vaginalis</i> (-) ^e	25.8
46	29	5	Cervicovaginitis	++	++	++	-	-	<i>T. vaginalis</i> (-) ^e	26.9
47	50	4	Cervicovaginitis	++	++	++	+	-	<i>T. vaginalis</i> (-) ^e	28.3
48	20	5	Cervicovaginitis	++	+	+	-	-	<i>T. vaginalis</i> (-) ^e	28.3
49	31	5	Cervicovaginitis	++	+	++	-	-	<i>T. vaginalis</i> (-) ^e	30.55
50	59	5	Cervicovaginitis	++	+	+	-	-	<i>T. vaginalis</i> (-) ^e	31.1
51	36	6	Cervicovaginitis	++	++	++	-	-	<i>T. vaginalis</i> (-) ^e	31.35
52	52	5	Cervicovaginitis	++	++	+++	-	-	<i>T. vaginalis</i> (-) ^e	31.66
53	37	5	Cervicovaginitis	++	+	++	++	-	<i>T. vaginalis</i> (-) ^e	36.1
54	47	4	Cervicovaginitis	++	++	+++	-	-	<i>T. vaginalis</i> (-) ^e	39.15
55	26	5	Cervicovaginitis	++	++	++	-	-	<i>T. vaginalis</i> (-) ^e	42.2

(Continued on following page)

zli01016/zli1848d16z xppws S=1 8/6/16 5:48 4/C Fig: 2,3 Facing: 5-6,9-10 ArtID: 00538-16 NLM: research-article CE: jaw

TvTIM Is a Receptor for Lm and Fn of *T. vaginalis*

TABLE 1 (Continued)

Sample no.	Age of subject		Clinical diagnosis	Microscopic analysis ^a					In vitro culture ^c	Glucose (mM) ^d
	(yrs)	pH		VECs ^b	WBCs	Bacteria	Yeasts	<i>T. vaginalis</i>		
56	24	6	Cervicovaginitis	+++	++	++	-	-	<i>T. vaginalis</i> (-)*	42.45
57	41	4	Cervicovaginitis	++	++	+++	-	-	<i>T. vaginalis</i> (-)*	43.1
<i>Trichomonas vaginalis</i>										
58	33	5	Cervicovaginitis	+	+	++	-	+	<i>T. vaginalis</i> (+)*	0.3
59	52	5	Cervicovaginitis	++	++	+++	-	+	<i>T. vaginalis</i> (+)*	0.3
60	26	6	Cervicovaginitis	++	++	++	+	+	<i>T. vaginalis</i> (+)*	0.3
61	40	5	Cervicovaginitis	++	+	+++	-	+	<i>T. vaginalis</i> (+)*	0.85
62	35	5	Cervicovaginitis	++	++	+++	-	+	<i>T. vaginalis</i> (+)*	0.85
63	25	6	Cervicovaginitis	+++	++	++	-	+	<i>T. vaginalis</i> (+)*	1.1
64	19	5	Cervicovaginitis	+++	++	+++	-	+	<i>T. vaginalis</i> (+)*	1.1
65	40	5	Cervicovaginitis	+	+	+++	-	+	<i>T. vaginalis</i> (+)*	1.65
66	44	5	Cervicovaginitis	+++	+	+++	-	+	<i>T. vaginalis</i> (+)*	1.65
67	40	6	Cervicovaginitis	+	+	+	-	+	<i>T. vaginalis</i> (+)*	2.2
68	42	5	Cervicovaginitis	++	++	+++	-	+	<i>T. vaginalis</i> (+)*	19.45
69	61	6	Cervicovaginitis	++	++	++	-	+	<i>T. vaginalis</i> (+)*	25.25
70	42	5	Cervicovaginitis	++	++	+	-	+	<i>T. vaginalis</i> (+)*	30.8
71	35	5	Cervicovaginitis	++	+	++	-	+	<i>T. vaginalis</i> (+)*	31.35
72	20	5	Cervicovaginitis	+	+	++	+	+	<i>T. vaginalis</i> (+)*	36.65
Other pathogens										
73	25	6	Cervicovaginitis	++	+++	++	-	-	<i>G. vaginalis</i>	0.55
74	19	5	Cervicovaginitis	++	+	++	-	-	<i>G. vaginalis</i>	1.1
75	29	5	Hypothyroidism	+++	++	+++	-	-	<i>G. vaginalis</i>	1.95
76	29	4	Human papillomavirus	++	+	+	-	-	<i>C. albicans</i>	1.4
77	47	5	Uroepsis	+++	+	++	-	-	<i>C. albicans</i>	2.2
78	26	4	Pregnancy	+	+	+	-	-	<i>C. albicans</i>	2.2
79	21	5	Cervicovaginitis, pregnancy	+++	+++	+++	-	-	<i>C. albicans</i>	2.5
80	27	5	Cervicovaginitis	++	++	++	-	-	<i>C. albicans</i>	4.45
81	24	7	Cervical cancer	+	+	+	-	-	<i>C. albicans</i>	25.25
82	47	4	Cervicovaginitis	++	++	++	+++	-	<i>C. albicans</i>	41.35
83	34	5	Urinary tract infection, infertility	+	+	+	-	-	Enterobacteria	3.9
84	58	7	Urinary tract infection, cervicovaginitis	++	++	++	-	-	Enterobacteria	31.9
85	66	7	Diabetes mellitus type 2	+	+	+	-	-	Enterobacteria	56.6

^a Signs show the abundance of cellular components as follows: +, few; ++, moderate; +++, abundant; -, absent.

^b VEC, vaginal epithelial cells.

^c *In vitro* culture was performed for isolation of bacteria, fungi, or *T. vaginalis*. NPI, no pathogen isolated by culture; however, culture for the isolation of *T. vaginalis* was not performed. An asterisk indicates that only the *in vitro* culture for isolation of *T. vaginalis* was isolated.

^d Glucose levels in vaginal secretions were determined by the automatic hexokinase method.

inal microbiotas but with gynecological problems, the average glucose concentration in vaginal secretions was 11.96 mM; however, individual values varied between 0.3 and 38.3 mM. For the group of women with cervicovaginitis but without *T. vaginalis* infection, the average glucose concentration was 14.31 mM, with individual values that varied between 0.3 and 43.1 mM. For the group of women with *T. vaginalis* infection, the average glucose concentration was 10.25 mM, with individual values that varied between 0.3 and 36.65 mM. In women with vaginal infection by other pathogens, such as *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis*, and enterobacteria, the average glucose concentration was 13.48 mM, with individual values between 0.55 and 56.6 mM. These data show that the glucose levels in vaginal secretions of the three groups of women included in this study were variable. These data suggest that *T. vaginalis* could be exposed to varied vaginal glucose concentrations during infection. These changes in vaginal glucose could modulate the interaction of *T. vaginalis* with extracellular

matrix components. It is important to mention that the glucose levels reported in this study are subject to different variables, such as age, pH, and clinical diagnosis.

DISCUSSION

Glycolysis is a critical process for *T. vaginalis* under glucose-rich conditions and is considered an optimal metabolic condition for cell division and establishment of vaginal infection (26). However, under metabolic stress by glucose restriction, *T. vaginalis* activates several adaptive mechanisms, such as metabolic reprogramming, enhancing antioxidant ability, and autophagy, for cellular homeostasis that promotes cell survival (26). These data suggest that *T. vaginalis* has a high capacity to adapt to glucose fluctuations in the environment. Moreover, glucose levels modulate the expression and specific activity of enzymes involved in the glucose metabolism of *T. vaginalis* (26, 34).

Interestingly, the majority of these metabolic enzymes are en-

zli01016/zli1848d16z	xppws	S=1	8/6/16	5:48	4/C Fig. 2,3	Facing: 5-6,9-10	ArtID: 00538-16	NLM: research-article	CE: jaw
----------------------	-------	-----	--------	------	--------------	------------------	-----------------	-----------------------	---------

Miranda-Ozuna et al.

coded by one or more gene copies in the *T. vaginalis* genome (35). In other organisms, gene duplication is the primary source of new genes with expression divergence and protein subcellular relocalization, and gene duplication is also related to the acquisition of new functions (36, 37). Similar mechanisms have been associated with the emergence of alternative novel functions in glycolytic enzymes localized on the surface of *T. vaginalis*, where they exhibit new functions as adhesins or receptor molecules for ECM components, in addition to their cytoplasmic metabolic functions (6). This dual function has led to their classification as "moonlighting proteins" that can switch between functions following changes in cellular localization, or following modulation by alterations in the concentrations of certain environmental components (38, 39), by posttranslational modifications, or even by a single amino acid mutation that can result in the creation of a new function (39). For example, some glycolytic enzymes that are localized on the surface of *T. vaginalis* exhibit new functions as adhesins (6, 8, 9, 29) or receptor molecules for ECM components, participating in host-parasite interactions (11, 12). However, this topic has been controversial for the trichomonad community (4, 40–42), because like other moonlighting proteins (14, 39), these molecules lack TMDs and SPs; the pathway used by the proteins to reach the parasite membrane is still unknown (14, 39), and their receptors have not been identified yet. In this study, we demonstrated that glucose differentially regulates the expression of the two TvTIM-encoding genes (Fig. 1B) and induces the expression and surface localization of TvTIM (Fig. 1C, 2, and 3). Furthermore, surface-associated TvTIM mediates specific binding to Lm and Fn under HG conditions (Fig. 4 to 7), which provides an additional role for TvTIM in the adherence of *T. vaginalis* to the host ECM proteins Fn and Lm.

TvTIM is encoded by two genes (*tvtim1* and *tvtim2*) (23), a feature associated with expression divergence in other organisms (36, 37). Although the nucleotide sequences of the two *tvtim* genes are 97.6% identical, our results showed that they were differentially expressed in response to glucose (*tvtim1* was negatively regulated, whereas *tvtim2* was positively regulated) (Fig. 1B). These results are consistent with transcriptomic studies revealing the overexpression of *tvtim2*, but not *tvtim1*, in parasites grown under HG conditions (26) and in contact with vaginal epithelial cells (42) or with Fn (25). These data suggest that the transcription of the *tvtim* genes is differentially regulated during *in vitro* infection, in contact with ECM proteins such as Fn, and by glucose via still-unknown regulatory elements that control the expression of each gene, resulting in different functions and localizations. A similar mechanism has been proposed for yeasts that have regulatory motifs that diverge between duplicated genes and that are related to the protein evolution for new functions (43).

We also showed that TvTIM was modulated by the glucose concentration at the protein level (Fig. 1C). The amino acid sequences of the two TvTIM proteins are 98.4% identical, differing by only four amino acids but showing remarkable differences in physicochemical properties, dimer stability, and enzymatic activity (23, 24, 44). Thus, it was impossible to differentiate between TvTIM1 and TvTIM2 using an anti-TvTIMr antibody. However, when we take into account the opposite effects of glucose on *tvtim* gene expression (Fig. 1B), our data suggest that the increase in the amount of TvTIM protein in parasites grown under HG conditions could correspond to the TvTIM2 protein. This hypothesis is consistent with the results of the proteomics analysis of exosomes

(45): TvTIM2, but not TvTIM1, has been found to be associated with the exosomal proteins of *T. vaginalis* (45), suggesting that TvTIM2 is among the proteins secreted through an unconventional vesicular pathway (46). Consistent with this unconventional trafficking pathway, TvTIM gold label was observed in multivesicular body (MVB)-like structures fused with the parasite membrane (Fig. 3A, panel g) that may correspond to TvTIM2. Thus, in the near future, investigations should be conducted to determine whether only one or both TvTIM proteins are localized to the surface of *T. vaginalis* to acquire moonlighting functions as an Lm- and Fn-binding protein under HG conditions and whether one or both proteins are part of the secretome.

We also found that hexokinase (TvHK) was positively modulated by glucose, whereas anti-enolase (TvENO) and malic enzyme/AP65 were not affected (Fig. 1C). These data show that glucose levels regulate the amount of glycolytic enzymes of the first reactions in the glycolytic pathway in *T. vaginalis* (7, 26, 35). The behavior of the TvTIM proteins of *T. vaginalis* is similar to that observed in the TIM protein of *Fusobacterium varium*, which specifically increases in response to the presence of environmental glucose (47), supporting the positive regulation of TIM by glucose also observed in *T. vaginalis*.

In addition to the expected cytoplasmic localization, TvTIM also showed a second localization to the surface of *T. vaginalis* parasites grown under HG conditions (Fig. 2), moonlighting with a novel function as an Lm and Fn receptor that supports the interaction of *T. vaginalis* with these ECM proteins (48), similar to that observed in other organisms (14, 38). This behavior is similar to that of other trichomonad glycolytic enzymes, TvGAPDH and TvENO, with alternative surface localizations in response to iron exposure and cellular contact with VECs, respectively (11, 12). Interestingly, all these glycolytic enzymes have also been found to be associated with the surface of *Entamoeba histolytica* (49) and the cell wall of *C. albicans* (50) to perform new functions in the host-parasite interplay. Therefore, here we have shown that glucose is another environmental factor that differentially regulates gene expression as well as the amount and surface localization of glycolytic enzymes in *T. vaginalis*.

