



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS
MOLECULAR

**Caracterización molecular de la aspártico proteasa tipo
catepsina D en *Trichomonas vaginalis* (Tv-CatD)**

TESIS

Que presenta

MARIA INOCENTE MANCILLA OLEA

Para obtener el grado de

**DOCTORA EN CIENCIAS EN INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS
MOLECULAR**

Directora de la Tesis

Dra. Rossana Arroyo Verástegui

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio No 11, del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), con donativos 162123, 153093. Bajo la dirección de la Dra. Rossana Arroyo Verástegui.

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del donativo de Finnova 237937 (R.A).
Becaria del CONACyT No. 243441 (M.I.M.O.).

Asesores de Tesis:

Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres.

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, CINVESTAV-IPN.

Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez.

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, CINVESTAV-IPN.

Dr. Jaime Ortega López.

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN.

Dr. Santiago Martínez Calvillo

Unidad de Biomedicina de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la UNAM.

Agradecimientos

A Dios:

Le doy gracias por haberme permitido concluir esta etapa en mi vida. Gracias por mi familia, por mis amigos y por tantas personas que me quieren.

A mi esposo:

A mi Jaime, te encontré en esta etapa del doctorado y fuiste una gran bendición que llegó para quedarse a mi lado, fuiste el mejor apoyo en esta última etapa para concluir. Te amo con todo mi corazón.

A mis padres:

Por apoyarme y enseñarme a perseguir mis metas y que no importa si es difícil el camino lo importante es avanzar. Los quiero mucho agradezco todo lo que hacen por mi.

A mis hermanos:

Cutberto, Orbelin y Kiña son los mejores hermanos que tengo espero que siempre este presente el cariño que nos tenemos y sobre todo nunca de dejemos de querer. Cutberto nuestro hermano mayor gracias por apoyar a mis papás cuando inicie a estudiar la universidad se que también te tocó sacrificar cosas por nosotros. Espero que se sientan orgullosa de mi.

A mi familia completa dedicó cada logro en mi vida, ustedes siempre han estado allí y me han ayudado en todo momento de mi vida. Gracias por impulsarme a superarme cada día.

A mis amigos:

Ustedes que siempre desean lo mejor para mi.

Laboratorio:

Dra. Rossana Arroyo Verástegui, gracias por haberme aceptado en su grupo de trabajo. Por su paciencia y enseñanza para mejorar cada día este trabajo.

A la auxiliar del laboratorio Q.F.B Leticia Ávila González por su asistencia técnica y apoyo en el laboratorio.

Al técnico de laboratorio C. Victor Hernández Pinales.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema del ciclo de vida de <i>T. vaginalis</i> .	5
Figura 2.	Propiedades de virulencia de <i>T. vaginalis</i> .	7
Figura 3.	Alineamiento de secuencias río arriba del sitio de inicio de la transcripción +1 de genes de tricomonas.	9
Figura 4.	Señales de procesamiento del extremo 3' del preRNAm de <i>T. vaginalis</i> .	11
Figura 5.	Las aspárticos proteasas son clasificadas en cinco clanes.	14
Figura 6.	Estructura tridimensional y mecanismo de acción de una AP típica.	17
Figura 7.	Etapas de maduración de la Catepsina D.	19
Figura 8.	Alineamiento múltiple de las secuencias de APs de <i>T. vaginalis</i> .	58
Figura 9.	Relación filogenética con la CatD de otros organismos de Tv-CatD.	59
Figura 10.	Elementos reguladores de la región 5' y 3' de la secuencia genómica gen <i>tv-catd</i> de <i>T. vaginalis</i> .	61
Figura 11.	Análisis <i>in silico</i> de la secuencia de aa de la proteína Tv-CatD.	63
Figura 12.	La expresión del gen <i>tv-catd</i> es regulada positivamente por glucosa.	65
Figura 13.	Liberación del fragmento clonado de la región codificante del gen <i>tv-catd</i> en el vector de transición.	67
Figura 14.	Alineamiento de la secuencia clonada del gen <i>tv-catd</i> con la secuencia del genoma de <i>T. vaginalis</i> .	68-69
Figura 15.	Liberación del fragmento clonado de la región codificante del gen <i>tv-catd</i> en el vector de expresión pColdI.	70
Figura 16.	Expresión de la proteína Tv-CatD en el sistema procarionte.	72