The mechanism by which TvTIM reaches the surface of *T. vaginalis* under different environmental conditions is unclear because this enzyme does not have a TMD or an SP like most of the reported moonlighting proteins (14, 39). However, alternative, unconventional trafficking pathways for its relocalization to the parasite surface have been proposed, for example, through secretory vesicles, such as exosomes, which are intracellularly derived from multivesicular bodies and are released when they fuse with the plasma membrane (46). Our data from immunogold TEM experiments evaluating the localization of TvTIM (Fig. 3A) support the presence of unconventional secretory pathways involved in TvTIM trafficking from cytoplasm to the plasma membrane, mainly through secretory vesicles. However, a pathway independent of vesicles is also evident (Fig. 3). Interestingly, we found that TvTIM also attached to the internal and external faces of vesicles near the membrane, like the TvGα402 localization previously described (51), possibly involved in some of the trichomonad trafficking pathways and in vesicles that fused with the plasma membrane. Moreover, after fusion with the plasma membrane, TvTIM is also exposed to the external surface of the cells (Fig. 3). Similar mechanisms have been identified for other glycolytic enzymes associated with secretory vesicles, such as exosomes or shedding

zli01016/zli1848d16z xppws S=1 8/6/16 5:48 4/C Fig: 2,3 Facing: 5-6,9-10 ArtID: 00538-16 NLM: research-article CE: jaw

TvTIM is a Receptor for Lm and Fn of *T. vaginalis*

vesicles (52). Interestingly, TvTIM2, but not TvTIM1, has been found to be associated with the exosomal proteins of *T. vaginalis* (45), suggesting that TvTIM2 could be the protein with alternate functions localizing to the surface of *T. vaginalis*, behaving as another intracellular glycolytic enzyme that moonlights to the parasite surface (52, 53), acquiring a new function as an Lm and Fn receptor (48). Therefore, the presence of TvTIM in MVBs and secretory vesicles (Fig. 3) suggests the involvement of an unconventional vesicular trafficking pathway for TvTIM and possibly for other surface-associated glycolytic enzymes in *T. vaginalis*. It will be interesting to investigate whether G proteins also found in MVB-like compartments and secretory vesicles, like $T\alpha 402$ (51), can participate in the trafficking pathway for surface-associated TvTIM.

The possibility that the affinity of *T. vaginalis* TvTIM for lipid membranes could be related to cotranslational or posttranslational modifications (PTMs) is also a plausible hypothesis that has to be tested. In support of this hypothesis, *in silico* analysis of TvTIM sequences shows that both TvTIM proteins contain putative sites for S-palmitoylation (cluster C) and N-myristoylation; both modifications could be involved in the interaction of the proteins with lipid membranes (54–56). Additionally, we identified putative sites for phosphorylation (on S and T), which may be important for interactions with other proteins or substrates and N- or O-glycosylation and thus could be relevant for protein secretion (39). This is interesting and motivates us to confirm these modifications in future experiments to determine their contribution to surface localization and the moonlighting functions of TvTIM and other glycolytic enzymes in *T. vaginalis*. Other studies have shown that some glycolytic proteins are indirectly associated with the extracellular surface. These proteins can interact either with the lipid membrane or with integral membrane proteins through a combination of noncovalent interactions, including hydrophobic and electrostatic interactions (49, 57). A typical example of glycolytic proteins indirectly associated with the surface are the GAPDH and TIM proteins of *Lactobacillus plantarum*, which are noncovalently attached to its outer cell wall (57).

The results of inhibition and competition assays testing the adherence of live parasites to Lm and Fn using antibodies to TvTIMr and both recombinant TvTIM proteins (Fig. 6 and 7) confirm the participation of the surface-associated TvTIM as a new receptor for Lm and Fn that is used by trichomonads to interact with these ECM proteins, extending the results of previous studies (48). Further studies will be necessary to identify and characterize the binding sites of TvTIM for Lm and Fn.

These results are consistent with some of the functions identified for TIM on the surfaces of other pathogens (14, 53), such as *P. brasiliensis* (16) *S. aureus* (17), *L. plantarum* (57), and *Mycoplasma gallisepticum* (58). Recently, the TIM protein was also identified in the surface proteome of *E. histolytica* (49) and in the cell wall proteome of *C. albicans* (50); however, the specific surface function of TIM in *E. histolytica* has not been described yet. Similar strategies have been used to determine the proteome of *T. vaginalis* surface; however, TvTIM proteins were not identified (59).

Our *in vitro* results show that glucose is an important nutrient for the biology of *T. vaginalis*; however, it was unknown whether *T. vaginalis* is exposed to changes in glucose levels during infection. For this reason, in this study, we also determined the glucose concentration in vaginal secretions from Mexican women with trichomoniasis and other infections (Table 1). We found that the

median level of free glucose was 10.25 mM, with individual values between 0.3 and 36.65 mM. Our results are in the range of those recently reported (60). Compared to the highest value of glucose detected in vaginal secretions (36.65 mM), 50 mM glucose, used *in vitro* as the HG condition, was not found in these samples. However, as shown in Fig. 2B, trichomonad parasites are able to respond in the presence of exogenous glucose in the medium that promotes the relocalization of TvTIM to the plasma membrane, confirmed by the colocalization coefficient, which increased more than 2-fold at 10 and 25 mM glucose and about 3-fold at 50 mM glucose. Although the colocalization of TvTIM on the parasites surface at 50 mM glucose could appear low (Fig. 2B) compared with those shown in Fig. 2A, we have to consider that the times of exposures to glucose were different, 1 h and 24 h, respectively. Even if in our study, we used the maximum glucose concentrations previously reported (26) for purposes of comparison between GR and HG conditions, our data (Fig. 2B) show that the vaginal glucose concentrations found in at least 67% of women with *T. vaginalis* (Table 1) can trigger the relocalization of TvTIM to the parasite surface during infection and to be responsible for the parasite adherence to ECM proteins Lm and Fn, as shown in Fig. 6. In addition, we do not rule out the possibility of the parasite finding glucose concentrations near 50 mM in other infected women, such as those with diabetes mellitus type 2 (56 mM glucose in vaginal secretions) (Table 1). Furthermore, a GR condition (≤ 1 mM) was found in 33% of samples with trichomoniasis, in 20% of women with healthy vaginal microbiotas but with gynecological problems, in 32% of women with cervicovaginitis but without *T. vaginalis* infections, and in 7% of women with vaginal infections with other pathogens (Table 1). Our results show a large variability in free glucose levels among women included in this study, which is consistent with those previously reported (60), suggesting that *T. vaginalis* could be exposed to glucose fluctuations during infection. Taking into account our results, these changes in vaginal glucose could modulate the interaction of *T. vaginalis* with ECM components *in vivo*. Similarly, *C. albicans* is another pathogen that causes vaginal infection that is responsible for vulvo-vaginal candidiasis. Studies show that this fungal has a high prevalence among women with diabetes mellitus, possibly related to their hyperglycemic status, which promotes the colonization of the vaginal tract in this group (61, 62).

An important question is why parasites need to localize some glycolytic enzymes on their surface. A possible explanation is the adaptive advantages that this mechanism provides to parasites during infection; for example, glycolytic enzymes may act as ligands for a variety of components of the host. This binding would allow the parasites to recognize the host cell for adherence and invasion, modulate hemostatic and immune systems, promote angiogenesis, or acquire molecules for nutrition (52) even as protective molecules for the oxidative burst, as occurs for *C. albicans* (50). For *T. vaginalis*, we can postulate as previously mentioned (11, 12) that the focal sites of erosion in the vaginal epithelium due to parasite proteolytic activity can result in *T. vaginalis* access to ECM and basal membrane proteins, such as Fn and Lm, and the surface-associated TvTIM could then contribute to parasite adherence to ECM proteins, interactions that appear to be required to maintain a chronic infection by this sexually transmitted parasite (48).

In conclusion, the glucose-induced TvTIM protein is a glycolytic enzyme associated with the surface of *T. vaginalis* with a novel

Miranda-Ozuna et al.

function, participating as a virulence factor in interactions with ECM and basal membrane proteins such as Fn and Lm.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially supported by grants 162123 and 153093 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) México (to R.A.). J.F.T.M.-O. was supported by a scholarship (246628) from CONACYT.

We thank Carlos Vazquez Calzada and Verónica Ivonne Hernández Ramírez for their help with the confocal microscopy analysis and Lizbeth I. Salazar-Villatoro for her help with the TEM processing and analysis. We thank Rosa Elena Cárdenas-Guerra for donating ppTvCP4e and TvCP4r, which were used as negative-control proteins in the binding assays. We also thank Leticia Avila-González and Martha G. Aguilar-Romero for their technical assistance.

FUNDING INFORMATION

This work, including the efforts of Rossana Arroyo, was funded by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (162123 and 153093). This work, including the efforts of Jesús Francisco Tadeo Miranda-Ozuna, was funded by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (246628 IFTMO Scholarship).

REFERENCES

- Poole DN, McClelland RS. 2013. Global epidemiology of *Trichomonas vaginalis*. Sex Transm Infect 89:418–422. <http://dx.doi.org/10.1136/sextrans-2013-051075>.
- Lehker MW, Alderete JF. 2000. Biology of trichomonosis. Curr Opin Infect Dis 13:37–45. <http://dx.doi.org/10.1097/00001432-200002000-00007>.
- Hirt RP, Sherrard J. 2015. *Trichomonas vaginalis* origins, molecular pathobiology and clinical considerations. Curr Opin Infect Dis 28:72–79. <http://dx.doi.org/10.1097/QCO.0000000000000128>.
- Kusdian G, Gould SB. 2014. The biology of *Trichomonas vaginalis* in the light of urogenital tract infection. Mol Biochem Parasitol 198:92–99.
- Lehker MW, Sweeney D. 1999. Trichomonad invasion of the mucous layer requires adhesins, mucinases, and motility. Sex Trans Infect 75:231–238. <http://dx.doi.org/10.1136/sti.75.4.231>.
- Figueroa-Angulo EE, Rendón-Gandarilla FJ, Puente-Rivera J, Calla-Choque JS, Cárdenas-Guerra RE, Ortega-López J, Quintas-Granados LI, Alvarez-Sánchez ME, Arroyo R. 2012. The effect of environmental factors on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. Microbes Infect 14:1411–1427. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2012.09.004>.
- Steinbüchel A, Müller M. 1986. Anaerobic pyruvate metabolism of *Trichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes. Mol Biochem Parasitol 20:57–65. [http://dx.doi.org/10.1016/0166-6851\(86\)90142-8](http://dx.doi.org/10.1016/0166-6851(86)90142-8).
- Arroyo R, Enghring J, Alderete JF. 1992. Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*. Mol Microbiol 6:853–862. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb01536.x>.
- Moreno-Brito V, Yáñez-Gómez C, Meza-Cervantes P, Avila-González L, Rodríguez MA, 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 7:245–258.
- García AF, Chang TH, Benchimol M, Klump DJ, Lehker MW, Alderete JF. 2003. Iron and contact with host cells induce expression of adhesins on surface of *Trichomonas vaginalis*. Mol Microbiol 47:1207–1224. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03366.x>.
- Lama A, Kucknoor A, Mundodi V, Alderete JF. 2009. Glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a surface-associated, fibronectin-binding protein of *Trichomonas vaginalis*. Infect Immun 77:2703–2711. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00157-09>.
- Mundodi V, Kucknoor AS, Alderete JF. 2008. Immunogenic and plasminogen-binding surface-associated alpha-enolase of *Trichomonas vaginalis*. Infect Immun 76:523–531. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.01352-07>.
- Ginger ML. 2014. Protein moonlighting in parasitic protists. Biochem Soc Trans 42:1734–1739. <http://dx.doi.org/10.1042/BST20140215>.
- Amblee V, Jeffery CJ. 2015. Physical features of intracellular proteins that