Figura 17.	Purificación de la proteína Tv-CatD recombinante y obtención del anticuerpo α -Tv-CatDr.	73
Figura 18.	Efecto de la glucosa en la cantidad de proteasa Tv-CatD en un extracto de proteína total de <i>T. vaginalis</i> .	75-76
Figura 19.	Efecto de la glucosa en la proteasa Tv-CatD en un extracto resistente a proteasas de <i>T. vaginalis</i> .	77-78
Figura 20.	Identificación de la Tv-CatD en el degradoma activo de <i>T. vaginalis</i> en diferentes condiciones de glucosa.	80
Figura 21.	Péptidos identificados por MS en la secuencia Tv-CatD.	82
Figura 22.	Actividad proteolítica de Tv-CatD a diferentes pHs en extractos resistente a proteasas de <i>T. vaginalis</i> en las diferentes condiciones de glucosa.	83
Figura 23.	Efecto del inhibidor Pepstatina A en la actividad proteolítica de Tv-CatD en extractos resistente proteasas en alta glucosa en <i>T. vaginalis</i> .	85
Figura 24.	Efecto del inhibidor Pepstatina A en la actividad proteolítica en presencia de gelatina de extractos resistente a proteasas en alta glucosa en <i>T. vaginalis</i> .	86
Figura 25.	Efecto del pH en la actividad proteolítica de extractos resistente a proteasas en las diferentes condiciones de glucosa en <i>T. vaginalis</i> en presencia de inhibidores.	87
Figura 26.	Actividad proteolítica de extractos resistente a	88

proteasas en las diferentes condiciones de glucosa en *T. vaginalis* en presencia de inhibidores.

- Figura 27.** Efecto de Pepstatina A y TLCK en la actividad proteolítica de *T. vaginalis* utilizando hemoglobina como sustrato y extractos resistente a proteasas de parásitos crecidos en las diferentes condiciones de glucosa. **89**
- Figura 28.** Efecto del inhibidor pepstatina A en la actividad proteolítica en hemoglobina como sustrato de extractos resistente a proteasas de parásitos crecidos en las diferentes condiciones de glucosa. **90**
- Figura 29.** Efecto del pH en la actividad proteolítica de extractos resistente a proteasas de parásitos crecidos en las diferentes condiciones de glucosa en presencia de pepstatina A usando hemoglobina como sustrato. **91**
- Figura 30.** Efecto del inhibidor DAN en la actividad proteolítica de Tv-CatD en extractos resistente a proteasas en alta glucosa en *T. vaginalis*. **92**
- Figura 31.** Efecto de inhibición del ion metal Cu^{2+} en la actividad proteolítica de Tv-CatD de extractos resistente a proteasas en glucosa en *T. vaginalis*. **93**
- Figura 32.** Actividad proteolítica usando Hemoglobina como sustrato en 2-DE en las condiciones glucosa en *T. vaginalis*. **95**
- Figura 33.** Actividad proteolítica usando hemoglobina como sustrato en 2-DE en *T. vaginalis* en la condición **96**

	de AG en presencia de pepstatina A.	
Figura 34.	Localización de la proteasa Tv-CatD de <i>T. vaginalis</i> crecidos en las tres condiciones de glucosa.	100
Figura 35.	Colocalización de Tv-CatD en lisosomas de <i>T. vaginalis</i> .	102
Figura 36.	Localización subcelular citoplásmica de Tv-CatD en <i>T. vaginalis</i> .	104
Figura 37.	Secreción de Tv-CatD <i>in vitro</i> en parásitos crecidos en las tres condiciones de glucosa.	106
Figura 38.	Identificación de la proteína de 80 kDa en productos de secreción de <i>T. vaginalis</i> en la condición de ≤ 1 mM de glucosa.	108

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1.	Incidencia de Tricomonosis en México.	2
Gráfica 2.	Condiciones experimentales de ESTs para Tv-CatD.	56-57

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Clasificación del clan AA de las APs.	15
Cuadro 2.	Clasificación de Catepsinas.	18
Cuadro 3.	Proteínas blanco de catepsina D en funciones biológicas.	20
Cuadro 4.	Proteasas en <i>T. vaginalis</i> y otros organismos.	24

Cuadro 5.	Aspártico proteasas en <i>T. vaginalis</i> .	24
Cuadro 6.	Análisis del transcriptoma y ESTs de APs.	56
Cuadro 7.	Comparación de las secuencias de aa de las APs de <i>T. vaginalis</i> .	57
Cuadro 8.	Péptidos identificados por MALDI-TOF-MS de la mancha de ~35 kDa de la proteína de <i>Trichomonas vaginalis</i> detectada por el anticuerpo anti-Tv-CatDr.	81
Cuadro 9.	Péptidos identificados por análisis de MALDI-TOF-MS de la mancha de 80 kDa de <i>Trichomonas vaginalis</i> detectada por el anticuerpo anti-Tv-CatDr.	109

ABSTRACT

Cathepsins D belong to the Aspartic Proteases (APs) family that possesses two Aspartic Acid (Asp) catalytic residues. The APs participate in the degradation of endogenous proteins and some cellular components. *Trichomonas vaginalis* genome encodes ~440 proteases, six of which are APs. However, only one belongs to a clan AA (EC 3.4.23.5), family A1 (pepsin A), cathepsin D-like protease. The EST analysis of the six genes that encode for APs shows that cathepsin D (*tv-catd*) is expressed under different culture conditions. The expression of *tv-catd* was found in the transcriptome of parasites grown under glucose restriction conditions, suggesting that its expression probably is differentially regulated by glucose. The Tv-CatD is encoded by an 1113-bp gene (*tv-catd*), which translates into a 370 aa residues zymogen of 40.7-kDa and a theoretical *pI* of 4.6, generating a ~35 kDa active enzyme after maturation (Tv-CatD). The goal of this study was to identify and analyze the effect of glucose on the expression of Tv-CatD at the transcript and protein levels, subcellular localization, and proteolytic activity. The RT-PCR assays showed an increase in *tv-catd* mRNA under high glucose (HG; 50 mM) conditions compared to glucose restriction (GR; ≤ 1 mM) conditions. We amplified, cloned, and expressed the *tv-catd* gene, and purified the recombinant precursor enzyme (Tv-CatDr) to generate polyclonal antibodies (anti-Tv-CatDr). Western blot (WB) and immunolocalization assays showed that glucose increases the amount of Tv-CatD in different subcellular localizations and in *in vitro* secretions. Additionally, Tv-CatD proteolytic activity was detected in protease-resistant extracts (PREs) using a synthetic fluorogenic peptide specific for cathepsin D/E APs at different pHs and in the presence of AP inhibitors and zymograms assays. In a two-dimensional (2-DE) WB analysis of a PRE from parasites grown under GR and HG conditions, the anti-Tv-CatDr antibody detected a 35-kDa protein spot at *pI* 5.0 identified as the mature Tv-CatD form by mass spectrometry that showed proteolytic activity in 2-DE zymograms copolymerized with hemoglobin under both glucose conditions. Thus, Tv-CatD could be involved in trichomonal hemolysis. However, until now is unknown the participation of Tv-CatD in the virulence of *T. vaginalis*.

RESUMEN

Las catepsinas D pertenecen a la familia de las Aspártico Proteasas (APs) que presentan en su sitio catalítico dos residuos de Ácido Aspártico (Asp). Las APs participan en la degradación de proteínas endógenas y algunos componentes celulares. En el genoma de *Trichomonas vaginalis* se reportaron ~440 genes que codifican para diferentes tipos de proteasas, seis de ellas son del tipo APs y solo una pertenece al clan AA (EC 3.4.23.5), familia A1 (pepsina A), una proteinasa de tipo catepsina D. El análisis de ESTs de los seis genes que codifican para APs muestra que Catepsina D (*tv-catd*) se expresa mayoritariamente en diferentes condiciones. En el transcriptoma de parásitos crecidos en restricción de glucosa se encontró la expresión de *tv-catd*, lo que sugiere que probablemente su expresión se regula diferencialmente por glucosa. La Catepsina D (Tv-CatD) es codificada por un gen de 1113 pb que genera una proteína precursora de 40.7 kDa con un *pI* teórico de 4.6, generando una enzima activa de ~35 kDa. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la glucosa en la expresión a nivel de transcrito, proteína, localización subcelular y actividad proteolítica. En ensayos de RT-PCR se observó mayor cantidad de transcrito en alta glucosa (50 mM) comparada con restricción de glucosa (≤ 1 mM). Para poder seguir a la proteína en el parásito, se amplificó, clonó y expresó el gen *tv-catd* en *E. coli*. La proteína recombinante Tv-CatD purificada se usó para generar anticuerpos policlonales. Ensayos de WB e inmunolocalización mostraron un incremento en la cantidad de proteína Tv-CatD, con una localización en diferentes compartimentos subcelulares, incluyendo en los productos de secreción *in vitro*. Además, la actividad proteolítica de Tv-CatD se detectó en extractos resistentes a proteasas (PREs) usando un sustrato fluorogénico específico para CatD/E a diferentes pHs, la cual se inhibió en presencia de inhibidores como el cobre. En ensayos de 2-DE por zimografía y WB de PREs de parásitos crecidos en alta y restricción de glucosa, el anticuerpo anti-Tv-CatD reconoció una mancha de 35 kDa con un *pI* de 5.0 identificada por espectrometría de masas como Tv-CatD madura, la cual muestra actividad proteolítica en zimogramas 2-DE copolimerizados con hemoglobina en ambas condiciones de glucosa. Estos resultados podrían sugerir la participación de Tv-CatD en la hemólisis. Sin embargo, hasta el momento se desconoce la participación de Tv-CatD en la virulencia de *T. vaginalis*.