- moonlight on the cell surface. PLoS One 10:e0130575. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0130575>.
- Wierenga RK, Kapetanios EG, Venkatesan R. 2010. Triosephosphate isomerase: a highly evolved biocatalyst. Cell Mol Life 67:3961–3982. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-010-0473-9>.
- Pereira LA, Bao SN, Barbosa MS, da Silva JL, Felipe MS, de Santana JM, Mendes-Giannini MJ, de Almeida-Soares CM. 2007. Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function. FEMS Yeast Res 7:1381–1388. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1567-1364.2007.00292.x>.
- Furuya H, Ikeda R. 2011. Interaction of triosephosphate isomerase from *Staphylococcus aureus* with plasminogen. Microbiol Immunol 55:855–862. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1348-0421.2011.00392.x>.
- Hewitson IP, Rückerl D, Harcus Y, Murray J, Webb LM, Babayan SA, Allen JE, Kurniawan A, Maizels RM. 2014. The secreted triosephosphate isomerase of *Brugia malayi* is required to sustain microfilaria production in vivo. PLoS Pathog 10:e1004133. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1004133>.
- Cass CL, Johnson JR, Califf LL, Xu T, Hernandez HJ, Stadecker MJ, Yates JR, Williams DL. 2007. Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* egg secretions. Mol Biochem Parasitol 155:84–93. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.06.002>.
- Harn DA, Gu W, Oligino LD, Mitsuyama M, Gebremichael A, Richter D. 1992. A protective monoclonal antibody specifically recognizes and alters the catalytic activity of *Schistosoma* triosephosphate isomerase. J Immunol 148:562–567.
- Henze K, Schnarrenberger C, Kellermann J, Martin W. 1994. Chloroplast and cytosolic triosephosphate isomerases from spinach: purification, microsequencing and cDNA cloning of the chloroplast enzyme. Plant Mol Biol 26:1961–1973. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00019506>.
- Poysti NJ, Oresnik IJ. 2007. Characterization of *Sinorhizobium meliloti* triosephosphate isomerase genes. J Bacteriol 189:3445–3451. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.01707-06>.
- Figueroa-Angulo EE, Estrella-Hernández P, Salgado-Lugo H, Ochoa-Leyva A, Gómez-Puyou A, Campos SS, Montero-Moran G, Ortega-López J, Saab-Rincón G, Arroyo R, Benítez-Cardoza CG, Brieba LG. 2012. Cellular and biochemical characterization of two closely related triosephosphate isomerases from *Trichomonas vaginalis*. Parasitology 139:1729–1738. <http://dx.doi.org/10.1017/S00318201200114X>.
- Lara-González S, Estrella-Hernández P, Ochoa-Leyva A, Portillo-Téllez Del Carmen M, Caro-Gómez LA, Figueroa-Angulo EE, Salgado-Lugo H, Miranda-Ozuna JFT, Ortega-López J, Arroyo R, Brieba LG, Benítez-Cardoza CG. 2014. Structural and thermodynamic folding characterization of triosephosphate isomerases from *Trichomonas vaginalis* reveals the role of destabilizing mutations following gene duplication. Proteins 82:22–33. <http://dx.doi.org/10.1002/prot.24333>.
- Huang KY, Huang PJ, Ku FM, Lin R, Alderete JF, Tang P. 2012. Comparative transcriptomic and proteomic analyses of *Trichomonas vaginalis* following adherence to fibronectin. Infect Immun 80:3900–3911. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00611-12>.
- Huang KY, Chen YY, Fang YK, Cheng WH, Cheng CC, Chen YC, Wu TE, Ku FM, Chen SC, Lin R, Tang P. 2014. Adaptive responses to glucose restriction enhance cell survival, antioxidant capability, and autophagy of the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. Biochim Biophys Acta 1840:53–64. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbsgen.2013.08.008>.
- Diamond LS. 1957. The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. J Parasitol 43:488–490.
- León-Sicairos CR, León-Félix J, Arroyo R. 2004. tvcp12: a novel *Trichomonas vaginalis* cathepsin L-like cysteine proteinase-encoding gene. Microbiology 150:1131–1138. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.26927-0>.
- Meza-Cervantes P, González-Robles A, Cárdenas-Guerra RE, Ortega-López J, Saavedra E, Pineda E, Arroyo R. 2011. Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase (PFO) is a surface-associated cell-binding protein in *Trichomonas vaginalis* and is involved in trichomonad adherence to host cells. Microbiology 157:3469–3482. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.053033-0>.
- García AF, Alderete JF. 2007. Characterization of the *Trichomonas vaginalis* surface-associated AP65 and binding domain interacting with trichomonads and host cells. BMC Microbiol 7:116–126. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-7-116>.
- Hinners I, Moschner J, Nolte N, Hille-Rehfeld A. 1999. The orientation of membrane proteins determined *in situ* by immunofluorescence staining. Anal Biochem 276:1–7. <http://dx.doi.org/10.1006/abio.1999.4325>.

zli01016/zli1848d16z	xppws	S=1	8/6/16	5:48	4/C Fig: 2,3	Facing: 5-6,9-10	ArtID: 00538-16	NLM: research-article	CE: jaw
----------------------	-------	-----	--------	------	--------------	------------------	-----------------	-----------------------	---------

TvTIM is a Receptor for Lm and Fn of *T. vaginalis*

32. Cárdenas-Guerra RE, Ortega-López J, Flores-Pucheta CI, Benítez-Cardoza CG, Arroyo R. 2015. The recombinant prepro region of TvCP4 is an inhibitor of cathepsin L-like cysteine proteinases of *Trichomonas vaginalis* that inhibits trichomonal haemolysis. *Int J Biochem Cell Biol* 59:73–83. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2014.12.001>.
33. Cárdenas-Guerra RE, Arroyo R, Rosa de Andrade I, Benchimol M, Ortega-López J. 2013. The iron-induced cysteine proteinase TvCP4 plays a key role in *Trichomonas vaginalis* haemolysis. *Microbes Infect* 15:959–968.
34. ter Külle BH. 1996. Metabolic adaptation of *Trichomonas vaginalis* to growth rate and glucose availability. *Microbiology* 142:3337–3345. <http://dx.doi.org/10.1099/13500872-142-12-3337>.
35. Carlton JM, Hirt RP, Silva JC, Delcher AL, Schatz M, Zhao Q, Wortman JR, Bidwell SL, Alsmark UCM, Besteiro S, Sicheritz-Ponten T, Noel CJ, Dacks JB, Foster PG, Simillion C, Van de Peer Y, Miranda-Saavedra D, Barton GJ, Westrop GD, Müller S, Dessi D, Fiori PL, Ren Q, Paulsen I, Zhang H, Bastida-Corcuera FD, Simoes-Barbosa A, Brown MT, Hayes RD, Mukherjee M, Okumura CY, Schneider R, Smith AJ, Vanacova S, Villalvazo M, Haas BJ, Perlea M, Feldblyum TV, Utterback TR, Shu CL, Osoegawa K, de Jong PJ, Hrdy I, Horvathova I, Zubacova Z, Dolezal P, Malik SB, Logsdon JM, Jr, Henze K, Gupta A, Wang CC, Dunne RL, Upcroft JA, Upcroft P, White O, Salzberg SL, Tang P, Chiu CH, Lee YS, Embley TM, Coombs GH, Mottram JC, Tachezy J, Fraser-Liggett CM, Johnson PJ. 2007. Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science* 315:207–212. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1132894>.
36. Li WH, Yang J, Gu X. 2005. Expression divergence between duplicate genes. *Trends Genet* 21:602–607. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2005.08.006>.
37. Qian W, Zhang J. 2009. Protein subcellular relocation in the evolution of yeast singleton and duplicate genes. *Genome Biol Evol* 1:198–204.
38. Marcos CM, de Oliveira HC, da Silva JF, Assato PA, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJ. 2014. The multifaceted roles of metabolic enzymes in the *Paracoccidioides* species complex. *Front Microbiol* 5:719–730.
39. Jeffery CJ. 2016. Protein species and moonlighting proteins: very small changes in a protein's covalent structure can change its biochemical function. *J Proteomics* 134:19–24. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2015.10.003>.
40. Hirt RP, de Miguel N, Nakjang S, Dessi D, Liu YK, Diaz N, Rappelli P, Acosta-Serrano A, Fiori PL, Mottram J. 2011. *Trichomonas vaginalis* pathobiology: new insights from the genome sequence. *Adv Parasitol* 77:87–140. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-391429-3.00006-X>.
41. Hirt RP, Noel CJ, Sicheritz-Ponten T, Tachezy J, Fiori PL. 2007. *Trichomonas vaginalis* surface proteins: a view from the genome. *Trends Parasitol* 23:540–547. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2007.08.020>.
42. Gould SB, Woehle C, Kusdian G, Landan G, Tachezy J, Zimorski V, Martin WF. 2013. Deep sequencing of *Trichomonas vaginalis* during the early infection of vaginal epithelial cells and amoeboid transition. *Int J Parasitol* 43:707–719. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.04.002>.
43. Papp B, Pál C, Hurst LD. 2003. Evolution of cis-regulatory elements in duplicated genes of yeast. *Trends Genet* 19:417–422. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9525\(03\)00174-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9525(03)00174-4).
44. Lara-Gonzalez S, Estrella P, Portillo C, Cruces ME, Jimenez-Sandoval P, Fattori J, Migliorini-Figueira AC, Lopez-Hidalgo M, Diaz-Quezada C, Lopez-Castillo M, Trasvina-Arenas CH, Sanchez-Sandoval E, Gómez-Puyou A, Ortega-Lopez J, Arroyo R, Benítez-Cardoza CG, Brieba LG. 2015. Substrate-induced dimerization of engineered monomeric variants of triosephosphate isomerase from *Trichomonas vaginalis*. *PLoS One* 10:e0141747. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0141747>.
45. Twu O, de Miguel N, Lustig G, Stevens GC, Vashisht AA, Wohlschlegel JA, Johnson PJ. 2013. *Trichomonas vaginalis* exosomes deliver cargo to host cell and mediate host-parasite interactions. *PLoS Pathog* 9:e1003482. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003482>.
46. Ding Y, Wang J, Wang J, Stierhof YD, Robinson DG, Jiang L. 2012. Unconventional protein secretion. *Trends Plant Sci* 17:606–615. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2012.06.004>.
47. Potrykus J, Mahaney B, White RL, Bearne SL. 2007. Proteomic investigations of glucose metabolism in the butyrate-producing gut anaerobe *Fusobacterium varium*. *Proteomics* 7:1839–1853. <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200600464>.
48. Crouch ML, Alderete JF. 1999. *Trichomonas vaginalis* interactions with fibronectin and laminin. *Microbiology* 145:2835–2843. <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-145-10-2835>.
49. Biller L, Matthiesen J, Kühne V, Lotter H, Handal G, Nozaki T, Saito-Nakano Y, Schümann M, Roeder T, Tannich E, Krause E, Bruchhaus I. 2014. The cell surface proteome of *Entamoeba histolytica*. *Mol Cell Proteomics* 13:132–144. <http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M113.031393>.
50. Serrano-Fujarte I, López-Romero E, Cuéllar-Cruz M. 2016. Moonlight-like proteins of the cell wall protect sessile cells of *Candida* from oxidative stress. *Microb Pathog* 90:22–33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2015.10.001>.
51. Lal K, Noel CJ, Field MC, Goulding D, Hirt R. 2006. Dramatic reorganization of *Trichomonas* endomembranes during amoebal transformation: a possible role of G-proteins. *Mol Biochem Parasitol* 148:99–102. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2006.02.022>.
52. Gómez-Arreaza A, Acosta H, Quiñones W, Concepción JL, Michels PA, Avilán L. 2014. Extracellular functions of glycolytic enzymes of parasites: unpredicted use of ancient proteins. *Mol Biochem Parasitol* 193:75–81. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.02.005>.
53. Collingridge PW, Brown RWB, Ginger ML. 2010. Moonlighting enzymes in parasitic protozoa. *Parasitol* 137:1467–1475. <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182010000259>.
54. Varland S, Osberg C, Arnesen T. 2015. N-terminal modifications of cellular proteins: the enzymes involved their substrate specificities and biological effects. *Proteomics* 15:2385–2401. <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.201400619>.
55. Aicart-Ramos C, Valero RA, Rodriguez-Crespo I. 2011. Protein palmitoylation and subcellular trafficking. *Biochim Biophys Acta* 1808:2981–2994. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbame.2011.07.009>.
56. Linder ME, Deschenes RJ. 2007. Palmitoylation: policing protein stability and traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:74–84. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2084>.
57. Ramiah K, van Reenen CA, Dicks LM. 2008. Surface-bound proteins of *Lactobacillus plantarum* 423 that contribute to adhesion of Caco-2 cells and their role in competitive exclusion and displacement of *Clostridium sporogenes* and *Enterococcus faecalis*. *Res Microbiol* 159:470–475. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2008.06.002>.
58. Rao S, Chen D, Yu S, Chen H, Tan L, Hu M, Qiu X, Ding C. 2015. Characterization of triosephosphate isomerase from *Mycoplasma gallisepticum*. *FEMS Microbiol Lett* 362:fnv140. <http://dx.doi.org/10.1093/femsle/fnv140>.
59. De Miguel M, Lustig G, Twu O, Chattopadhyay A, Wohlschlegel JA, Johnson PJ. 2010. Proteome analysis of the surface of *Trichomonas vaginalis* reveals novel proteins and strain-dependent differential expression. *Mol Cell Proteomics* 9:1554–1566. <http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M000022-MCP201>.
60. Ehrström S, Yu A, Rylander E. 2006. Glucose in vaginal secretions before and after oral glucose tolerance testing in women with and without recurrent vulvovaginal candidiasis. *Obstet Gynecol* 108:1432–1437. <http://dx.doi.org/10.1097/01.AOG.0000246800.38892.fc>.
61. Goswami R, Dadhwal V, Tejaswi S, Datta K, Paul A, Haricharan RN, Banerjee U, Kochupillai NP. 2000. Species-specific prevalence of vaginal candidiasis among patients with diabetes mellitus and its relation to their glycaemic status. *J Infect* 41:162–166. <http://dx.doi.org/10.1053/jinf.2000.0723>.
62. Goswami D, Goswami R, Banerjee U, Dadhwal V, Miglani S, Lattif AA, Kochupillai N. 2006. Pattern of *Candida* species isolated from patients with diabetes mellitus and vulvovaginal candidiasis and their response to single dose oral fluconazole therapy. *J Infect* 52:111–117. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2005.03.005>.



Structural and thermodynamic folding characterization of triosephosphate isomerases from *Trichomonas vaginalis* reveals the role of destabilizing mutations following gene duplication

Samuel Lara-González,¹ Priscila Estrella-Hernández,² Adrián Ochoa-Leyva,³ María del Carmen Portillo-Téllez,² Luis A. Caro-Gómez,⁴ Elisa E. Figueroa-Angulo,⁵ Holjes Salgado-Lugo,² Jesús F. T. Miranda-Ozuna,⁵ Jaime Ortega-López,⁶ Rossana Arroyo,⁵ Luis G. Brieba,^{2*} and Claudia G. Benítez-Cardoza^{4*}

¹ IPICYT, División de Biología Molecular, Camino a la Presa San José 2055, San Luis Potosí, San Luis Potosí, México, CP 78216

² Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Apartado Postal 629, Irapuato, Guanajuato, México, CP 36500

³ Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), Secretaría de Salud, D.F., México, CP 01900

⁴ Laboratorio de Investigación Bioquímica, Programa Institucional en Biomedicina Molecular ENMyH-IPN, Guillermo Massieu Helguera No. 239, La Escalera Ticoman, D.F., México, 07320

⁵ Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Col. San Pedro Zacatenco, Av. IPN, 2508, D.F., México, CP 07360

⁶ Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Col. San Pedro Zacatenco, Av. IPN, 2508, D.F., México, CP 07360

ABSTRACT

We report the structures and thermodynamic analysis of the unfolding of two triosephosphate isomerases (TvTIM1 and TvTIM2) from *Trichomonas vaginalis*. Both isoforms differ by the character of four amino acids: E/Q 18, I/V 24, I/V 45, and P/A 239. Despite the high sequence and structural similarities between both isoforms, they display substantial differences in their stabilities. TvTIM1 (E18, I24, I45, and P239) is more stable and less dissociable than TvTIM2 (Q18, V24, V45, and A239). We postulate that the identities of residues 24 and 45 are responsible for the differences in monomer stability and dimer dissociability, respectively. The structural difference between both amino acids is one methyl group. In TvTIMs, residue 24 is involved in packing α -helix 1 against α -helix 2 of each monomer and residue 45 is located at the center of the dimer interface forming a "ball and socket" interplay with a hydrophobic cavity. The mutation of valine at position 45 for an alanine in TvTIM2 produces a protein that migrates as a monomer by gel filtration. A comparison with known TIM structures indicates that this kind of interplay is a conserved feature that stabilizes dimeric TIM structures. In addition, TvTIMs are located in the cytoplasm and in the membrane. As TvTIM2 is an easily dissociable dimer, the dual localization of TvTIMs may be related to the acquisition of a moonlighting activity of monomeric TvTIM2. To our knowledge, this is the simplest example of how a single amino acid substitution can provide alternative function to a TIM barrel protein.

Proteins 2014; 82:22–33.

© 2013 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: TIM barrel; crystal structures; thermodynamic analysis of the unfolding; monomer association; moonlighting protein.

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Grant sponsor: ICYTDF project "PICSA 10-19, 6968-*Diseño racional, síntesis y evaluación de fármacos contra la infección de transmisión sexual tricomonosis*" (to CGBC); Grant sponsor: ICYTDF-299 and ICYTDF-219 (to RA); Grant sponsor: CONACYT; Grant number: CB-2009-128647 (to LGB), CB-2008-101229, and SIP-IPN 20120190 and 20130366 (to CGBC), CB-153093, and Salud 162123 (to RA).

MCPT, PEH, and LACG are recipients of CONACYT postdoctoral, doctoral and master's fellowships, respectively. EFA was recipient of ICYTDF-299 postdoctoral fellowship.

*Correspondence to: Claudia G. Benítez-Cardoza, Laboratorio de Investigación Bioquímica, Programa Institucional en Biomedicina Molecular ENMyH-IPN, Guillermo Massieu Helguera No. 239, La Escalera Ticoman 07320, D.F., México. E-mail: benil972uk@gmail.com and Luis G. Brieba, Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Apartado Postal 629, Irapuato, Guanajuato, Mexico, CP 36500 E-mail: lbrieba@langebio.cinvestav.mx

Received 7 October 2012; Revised 1 May 2013; Accepted 3 May 2013

Published online 4 June 2013 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

DOI: 10.1002/prot.24333

INTRODUCTION

Triosephosphate isomerase (TIM) is a homodimeric enzyme that catalyzes the isomerization between glyceraldehyde 3-phosphate and dihydroxyacetone phosphate with a turnover number approaching diffusion limit.¹ The crystal structure of chicken TIM depicted this enzyme as a periodical arrangement of alternate α -helices and β -strands. The β -strands are arranged in an inner cylinder, whereas the α -helices form an outer cylinder. This fold is dubbed $(\beta/\alpha)_8$ barrel or TIM barrel.² To date the crystal structures of at least 25 TIMs from different species have been solved by X-ray crystallography. TIM is only active as a dimer except in archaea, and some thermophilic bacteria where it forms a tetramer.³ The TIM dimer is held by an extended interface that comprises α -helices 2 and 3 and loop 3. In humans, several mutations that disrupt the dimer interface lead to loss of thermal stability and disease.^{4,5}

TIM is an essential enzyme and is a potential drug target against pathogens, especially for those that depend heavily on glycolysis, like the amitochondriated protozoan parasites *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Trichomonas vaginalis*. In the majority of organisms there is only one TIM encoding gene, being the exceptions plants, teleost fishes, and some pathogenic unicellular organisms.^{3,6} Recently, we reported that TIMs from *T. vaginalis* are the duplicated genes with the highest sequence identity from all genomes sequenced to date.⁷ It has been hypothesized that gene duplication may be a source of new protein functions at later stages⁸ like in glutathione S-transferases (GSTs) in which point mutations shape substrate selectivity,⁹ giving origin to neofunctionalization events.

In this work we report the structural and biophysical characterization of two TIM isoenzymes from *T. vaginalis*. Our analysis indicates that TvTIM2 contains one destabilizing mutation at the dimer interface that leads to higher dimer dissociation, as well as at least one amino acid change that implies lower monomer stability. The localization of residue 45 suggests that the TIM dimer is held by hydrophobic interactions between monomers reminiscent of the "ball and socket" or "clasp and key" model proposed for GSTs and Cro dimerization, respectively.^{10,11}

MATERIALS AND METHODS

Heterologous expression and purification

TvTIMs were purified as reported previously by metal chelate affinity chromatography (IMAC) and gel filtration. Proteins were dialyzed against 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl and stored at 4°C. TvTIM2 V45A mutant was constructed using the forward primer 5'-GTTGTTGCTGCTCCATTCGCTTT

CCTCCCAACACTCCAGCAG and the reverse primer 5'-CTGCTGGAGTGTGGGAGGAAAG CGAATGGAGCAG-CAACAAC. The oligomeric state of TvTIMs was assessed by gel filtration.

Crystallization, data collection, and structure determination

Crystallization experiments were carried out using the hanging-drop vapor-diffusion method at 296 K. TvTIM1 and TvTIM2 were concentrated to 5 mg mL⁻¹ to setup drops of equal volumes of protein and precipitant. The reservoir contained 0.2 M calcium acetate, 0.1 M sodium cacodylate pH 6.5 and 18% PEG 8000. Protein crystals grew overnight and were allowed to reach a maximum size of 300 μ m \times 100 μ m \times 40 μ m and flash frozen in mother liquor supplemented with 20% glycerol.

Data were collected from single crystals on a RAXIS IV++ detector using a Rigaku Micromax 002+ sealed tube X-ray generator, processed with MOLSFLM and scaled with SCALA from the CCP4 package. Data quality was assessed using the program phenix.xtriage from the PHENIX package.¹² The X-ray structures of TvTIM1 and TvTIM2 were solved by molecular replacement in space group $P2_12_12$ with the program PHASER.¹³ TIM coordinates of *Tenebrio molitor* (PDB id 219E)¹⁴ were used as search model. Several cycles of simulated annealing were performed with PHENIX. Manual model adjustment to improve the fit to likelihood-weighted electron-density maps was carried out using Coot.¹⁵ Solvent molecules were added where supported by both chemistry and geometry, and difference electron density was $>3\sigma$. The quality of the model was checked using the MolProbity server.¹⁶ Structural models were rendered with PyMOL and UCSF Chimera. A summary of data collection statistics and refinement is given in Table I.

Thermal denaturation transitions monitored by circular dichroism spectroscopy

Circular dichroism (CD) measurements were performed in a JASCO J-815 spectropolarimeter (Jasco, Easton, MD) and recorded from 200 to 250 nm, using 1.0-cm path length cells. Ellipticities are reported as the mean residue ellipticity $[\theta]$. Thermal denaturation transitions were followed by continuously monitoring ellipticity changes at a fixed wavelength of 220 nm, while the temperature of the sample was increased at a constant heating rate, usually 2°C min⁻¹. Heating profiles were controlled through the Peltier accessory. Protein solutions were prepared from 10 to 120 μ g mL⁻¹ as indicated.

Fluorescence

Fluorescence spectra were obtained using an LS-55 Spectrofluorometer (Perkin-Elmer) using cells with a path length of 1.0 cm, at 25°C. The excitation wavelength was

Table 1
Data Collection and Refinement Statistics

	TvTIM1	TvTIM2
Gene	TVAG_497370	TVAG_096350
PDB code	3QSR	3QST
Data collection		
Space group	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2
Resolution range (Å)	38.01–2.05 (2.16–2.05) ^a	24.80–1.75 (1.84–1.75) ^a
Unit cell parameters		
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	46.82, 55.75, 103.94	46.81, 56.22, 105.41
α , β , γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90
No. of measured reflections	1,09,044 (13,485)	2,45,945 (34,565)
No. of unique reflections	15,748 (2,003)	28,178 (3,940)
Completeness (%)	88.8 (79.4)	98.1 (95.9)
Redundancy	6.9 (6.7)	8.7 (8.8)
Mean <i>I</i> / σ (<i>I</i>)	16.5 (4.6)	43.8 (17.9)
<i>R</i> _{merge} (%)	9.3 (43.3)	3.5 (10.9)
Refinement		
Resolution range (Å)	35.86–2.05 (2.16–2.05)	24.80–1.75 (1.81–1.75)
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free} (%)	0.176/0.222	0.158/0.186
Reflections used (work/free)	14,713/999	26,740/1408
Number of molecules per asymmetric unit	1	1
Nonhydrogen atoms	1888	1921
Water molecules	182	253
Average B-factor (Å ²)		
Protein	19.2	19.1
Solvent	26.2	30.8
RMSD from ideal geometry		
Bond lengths (Å)	0.005	0.008
Bond angles (°)	0.935	1.149
Ramachandran statistics		
Favored (%)	97.6	98.4
Outliers (%)	0.0	0.0

*R*_{free} is calculated from the randomly selected 6.4% (3QSR) or 5% (3QST) set of reflections not included in the calculation of the *R*_{work} value.
^aValues in parentheses are for highest resolution shell.