ÍNDICE GENERAL

ABSTRACT

RESUMEN

I. INTRODUCCIÓN

1-27

1. Epidemiología.
2. Manifestaciones clínicas.
3. Estructura de *Trichomonas vaginalis*.
4. Ciclo de vida.
5. Patogénesis.
6. Regulación transcripcional en *Trichomonas vaginalis*.
7. Factores ambientales modulan de forma diferencial las propiedades de virulencia en *Trichomonas vaginalis*.
8. Aspectos generales de proteasas.
9. Las Aspártico Proteasas (APs).
 - 9.1 Características de las Aspártico proteasas
 - 9.2 Inhibición de las Aspártico proteasas
10. Mecanismo catalítico de las Aspártico proteasas.
- 11 Las catepsinas.
 - 11.1 Catepsina D (CatD).
 - 11.2 Procesamiento proteolítico y maduración de la CatD en el compartimento lisosomal.
 - 11.3 Funciones de CatD.
12. Proteasas en protozoarios parásitos.
13. Aspártico proteasas (AP) identificadas en parásitos.
14. Aspártico proteasas en *T. vaginalis* (*Tv*-APs).
15. Efecto de la glucosa en parásitos.
16. Efecto de la glucosa en *T. vaginalis*.

II._JUSTIFICACIÓN	28
III._HIPÓTESIS	29
IV._OBJETIVOS GENERAL Y PARTICULARES	30
V._ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL	31-32
VI._MATERIALES Y MÉTODOS	33-55
Análisis <i>in silico</i> del gen y proteína Tv-CatD.	
Cultivo de <i>Trichomonas vaginalis</i> .	
Extracción de DNA genómico.	
Diseño de oligonucleótidos.	
Extracción de RNA total genómico.	
Tratamiento de RNA con DNasa I.	
Síntesis de cDNA.	
RT-PCR semicuantitativa y cuantitativa	
Amplificación de la secuencia completa del gen <i>tv-catd</i> .	
Purificación del fragmento del gen <i>tv-catd</i> con sitios de restricción para <i>NdeI</i> y <i>XhoI</i> .	
Clonación del gen <i>tv-catd</i> en el vector PGEM-T Easy	
Minipreps: Extracción de DNAp por lisis alcalina:	
Digestión del DNAp de las clonas candidatas	
Secuenciación de DNA	
Reacción de restricción secuencial masiva con <i>NdeI</i> y <i>XhoI</i> .	
Purificación del DNA del gen <i>tv-catd</i> y del vector pColdI	
Subclonación del gen <i>tv-catd</i> en el vector de Expresión pColdI:	
Digestión del DNAp de las clonas candidatas	
Extracción de DNAp por kit	
Inducción de la proteína recombinante Tv-CatD con IPTG	
Purificación de la proteína recombinante por cromatografía:	
Afinidad a níquel	
Intercambio iónico	
Diálisis de la proteína recombinante Tv-CatD.	

Producción de anticuerpos policlonales anti-Tv-CatD en ratón y conejo.
Extracción de Proteína Total de *T. vaginalis* por precipitación con ácido tricloroacético (TCA al 10%).

Obtención de extractos resistente a proteasas de *T. vaginalis* con desoxicolato de sodio (DOC).

Ensayos de Western Blot.

Electroforesis bidimensional (2 -DE).

Ensayos de actividad usando un sustrato específico fluorogénico.

Zimogramas 1 y 2-DE copolimerizados.

Ensayo de secreción *in vitro*.

VII._RESULTADOS.

55-109

Análisis *in silico* de los genes APs en *T. vaginalis*.

Expresión del gen *tv-catd* en las tres condiciones de glucosa.

Amplificación del gen completo *tv-catd* y clonación en el vector de transición pGEMT Easy.

Subclonación de la región codificante del gen completo gen *tv-catd* en el vector de expresión.

Inducción de la proteína recombinante Tv-CatDr en el sistema de expresión procarionte.

La glucosa aumenta la cantidad de Tv-CatD en extracto de proteínas de *T. vaginalis*.