280 nm and the emission spectra were collected from 300 to 400 nm. The fluorescence spectral center of mass (SCM) was calculated from the fluorescence intensity data (*I* _{λ}), obtained at different wavelengths (λ) from 300 to 400 nm, using the equation¹⁷:

$$SCM = \frac{\sum (\lambda \times I_{\lambda})}{\sum I_{\lambda}} \quad (1)$$

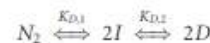
GdnHCl induced unfolding/refolding of TIM

Stock solutions of protein were used to prepare 10, 30, or 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ TIM solutions at different GdnHCl concentrations from 0 to 6 M, respectively, with 0.1 M intervals. The samples were incubated at 25°C. Spectra were recorded after 2, 24, 48, 72, and 96 h of incubation. GdnHCl concentration was determined by measuring the refractive index and the following equation:

$$[\text{GdnHCl}] = 57.14(\Delta N) + 36.68(\Delta N)^2 - 91.60(\Delta N)^3 \quad (2)$$

where ΔN is the difference between the refractive index of the GdnHCl solution and that of the buffer.¹⁸

Data analysis was performed considering a three state model involving a monomeric intermediate.



where *N*₂, *I*, and *D* are native, monomeric intermediate, and unfolded protein, respectively.^{19,20} For this model the equilibrium constants *K*_{*D*,1} and *K*_{*D*,2} for the dissociation and unfolding steps are defined as:

$$K_{D,1} = \frac{[I]^2}{[N_2]} \quad (3)$$

$$K_{D,2} = \frac{[D]}{[I]} \quad (4)$$

The total protein concentration in terms of monomer is *P*_{*t*} = 2[*N*₂] + [*I*] + [*D*], and *f*_{*N*₂} + *f*_{*I*} + *f*_{*D*} = 1, where *f*_{*N*₂}, *f*_{*I*}, and *f*_{*D*} represent the fractions of the native, monomeric intermediate, and unfolded species, respectively. Combining these relationships results in:

$$K_{D,1} = \frac{2P_t f_I^2}{f_{N_2}} \quad (5)$$

$$K_{D,2} = \frac{f_D}{f_I} \quad (6)$$

*f*_{*N*₂} and *f*_{*D*} can be defined in terms of *f*_{*I*}, *K*_{*D*,1}, *K*_{*D*,2}, and *P*_{*t*}. *f*_{*I*} was obtained using:

$$f_I = \frac{-K_{D,1}(1 - K_{D,2}) + \sqrt{K_{D,1}^2(1 + K_{D,2})^2 + 8P_t K_{D,1}}}{4P_t} \quad (7)$$

The observed value of measured “*y*” parameter was assumed to be additive, according to the following equation:

$$y = y_{N_2} f_{N_2} + y_I f_I + y_D f_D \quad (8)$$

where, *y*_{*N*₂}, *y*_{*I*}, and *y*_{*D*} are the characteristic spectroscopic values for the native, intermediate, and denatured states. The fitting equation was obtained by substituting Eqs. (5) and (6) in (8):

$$y = y_{N_2} \left(\frac{2P_t f_I^2}{K_{D,1}} \right) + y_I (f_I) + y_D (K_{D,2} f_I) \quad (9)$$

*K*_{*D*,1} and *K*_{*D*,2} were defined according to the linear free energy model, which states that the free energy of unfolding varies linearly with concentration of denaturant,²⁰ therefore:

$$\Delta G_{D,1} = \Delta G_{D,1}^{H_2O} - m_1 [\text{denaturant}] \quad (10)$$

and

$$\Delta G_{D,2} = \Delta G_{D,2}^{H_2O} - m_2 [\text{denaturant}] \quad (11)$$

where $\Delta G_{D,1}^{H_2O}$ $\Delta G_{D,2}^{H_2O}$ are the free energy of unfolding and dissociation in the absence of denaturant, m_1 and m_2 are the constants of proportionality relating to the solvent exposure difference between native and intermediate or intermediate and denatured states respectively.

The change of Gibbs free energy of folding ($\Delta G_{N_2-D}^{H_2O}$) is the difference in free energy between the unfolded monomers and the native dimer in the absence of denaturant and can be calculated from $\Delta G_{D,1}^{H_2O}$ and $\Delta G_{D,2}^{H_2O}$:

$$\Delta G_{N_2-D}^{H_2O} = \Delta G_{D,1}^{H_2O} + 2\Delta G_{D,2}^{H_2O} \quad (12)$$

The constant of proportionality relating to the solvent exposure difference between native and denatured states m_{N_2-D} can be calculated from m_1 and m_2 ¹⁹:

$$m_{N_2-D} = m_1 + 2m_2 \quad (13)$$

Energy analysis of interfacial residues of TvTIMs

TvTIMs structural coordinates were optimized at 298 K using the RepairPDB command available in FoldX before free energy computations.²¹ The interface residues were recognized using the FoldX complex analysis module. Every interfacial residue in both monomers was mutated *in silico* to alanine and the change in the free energy for folding ($\Delta\Delta G_{\text{Folding}}$) between the mutant and wild type was computed using mutate multiple residues module of FoldX. The obtained values were used to analyze the destabilizing mutations in the interface of both TvTIM structures. We also computed the change in interaction energy for each interfacial residue upon alanine mutation ($\Delta\Delta G_{\text{Interaction}} = \Delta G_{\text{Int,Ala}} - \Delta G_{\text{Int,WT}}$). The value of each energy calculation represent the average of five runs computed at 298 K, pH 7, ionic strength of 0.05 M and van der Waals design of 2.

In silico alanine scanning of all TIMs crystal structures

The coordinates of 24 TIMs from different species reported to date in the PDB were separated in the two corresponding monomers using Swiss PDB Viewer, obtaining three structures for each protein: dimer, monomer A and monomer B. *In silico* alanine scanning mutagenesis was performed for all residues in dimer and monomers by alanine scan module of FoldX. To obtain the destabilizing residues, the change in the free energy for folding of dimer ($\Delta\Delta G_{\text{Folding-Dimer}}$) between the mutant and the wild type was calculated as follows:

$$\begin{aligned} \Delta\Delta G_{\text{Folding-Dimer}} = & (\Delta\Delta G_{\text{Folding-monomer-A-in-dimer}} + \\ & \Delta\Delta G_{\text{Folding-monomer-B-in-dimer}}) \\ & - (\Delta\Delta G_{\text{Folding-monomer-A}} + \\ & \Delta\Delta G_{\text{Folding-monomer-B}}) \end{aligned} \quad (14)$$

where $\Delta\Delta G_{\text{Folding-monomer-A-in-dimer}}$ is the change in the free energy by alanine mutation only in monomer A in dimer complex, $\Delta\Delta G_{\text{Folding-monomer-B-in-dimer}}$ is the change in the free energy by alanine mutation only in monomer B in dimer complex, $\Delta\Delta G_{\text{Folding-monomer-A}}$ is the change in the free energy by alanine mutation in monomer A without dimer complex and $\Delta\Delta G_{\text{Folding-monomer-B}}$ is the change in the free energy by alanine mutation in monomer B without dimer complex.

The $\Delta\Delta G_{\text{Folding-Dimer}}$ represents the change in the free energy for folding between the mutant and wild-type dimers minus the change in the free energy for folding between mutant and wild-type monomers. The destabilizing mutations for dimer were identified by an increased change in the $\Delta\Delta G_{\text{Folding-Dimer}} > 1.5$ kcal mol⁻¹ (6.28 kJ mol⁻¹).

Indirect immunofluorescence assay

Parasites were processed for indirect immunofluorescence as previously reported.⁷ Briefly, parasites grown on normal-iron conditions were fixed with paraformaldehyde at 4% for 1 h at 37°C, washed with PBS and blocked with 1% fetal bovine serum and 0.2 M glycine for 15 min and 1 h at room temperature, respectively. Parasites were incubated for 18 h at 4°C with the anti-TvTIM2 antibody or preimmune serum, used as negative control, both at 1:1000 dilution. Afterward, trichomonads were incubated with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody (1:100) for 1 h at room temperature, washed and counterstained with DIL (DIL-CM-38; Molecular Probes, 1:2000) and mounted with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-Vectashield solution.

RESULTS

TvTIMs have a structurally similar (β - α)₈ barrel fold

Structural data were refined to 2.05 and 1.75 Å with R_{free} values of 0.176 and 0.158 for TvTIM1 and TvTIM2, respectively (Table I). TvTIMs crystallized in space group $P2_12_12_1$, with one molecule present in the asymmetric unit. The extended surface area between adjacent molecules was used to construct the biological dimer by symmetry operators. Thus, a local twofold symmetry of monomers formed a tightly packed dimer. Electron density was observed for all residues, but some solvent exposed side chains were modeled as alanines due to poor electron density. The quaternary structure of TvTIMs are superimposable with a RMSD of 0.15 Å and show the conservation of the (β - α)₈ barrel fold [Fig. 1(A)]. For TvTIM1 and TvTIM2, 97.6 and 98.4% of their amino acids lie in the most favored region of the Ramachandran plot. The large catalytic loop 6 (residues 165–177) is in an open conformation and both dimers

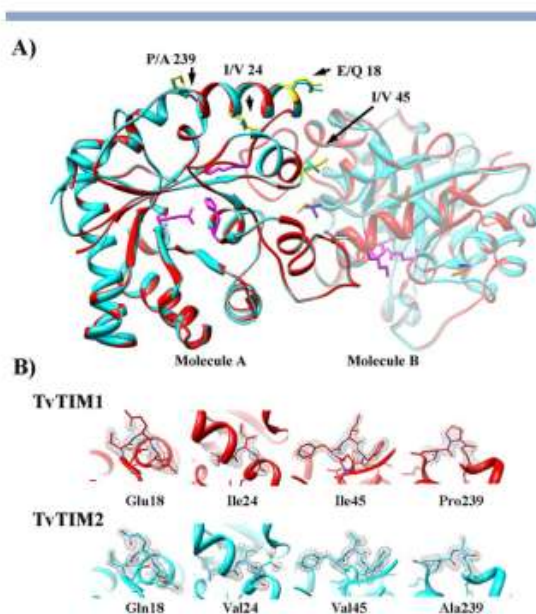


Figure 1

Crystal structures of TvTIMs. (A) Superimposition of the crystal structures of TvTIM1 and TvTIM2. Secondary structural elements of TvTIM1 and TvTIM2 are colored in red and cyan, respectively. Differential residues for TvTIM1 are in stick representation and colored yellow for monomer A and orange for monomer B, whereas differential residues for TvTIM2 are colored cyan and blue for monomer A and B, respectively. Amino acids corresponding to the conserved active site (Lys 11, His 94 and Glu 166) are colored in magenta. (B) Electron density Omit map ($2|F_{obs}| - |F_{calc}|$) contoured at 2 sigma and depicting the side chains that differ between TvTIM1 and TvTIM2. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

are stabilized by the insertion of loop 3 from one monomer into the active site of the other monomer and a hydrophobic surface area of approximately 3500 Å². This area is similar to the area observed in TIMs from other parasites such as *E. histolytica*, *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei*, and *Leishmania mexicana*.^{22–25}

Electron density omit maps define unambiguously the character or residues Ile/Val at positions 24 and 45 as an extra lobe corresponding to the gamma methyl group of Ile. Electron density is observed for the contiguous pyrrolidine ring of trans-proline 239 in TvTIM1 and the methyl group of Ala239 in TvTIM2. Residues Glu and Gln18 are not differentiable in omit maps as their electron density is similar; however, the solvent exposed side chain of Glu18 TvTIM1 is poorly ordered in comparison to Gln18 of TvTIM2 [Fig. 1(B)].

Thermal and chemical unfolding of TvTIMs

Thermal denaturation profiles of TvTIM1 and TvTIM2 show single sigmoidal curves, as for most TIMs studied

Table II

Temperature of the Midpoint of Thermal Denaturation (T_{1/2}) for TvTIM1 and TvTIM2a

Isoform	10 μg mL ⁻¹ (°C)	15 μg mL ⁻¹ (°C)	30 μg mL ⁻¹ (°C)	60 μg mL ⁻¹ (°C)	120 μg mL ⁻¹ (°C)
TvTIM1	61.5 (0.2)	63.2 (0.1)	63.8 (0.2)	64.6 (0.1)	67.1 (0.1)
TvTIM2	62.9 (0.2)	63.2 (0.1)	63.2 (0.2)	63.2 (0.1)	63.1 (0.2)

^aData were estimated from thermal denaturation transitions carried out at 2°C min⁻¹. Standard errors are indicated in parentheses.

up to date^{22,23,26–37} (Supporting Information Fig. S1). The thermal profiles of TvTIM1 and TvTIM2 show that the thermal denaturation transitions of TvTIM1 are shifted to higher temperatures with increasing protein concentration. On the contrary, the denaturation profiles of TvTIM2 are almost identical, and we do not observe the effect of protein concentration in the midpoint of the profiles (Table II). Therefore, thermal denaturation profiles of TvTIM1 exhibit the expected behavior for a dimeric protein; in contrast, TvTIM2 shows the commonly observed thermal-denaturation transitions for monomeric proteins.

To further investigate the stability and the dissociation/unfolding reactions of TvTIM1 and TvTIM2 we carried out GdnHCl-induced denaturation assays monitoring the changes on intrinsic fluorescence for up to 96 h. The results of these experiments performed for each TvTIM indicate that the unfolding reaction progresses to reach completion near 48 h (Fig. 2). Profiles obtained at 72 and 96 h were mostly superimposable to those obtained at 48 h (data not shown). Therefore, the data at 48 h of incubation were selected to calculate the thermodynamic parameters associated to chemical denaturation. Most of the profiles are biphasic (except for those obtained for TvTIM2, at 10 μg mL⁻¹), indicating the presence of a possible intermediate conformation in the denaturation pathway. The intermediate becomes slightly less noticeable (populated) in the curves obtained at the highest protein concentration studied (50 μg mL⁻¹). For dimeric proteins, a monomeric intermediate becomes more populated as protein concentration decreases.^{19,20} According to this, the chemical unfolding of TvTIMs occurs via a three-state model, involving a monomeric intermediate. The first transition observed in fluorescence for both TvTIMs is almost transparent to far-UV CD signal (Supporting Information Fig. S2); therefore, we propose that the monomeric intermediate conserves mostly its secondary structure. Furthermore, we observe that denaturation profiles of TvTIM1 appear at slightly higher denaturant concentrations than those of TvTIM2, indicating that TvTIM1 might be a more stable protein than TvTIM2 and that the denaturation curves for TvTIM1 show higher concentration dependence than those of TvTIM2. Then again, the concentration dependence of the denaturation profiles of TvTIM2

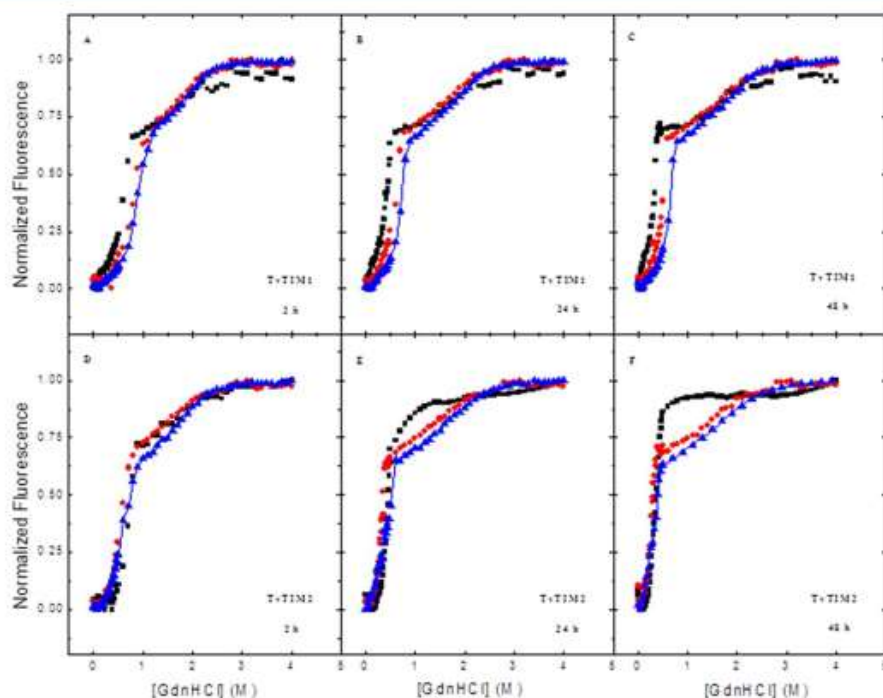


Figure 2

Gdn-HCl-induced denaturation profiles of TvTIMs. Gdn-HCl-induced denaturation profiles of TvTIM1 (panels A–C) and TvTIM2 (panels D–F) monitored by fluorescence spectroscopy (samples were excited at 280 nm) in a buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.4 and 10 mM NaCl at 25°C. Samples were incubated for 2 h (panels A and D), 24 h (panels B and E), and 48 h (panels C and F). Protein concentration was 10 (black squares), 30 (red circles) or 50 (blue triangles) $\mu\text{g mL}^{-1}$. Continuous lines in all panels are fitting of experimental data to Eq. (9). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

is less evident within the protein concentration range analyzed, consistently with the temperature-induced denaturation results. A three-state dimer model involving a monomeric intermediate was applied to both TvTIMs. In this case the denaturation profiles of both TIMs show evidence of the monomeric species. The best fit to the data are shown in Figure 2 (continuous lines of the curves, panels C and F) and the thermodynamic parameters obtained are shown in Table III. For both TvTIMs, the model was applied globally with thermodynamic parameters shared throughout all datasets. The free

energy change corresponding to complete unfolding of dimer to form two unfolded monomers in the absence of denaturant for a standard state of 1 mol of dimer, $\Delta G_{N_2 \rightarrow D}^{\text{H}_2\text{O}}$, is calculated to be 206.3 and 150.1 kJ mol^{-1} , for TvTIM1 and TvTIM2, respectively. The free energy difference between native dimer and monomeric intermediate, $\Delta G_{D,1}^{\text{H}_2\text{O}}$, is 35.7 and 19.1 kJ mol^{-1} for TvTIM1 and TvTIM2 datasets, respectively. The monomeric intermediates have a stability of 86.2 and 65.3 kJ mol^{-1} for TvTIM1 and TvTIM2. From these data we confirm that TvTIM1 is a more stable protein than TvTIM2. The

Table III

Apparent Thermodynamic Parameters for TvTIM1 and TvTIM2 denaturation. Model: $N_2 \rightarrow 2I \rightarrow 2U$

Isoform	$\Delta G_{D,1}$ (kJ mol^{-1}) ^a	m_1 ($\text{kJ mol}^{-1} \text{M}^{-1}$) ^a	$\Delta G_{D,2}$ (kJ mol^{-1}) ^a	m_2 ($\text{kJ mol}^{-1} \text{M}^{-1}$) ^a	$\Delta G_{N_2 \rightarrow D}^{\text{H}_2\text{O}}$ (kJ mol^{-1}) ^b	$m_{N_2 \rightarrow D}$ ($\text{kJ mol}^{-1} \text{M}^{-1}$) ^c
TvTIM1	35.7 (3.1)	100.2 (26)	86.2 (7.6)	1.2 (0.2)	201.3 (12)	104.8 (6)
TvTIM2	19.1 (2.8)	40 (5.3)	65.3 (5.2)	0.5 (0.2)	150.1 (8)	41.2 (5)

^aMeasurements were made at 25°C and pH 7.4. Global analysis was performed with the nonlinear, least-squares fitting program Origin, version 7.0. Standard deviations are indicated in parentheses.

^bCalculated according to Eq. (12).

^cEstimated using Eq. (13).

highest stability of TvTIM1 relies on both, less dissociability as well as more stable monomers compared to TvTIM2.

The thermodynamic parameters obtained from the fit to a three-state dimer denaturation model with a monomeric intermediate gave the free energy of unfolding from native dimer to denatured monomers, $\Delta G_{N_2-D}^{H_2O}$ is higher compared to TIMs from another species [84–140 kJ mol⁻¹].³⁸ However, it is important to bear in mind that the thermodynamic parameters for TIMs from other species have been obtained at different experimental conditions, and that sequence variations importantly influences protein stability. It is important to highlight that for all TIMs where a monomeric intermediate is populated in the unfolding pathway, and the free energy difference between dimer and monomeric intermediate, $\Delta G_{D,I}^{H_2O}$ has been calculated, this value accounts for most of the stability ($\approx 70\%$), and commonly TIMs monomers are very unstable.^{17,39–42} Interestingly, we encountered that subunit association represents 30–35% of the total stability of TvTIMs and both TvTIMs monomers are significantly more stable compared to other TIMs monomers.³⁸

Regarding the GdnHCl-induced denaturation profiles obtained for TvTIM2, at 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (24 and 48 h of incubation time), we can observe that the fluorescence emission signal is shifted toward the characteristic value of the unfolded state. These curves correspond to the lowest protein concentration studied of the isoenzyme with the highest dimer dissociation. Therefore, the dimeric conformation is less favored in this case, which might accelerate the progression of the reaction toward the fully unfolded conformation. None of the other chemical denaturation curves exhibit this behavior even after 96 h of incubation.

Rationalizing the differential stability between TvTIMs monomers: the identity of residue 24

As the sequences of TvTIM1 and TvTIM2 differ by only four amino acids. We reasoned that a residue located in packing the hydrophobic core of TvTIMs maybe responsible for the 20.9 kJ mol⁻¹ change in stability of both TvTIM monomers. Thus, we focus in region surrounding residue I/V 24 (Fig. 3). In TvTIM2 the substitution of residue 24 for valine produces a small pocket of 11.1 \AA^3 with an area of 21 \AA^2 . The removal of a methyl group cause a decrease in stability between -0.42 and 9.6 kJ mol⁻¹ for several Ile to Val mutations, and it has been established that the differential in stability is related to the loss of van der Waals interactions and the difference in hydrophobicity.⁴³ To investigate the role of residue I/V 24 in monomer stability, we tested the effect of alanine mutation by *in silico* alanine scanning using FoldX. We found that the change in free

energy for folding between the mutant and wild-type monomers by mutations V24A and I24A are 18.4 and 24.2 kJ mol⁻¹, respectively. Despite both mutations are destabilizing for monomer structures, the mutation to alanine in TvTIM2 is 5.9 kJ mol⁻¹, more destabilizing respect to TvTIM1. These computational results suggest that the differential monomer stability for TvTIM1 can be due to the identity of residue 24.

Rationalizing the differential dissociability between TvTIMs dimers: the identity of residue 45

Residue 45 is the only amino acid that lies within the dimer interface. TvTIM1 presents an isoleucine, whereas TvTIM2 possesses a valine. Residue 45 is located at a pseudosymmetrical center of the TIM barrel and fits into a hydrophobic cavity of the other monomer resembling a “ball and socket” in which a hydrophobic cavity formed by residues P43, F44, F46, L47, P48, V77, M81, I82, and F85 in which both beta branched amino acids (Ile45 or Val45) position their methyl groups. The gamma methyl of Ile 45 snugly fits into the hydrophobic socket, whereas the lack of a methyl group in TvTIM2 (Val 45) gives rise to a cavity (Supporting Information Fig. S3). The volume of the pocket of each TvTIM was calculated using two different algorithms. We found that this volume is altered depending of the socket identity (Fig. 4). When using the POCASA algorithm the pocket volumes were 314 and 261 \AA^3 for TvTIM1 and TvTIM2, respectively. The FPOCKET gave a pocket volume of 163.1 \AA^3 for TvTIM1, whereas this pocket is not detectable in TvTIM2.^{44,45} The changes in the pocket volumes might be attributed to the repacking of the side chains. For instance, Ile82 appears to function as an adaptor which modifies the cavity of both TvTIMs. In TvTIM2 the distance between the beta carbon of V45 and the delta carbon of Ile82 is 4.78 \AA ; whereas in TvTIM1 at the same position, the distance involving the beta carbon of Ile45 and the delta carbon of Ile82 is 6.65 \AA (Fig. 4).

We tested the effect of point mutations on every interfacial residue site by alanine *in silico* using FoldX and computed the changes in the free energy for folding ($\Delta\Delta G_{\text{Folding}}$) and in the interaction energy ($\Delta\Delta G_{\text{Interaction}}$) between the mutant and wild type. The computed free energy changes are shown in Supporting Information Table S1. This analysis showed that residue I45 of TvTIM1 is one of the most energetically favored interactions in the domain-domain interface showing a change in the energy of interaction upon mutation of 24.2 kJ mol⁻¹. Also, this residue has one of the most destabilizing changes 23.1 kJ mol⁻¹.

Additionally, we computed the interaction energy for wild-type enzymes. The calculated energy of interaction is -210.3 kJ mol⁻¹ for TvTIM1 and -205.8 kJ mol⁻¹ for TvTIM2.

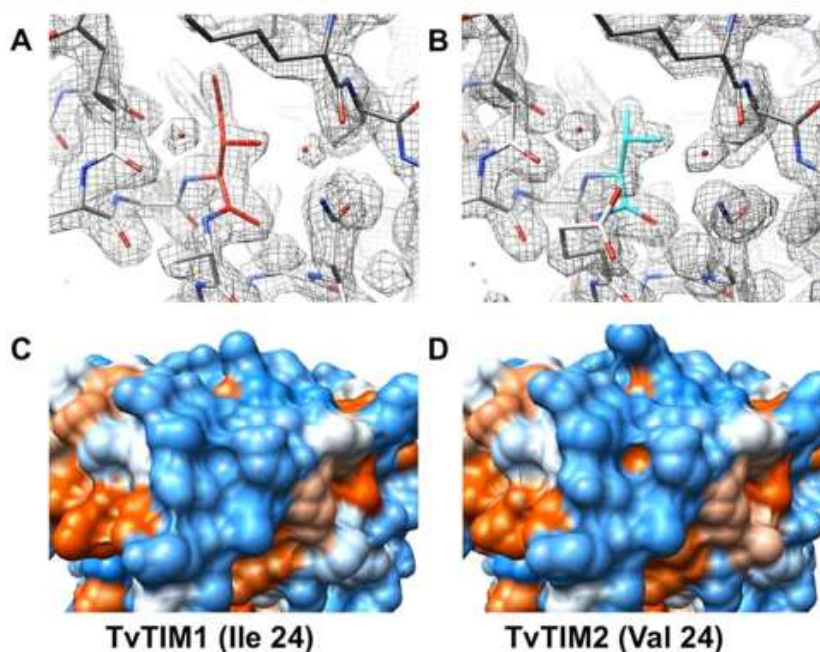


Figure 3

The identity of residue 24 in TvTIMs alters the region comprising α -helices 1 and 2. The refined TvTIM1 (A) and TvTIM2 (B) models are shown centered at residue 24 with likelihood-weighted $2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$ electron density contoured at 1.7σ ; α -helix 1 is colored light gray (residues 16–29) and α -helix 2 is colored dark gray (residues 43–54). Panels (C) and (D) shows a surface representation of TvTIM1 and TvTIM2 in which a gradient coloring from hydrophobic residues in orange to hydrophilic residues in light blue were used. The hydrophobic pocket adjacent to residue Val24 of TvTIM2 is shown in orange at the center of panel (D); it was identified with the server CASTp using a probe of 1.4\AA^3 . The pocket is not present in the corresponding region of TvTIM1 as a consequence the region is hydrophilic, panel (C). Moreover, residue 24 of TvTIM1 is not accessible as judge by its ASA value of 0.0 (PISA server). It is worth to mention that to perform the pocket analysis the side chain of residue Glu25 of TvTIM1, that is absence in the deposited pdb (Fig. 1 panel B), was added to the model supported on the weak density observed both in the likelihood-weighted $2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$ and difference maps. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

To test that the ball and socket has a meaningful contribution to the dimer stability of TvTIMs we constructed a mutant in which two carbon and four hydrogen atoms are eliminated from residue 45 of TvTIM2 (Val45Ala mutant; Supporting Information Fig. S4) and determined its oligomeric state by gel filtration chromatography. In contrast to TvTIM2 which migrates with an apparent molecular mass of 52 kDa, the Val45Ala mutant migrates with an apparent molecular mass of 26 kDa, indicating that this mutation is sufficient to alter the dimer monomer equilibrium.

Ball and socket is a common phenomena in TIMs

We were curious to know if the “ball and socket” of TvTIMs is a conserved interaction in other TIMs. Thus, we investigate its presence in TIMs for the following species: *Homo sapiens*, *Helicobacter pylori*, *E. histolytica*,

T. brucei, *Trypanosoma cruzi*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, and *Caenorhabditis elegans*. As depicted in Supporting Information Figure S5 the residue corresponding to the ball of monomer A fits into a hydrophobic cavity created by the socket of monomer B, in all analyzed species. The hydrophobic cavity is conserved in all analyzed TIM structures, with the exception of *H. pylori* in which the identity of the ball is a phenylalanine and in this case α -helix 2 folds into a large loop.⁴⁶

To investigate if the residue I45 located at the dimer interface can be responsible of the major energy of interaction between monomers of TvTIM1, we performed a structural alignment of the TIMs crystallized as dimers to date (Supporting Information Figs. S4 and S5). As observed, the identity of the “ball” in 19 structures is a beta-branched amino acid (valine, isoleucine or threonine). Two sequences have either alanine or proline, and one sequence presents either methionine or phenylalanine. On the contrary, the residues corresponding to the

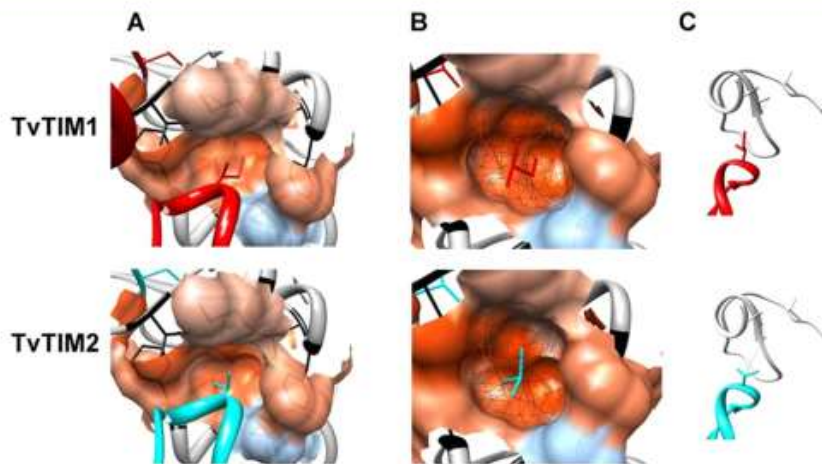


Figure 4

Plasticity of the Dimer interface. Stick representation of residue 45 at the dimer interface; TvTIM1 Ile45 is colored red (upper panels A–C), TvTIM2 Val45 is colored cyan (lower panels A–C). Facing residue 45 a portion of the dimer interface corresponding to those residues that make the socket are represented as surface, a gradient coloring from hydrophobic residues in orange to hydrophilic residues in light blue was selected to emphasize the hydrophobic properties of this region. (A) Upper panel shows Ile45 from monomer-A (red) facing monomer-B (gray) residues forming the pocket are represented as black sticks (P43, F44, F46, L47, P48, V77, M81, I82, and F85). (B) Upper panel, close view of the pocket, only the side chain of Ile45 is shown inside a mesh that represents the cavity calculated with the server CASTp. (C) Upper panel, a dashed line is showing a distance of 6.7 Å between Ile45 CB atom (monomer A) and Ile82 CD1 atom (monomer B). Lower panels (A–C) shows the same properties and interactions showed in the upper panels but for TvTIM2 residue Val45. It is worth noting that in the lower panel (C) the dashed line between Val45 CB atom (monomer A) and Ile82 CD1 atom (monomer B) represent a distance of 4.8 Å. Hence, this figure shows the role of residue Ile82 as a flexible residue that control the size of the socket. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

“socket” are not conserved (Supporting Information Fig. S5). To analyze whether ball-socket residues have similar destabilizing energies, we computed the change in $\Delta\Delta G$ (Folding) by alanine mutation of each residue. Interestingly, the results show that ball-socket residues are in the list of the most destabilizing residues for dimer stability and that those have similar changes in $\Delta\Delta G$ (folding) observed in TvTIMs (Supporting Information Table S1).

TvTIMs are located in the outer membrane

Some metabolic enzymes from *T. vaginalis* like pyruvate ferredoxin oxidoreductase, α -enolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, among others have been characterized as moonlighting proteins.^{47–49} As TIM is an adhesion molecule in fungi and bacteria, we speculated that the decrease in stability of TvTIM2, might be an indication of a neofunctionalization event.

Thus, we investigated the subcellular localization of TvTIMs by immunofluorescence assays using fixed and nonpermeabilized parasites using TvTIM2 polyclonal antibodies and a lipophilic membrane probe (DIL; Fig. 5). Confocal microscopy images indicate that TvTIMs are located in the outer membrane. The FITC antibody

merges the lipophilic membrane probe [Fig. 5(D)] but not in a control treated with the preimmune serum [Fig. 5(I)]. Being a glycolytic enzyme, TvTIMs are also localized in the cytosol (data not shown). This dual cellular localization is in clear contrast to the cytosolic localization of TIM from the closest protozoa *G. lamblia*.⁵⁰

DISCUSSION

Herein we characterized two isoforms of TvTIMs that only differ in four amino acids. The thermal denaturation transitions of TvTIM1 obtained at different protein concentrations show the expected behavior for a dimeric protein in contrast TvTIM2 thermal denaturation profiles do not exhibit protein concentration dependence, as it is commonly observed for monomeric proteins. TvTIM1 has a $\Delta G_{D,1}^{H_2O}$ almost two fold to that of TvTIM2. The Ile/Val substitution at position 45 is probable to be responsible for the stability of TvTIM, because this residue lies within the center of pseudosymmetry at the interface. In the other hand, TvTIM1 monomer is about 25% more stable than TvTIM2 monomer. As it will be discussed in the coming section it is very likely that also a substitution Ile/Val in this case at position 24

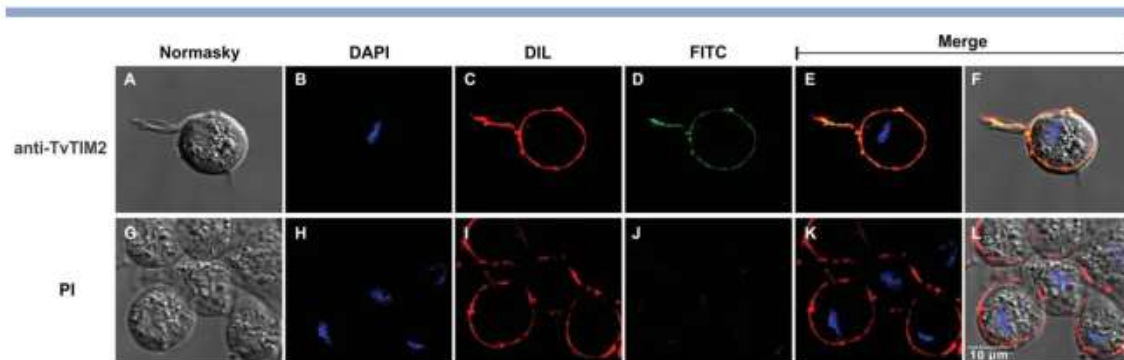


Figure 5

TvTIMs are located in the membrane. Indirect immunofluorescence analysis of fixed and nonpermeabilized parasites. (A–F) Parasites treated with anti-TvTIM2 antibody (1:100) and secondary antibody conjugated with FITC. (G–L) Parasites incubated with preimmune (PI) serum and secondary antibody conjugated with FITC. (A and G) Normasky microscopy. (B and H) Nuclei stained with DAPI (in blue). (C and I) Parasite membrane stains with DIL (in red). (D and J) TvTIMs labeled with FITC (in green). (E, F, K, and L) Merged images from DIL and FITC in yellow indicate colocalization.

might be also responsible for decreased stability of TvTIM2 monomers.

The loss of a side-chain methyl group may decrease the stability of both the monomers and the dimer interface

To rationalize the differences on the dimer stability between TvTIM1 and TvTIM2, we made a thorough inspection on the three-dimensional structure of both TvTIMs. Residues E/Q 18 and P/A 239 are solvent exposed and should not have very relevant roles in the dissociability or stability of TvTIMs. Residue I/V 24 is located in packing α -helix 1 against α -helix 2 of each monomer. Regarding differences in dissociability between TvTIM1 and TvTIM2, the only residue located at the dimer interface maybe the main responsible for the differences encountered in the $\Delta G_{D,1}^{H_2O}$ of each dimer. I/V 45 is encountered within the center of the interface (Fig. 5). Within this interface a set of nine hydrophobic residues P43, F44, F46, L47, P48, V77, M81, I82, and F85 form a strict hydrophobic surface in which residue from the neighbor molecule I/V 45 anchors. The change of an isoleucine for valine creates a differential of 27 \AA^3 because of the $-\text{CH}_3$ removal. In TvTIM2 the distances between the CG1 and CG2 of V45 and the closest carbons of the neighbors' subunits are: 3.84 \AA for CD1-Ile82, 3.8 \AA for CB-F44, and 3.98 \AA for CE2-F85. Thus, if we calculate a van der Waals radio for a carbon atom of 1.7 \AA , the distance of the cavity approaches to 0.4 \AA , being too small to be detected as a cavity. Although it is reasonable to think that the Ile to Val substitution at position 24 accounts for the decrease in monomer stability, we cannot rule out that the identity of residues E/Q18 and P/A239 are subject to epistasis and might also be involved in destabilizing interactions.

Biological implications of TIM gene duplication with destabilizing mutations

TvTIM isoenzymes are structurally similar, nevertheless, the natural substitutions between the isoforms lead to important changes in dissociability and in monomer stability. A crucial question emerges: Why does *T. vaginalis* possess two open reading frames for TIM? We thought that one of the TvTIMs could be involved in cell adhesion like is the case for TIMs from *Paracoccidioides brasiliensis* and *Staphylococcus aureus*.^{50,51} and because metabolic enzymes from *T. vaginalis* mediate cytoadherence of the parasite with epithelial cells.^{52–55} In addition, our immunofluorescence experiments show that at least one of the TvTIMs has dual cellular localizations, with an alternative localization on the cell surface. For the thermodynamic characterization and membrane localization of TvTIMs, we suggest that TvTIMs are the product of a duplication event toward moonlighting activity and that TvTIM2 might be located within the cell surface because of the substitution of four amino acid residues. However more experiments are necessary to confirm this statement.

At last but not least, TIMs are probed targets for rational drug design against several parasites. The overall structure and the catalytic site are highly conserved among TIMs. Therefore, the efforts for drug design must focus on inhibitors that interact with non catalytic residues. One strategy to fight parasites was focused on amino acid Cys14 that is solvent exposed and conserved in some protozoan parasites.^{25,56,57} Another plausible strategy might be to take advantage from differential thermodynamic stabilities between TIMs from parasites and human. In addition a nonconserved moonlighting activity of this enzyme could increase the potentiality of TIM as a drug target.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Corina Diaz Quezada, Marisol López Hidalgo, and Hugo Alberto Rojas Luna for technical expertise.

REFERENCES

1. Blacklow SC, Raines RT, Lim WA, Zamore PD, Knowles JR. Triosephosphate isomerase catalysis is diffusion controlled. Appendix: analysis of triose phosphate equilibria in aqueous solution by ^{31}P NMR. *Biochemistry* 1988;27:1158-1167.
2. Banner DW, Bloomer AC, Petsko GA, Phillips DC, Pogson CI, Wilson IA, Corran PH, Furth AJ, Milman JD, Offord RE, Priddle JD, Waley SG. Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 angstrom resolution using amino acid sequence data. *Nature* 1975;255:609-614.
3. Kohlhoff M, Dahm A, Hensel R. Tetrameric triosephosphate isomerase from hyperthermophilic Archaea. *FEBS Lett* 1996;383:245-250.
4. Orosz F, Olah J, Ovadi J. Triosephosphate isomerase deficiency: new insights into an enigmatic disease. *Biochim Biophys Acta* 2009;1792:1168-1174.
5. Rodríguez-Almazán C, Arreola R, Rodríguez-Larrea D, Aguirre-López B, de Gomez-Puyou MT, Perez-Montfort R, Costas M, Gomez-Puyou A, Torres-Larios A. Structural basis of human triosephosphate isomerase deficiency: mutation E104D is related to alterations of a conserved water network at the dimer interface. *J Biol Chem* 2008;283:23254-23263.
6. Poysti NJ, Oresnik JJ. Characterization of *Sinorhizobium meliloti* triose phosphate isomerase genes. *J Bacteriol* 2007;189:3445-3451.
7. Figueroa-Angulo E, Estrella-Hernández P, Salgado-Lugo H, Ochoa-Leyva A, Gómez Puyou A, Campos SS, Montero-Moran G, Ortega-López J, Saab-Rincón G, Arroyo R, Benítez-Cardoza CG, Brieba LG. Cellular and biochemical characterization of two closely related Triosephosphate isomerases from *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology* 2012;139:1729-1738.
8. Kondrashov FA, Rogozin IB, Wolf YI, Koonin EV. Selection in the evolution of gene duplications. *Genome Biol* 2002;3:RESEARCH0008.
9. Norrgard MA, Ivarsson Y, Tars K, Mannervik B. Alternative mutations of a positively selected residue elicit gain or loss of functionalities in enzyme evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:4876-4881.
10. LeFevre KR, Cordes MH. Retroevolution of lambda Cro toward a stable monomer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:2345-2350.
11. Wongsantichon J, Ketterman AJ. An intersubunit lock-and-key 'clasp' motif in the dimer interface of Delta class glutathione transferase. *Biochem J* 2006;394:135-144.
12. Adams PD, Afonine PV, Bunkoczi G, Chen VB, Davis IW, Echols N, Headd JJ, Hung LW, Kapral GJ, Grosse-Kunstleve RW, McCoy AJ, Moriarty NW, Oeffner R, Read RJ, Richardson DC, Richardson JS, Terwilliger TC, Zwart PH. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2010;66:213-221.
13. McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ. Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* 2007;40:658-674.
14. Knobloch D, Schmidt A, Scheerer P, Krauss N, Wessner H, Scholz C, Kuttner G, von Rintelen T, Wessel A, Hohne W. A coleopteran triosephosphate isomerase: X-ray structure and phylogenetic impact of insect sequences. *Insect Mol Biol* 2010;19:35-48.
15. Emsley P, Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2004;60:2126-2132.
16. Chen VB, Arendall WB, III, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, Kapral GJ, Murray LW, Richardson JS, Richardson DC. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2010;66:12-21.
17. Najera H, Costas M, Fernandez-Velasco DA. Thermodynamic characterization of yeast triosephosphate isomerase refolding: insights into the interplay between function and stability as reasons for the oligomeric nature of the enzyme. *Biochem J* 2003;370:785-792.
18. Nozaki Y. The preparation of guanidine hydrochloride. *Methods Enzymol* 1972;26(PtC):43-50.
19. Rumpföldt JA, Galvagnion C, Vassall KA, Meiering EM. Conformational stability and folding mechanisms of dimeric proteins. *Prog Biophys Mol Biol* 2008;98:61-84.
20. Mallam AL, Jackson SE. Use of protein engineering techniques to elucidate protein folding pathways. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2008;84:57-113.
21. Schymkowitz J, Borg J, Stricher F, Nys R, Rousseau F, Serrano L. The FoldX web server: an online force field. *Nucleic Acids Res* 2005;33:W382-W388.
22. Peimbert M, Dominguez-Ramirez L, Fernandez-Velasco DA. Hydrophobic repacking of the dimer interface of triosephosphate isomerase by in silico design and directed evolution. *Biochemistry* 2008;47:5556-5564.
23. Williams JC, Zeelen JP, Neubauer G, Vriend G, Backmann J, Michels PA, Lambeir AM, Wierenga RK. Structural and mutagenesis studies of leishmania triosephosphate isomerase: a point mutation can convert a mesophilic enzyme into a superstable enzyme without losing catalytic power. *Protein Eng* 1999;12:243-250.
24. Velanker SS, Ray SS, Gokhale RS, Suma S, Balaram H, Balaram P, Murthy MR. Triosephosphate isomerase from *Plasmodium falciparum*: the crystal structure provides insights into antimalarial drug design. *Structure* 1997;5:751-761.
25. Rodríguez-Romero A, Hernández-Santoyo A, del Pozo Yauner L, Kornhauser A, Fernández-Velasco DA. Structure and inactivation of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*. *J Mol Biol* 2002;322:669-675.
26. Schliebs W, Thanki N, Eritja R, Wierenga R. Active site properties of monomeric triosephosphate isomerase (monoTIM) as deduced from mutational and structural studies. *Protein Sci* 1996;5:229-239.
27. Schliebs W, Thanki N, Jaenicke R, Wierenga RK. A double mutation at the tip of the dimer interface loop of triosephosphate isomerase generates active monomers with reduced stability. *Biochemistry* 1997;36:9655-9662.
28. Landa A, Rojo-Dominguez A, Jimenez L, Fernandez-Velasco DA. Sequencing, expression and properties of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*. *Eur J Biochem* 1997;247:348-355.
29. Benítez-Cardoza CG, Rojo-Dominguez A, Hernandez-Arana A. Temperature-induced denaturation and renaturation of triosephosphate isomerase from *Saccharomyces cerevisiae*: evidence of dimerization coupled to refolding of the thermally unfolded protein. *Biochemistry* 2001;40:9049-9058.
30. Gopal B, Ray SS, Gokhale RS, Balaram H, Murthy MR, Balaram P. Cavity-creating mutation at the dimer interface of *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase: restoration of stability by disulfide cross-linking of subunits. *Biochemistry* 1999;38:478-486.
31. Sun J, Sampson NS. Understanding protein lids: kinetic analysis of active hinge mutants in triosephosphate isomerase. *Biochemistry* 1999;38:11474-11481.
32. Lambeir AM, Backmann J, Ruiz-Sanz J, Filimonov V, Nielsen JE, Kursula I, Norledge BV, Wierenga RK. The ionization of a buried glutamic acid is thermodynamically linked to the stability of *Leishmania mexicana* triose phosphate isomerase. *Eur J Biochem* 2000;267:2516-2524.
33. Hernandez-Alcantara G, Garza-Ramos G, Hernandez GM, Gomez-Puyou A, Perez-Montfort R. Catalysis and stability of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* with different residues at position 14 of the dimer interface. Characterization of a catalytically competent monomeric enzyme. *Biochemistry* 2002;41:4230-4238.

Influencia de la glucosa en la citotoxicidad y en la interacción de Trichomonas vaginalis con laminina y fibronectina mediada por la enzima triosafosfato isomerasa TvTIM

Structure and Stability of TvTIMs

34. Gonzalez-Mondragon E, Zubillaga RA, Saavedra E, Chanez-Cardenas ME, Perez-Montfort R, Hernandez-Arana A. Conserved cysteine 126 in triosephosphate isomerase is required not for enzymatic activity but for proper folding and stability. *Biochemistry* 2004;43:3255-3263.
35. Mixcoha-Hernandez E, Moreno-Vargas LM, Rojo-Dominguez A, Benitez-Cardoza CG. Thermal-unfolding reaction of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Protein J* 2007;26:491-498.
36. Cabrera N, Hernandez-Alcantara G, Mendoza-Hernandez G, Gomez-Puyou A, Perez-Montfort R. Key residues of loop 3 in the interaction with the interface residue at position 14 in triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*. *Biochemistry* 2008;47:3499-3506.
37. Reyes-Lopez CA, Gonzalez-Mondragon E, Benitez-Cardoza CG, Chanez-Cardenas ME, Cabrera N, Perez-Montfort R, Hernandez-Arana A. The conserved salt bridge linking two C-terminal beta/alpha units in homodimeric triosephosphate isomerase determines the folding rate of the monomer. *Proteins* 2008;72:972-979.
38. Chanez-Cardenas ME, Perez-Hernandez G, Sanchez-Rebollar BG, Costas M, Vazquez-Contreras E. Reversible equilibrium unfolding of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* in guanidinium hydrochloride involves stable dimeric and monomeric intermediates. *Biochemistry* 2005;44:10883-10892.
39. Morgan CJ, Wilkins DK, Smith LJ, Kawata Y, Dobson CM. A compact monomeric intermediate identified by NMR in the denaturation of dimeric triose phosphate isomerase. *J Mol Biol* 2000;300:11-16.
40. Rietveld AW, Ferreira ST. Deterministic pressure dissociation and unfolding of triose phosphate isomerase: persistent heterogeneity of a protein dimer. *Biochemistry* 1996;35:7743-7751.
41. Rietveld AW, Ferreira ST. Kinetics and energetics of subunit dissociation/unfolding of TIM: the importance of oligomerization for conformational persistence and chemical stability of proteins. *Biochemistry* 1998;37:933-937.
42. Moreau VH, Rietveld AW, Ferreira ST. Persistent conformational heterogeneity of triosephosphate isomerase: separation and characterization of conformational isomers in solution. *Biochemistry* 2003;42:14831-14837.
43. Pace CN, Fu H, Fryar KL, Landua J, Trevino SR, Shirley BA, Hendricks MM, Iimura S, Gajiwala K, Scholtz JM, Grimsley GR. Contribution of hydrophobic interactions to protein stability. *J Mol Biol* 2011;408:514-528.
44. Yu J, Zhou Y, Tanaka I, Yao M. Roll: a new algorithm for the detection of protein pockets and cavities with a rolling probe sphere. *Bioinformatics* 2010;26:46-52.
45. Schmidtke P, Le Guilloux V, Maupetit J, Tuffery P. fpocket: online tools for protein ensemble pocket detection and tracking. *Nucleic Acids Res* 2010;38:W582-W589.
46. Chu CH, Lai YJ, Huang H, Sun YJ. Kinetic and structural properties of triosephosphate isomerase from *Helicobacter pylori*. *Proteins* 2008;71:396-406.
47. Meza-Cervantez P, González-Robles A, Cárdenas-Guerra R, Ortega-López J, Saavedra E, Pineda E, Arroyo R. Pyruvate : ferredoxin oxidoreductase (PFO) is a surface-associated cell-binding protein in *Trichomonas vaginalis* and is involved in trichomonal adherence to host cells. *Microbiology* 2011;157:3469-3482.
48. Mundodi V, Kucknoor AS, Alderete JE. Immunogenic and plasminogen-binding surface-associated alpha-enolase of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* 2008;76:523-531.
49. Lama A, Kucknoor A, Mundodi V, Alderete JE. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a surface-associated, fibronectin-binding protein of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* 2009;77:2703-2711.
50. Pereira LA, Bao SN, Barbosa MS, da Silva JL, Felipe MS, de Santana JM, Mendes-Giannini MJ, de Almeida Soares CM. Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function. *FEMS Yeast Res* 2007;7:1381-1388.
51. Furuya H, Ikeda R. Interaction of triosephosphate isomerase from the cell surface of *Staphylococcus aureus* and alpha-(1->3)-mannooligosaccharides derived from glucuronoxylomannan of *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* 2009;155:2707-2713.
52. Arroyo R, Engbring J, Alderete JE. Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*. *Mol Microbiol* 1992;6:853-862.
53. Arroyo R, Engbring J, Nguyen J, Musatovova O, Lopez O, Lauriano C, Alderete JE. Characterization of cDNAs encoding adhesin proteins involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Arch Med Res* 1995;26:361-369.
54. Hirt RP, Noel CJ, Sicheritz-Ponten T, Tachezy J, Fiori PL. *Trichomonas vaginalis* surface proteins: a view from the genome. *Trends Parasitol* 2007;23:540-547.
55. Moreno-Brito V, Yanez-Gomez C, Meza-Cervantez P, Avila-Gonzalez L, Rodriguez MA, Ortega-Lopez J, Gonzalez-Robles A, Arroyo R. A *Trichomonas vaginalis* 120 kDa protein with identity to hydrogenosome pyruvate:ferredoxin oxidoreductase is a surface adhesin induced by iron. *Cell Microbiol* 2005;7:245-258.
56. Olivares-Illana V, Perez-Montfort R, Lopez-Calalhorra F, Costas M, Rodriguez-Romero A, Tuena de Gomez-Puyou M, Gomez Puyou A. Structural differences in triosephosphate isomerase from different species and discovery of a multitypanosomatid inhibitor. *Biochemistry* 2006;45:2556-2560.
57. Enriquez-Flores S, Rodriguez-Romero A, Hernandez-Alcantara G, Oria-Hernandez J, Gutierrez-Castrellon P, Perez-Hernandez G, de la Mora-de la Mora I, Castillo-Villanueva A, Garcia-Torres I, Mendez ST, Gomez-Manzo S, Torres-Arroyo A, Lopez-Velazquez G, Reyes-Vivas H. Determining the molecular mechanism of inactivation by chemical modification of triosephosphate isomerase from the human parasite *Giardia lamblia*: a study for antiparasitic drug design. *Proteins* 2011;79:2711-2724.