Identificación de Tv-CatD en el degradoma de *T. vaginalis*.

Tv-CatD se encuentra activa en el extracto resistente a proteasas de *T. vaginalis*.

Efecto de los inhibidores para las proteasas de tipo Aspártico en la actividad proteolítica de Tv-CatD.

El degradoma activo de *T. vaginalis* muestra que Tv-CatD tiene

actividad de hemoglobinas.

Localización subcelular de Tv-CatD en parásitos de *T. vaginalis* crecidos en las tres condiciones de glucosa.

Secreción *in vitro* de Tv-CatD de *T. vaginalis* en las tres condiciones de glucosa.

Identificación de la proteína de 80 kDa de los productos de secreción en la condición de baja glucosa en *T. vaginalis*.

VIII._DISCUSIÓN	110-122
IX._CONCLUSIONES	122
X._PERSPECTIVAS DEL TRABAJO	123
XI._REFERENCIAS	124-139

I. INTRODUCCIÓN

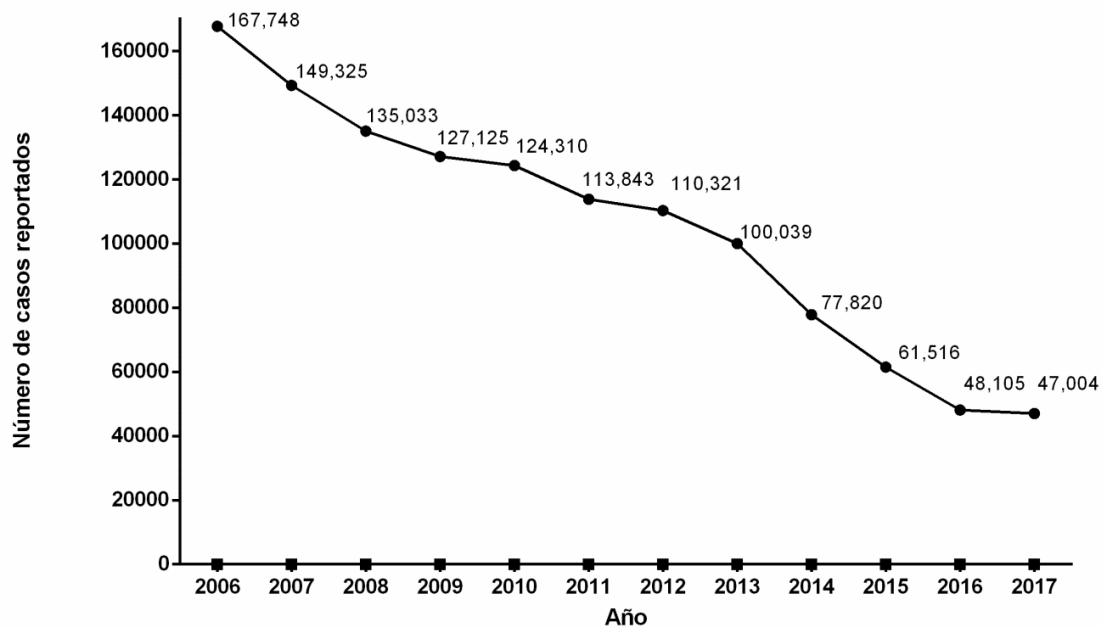
1. Epidemiología.

La tricomonosis humana es la infección de transmisión sexual (ITS) no viral más común en el mundo (Schwebke y Burgess, 2004), causada por el protista parásito *Trichomonas vaginalis*. A nivel mundial, más de 276 millones de personas se encuentran afectadas por tricomonosis anualmente (World Health Organization, 2008). La población estudiada tiene un intervalo de prevalencia en mujeres del 5-74% y en hombres 5-29% (Schwebke y Burgess, 2004). La tricomonosis se encuentra distribuida en parejas sexualmente activas entre 15 y 49 años. El 80 % de la población afectada es asintomática por lo que se vuelve una infección crónica con consecuencias graves para la salud al asociarse a partos prematuros, nacimientos de infantes con bajo peso, deficiencia mental y al incremento de mortalidad en infantes (Lehker y Alderete, 2000). Además, de ser un factor de riesgo para cáncer cervical y prostático,. *T. vaginalis* también se asocia con neumonía, bronquitis o lesiones orales en pacientes inmunocomprometidos (Lehker y Alderete, 2000; Poole y McClelland, 2013; Meites y col., 2015). Esta infección también predispone a la transmisión del virus de la inmunodeficiencia adquirida humana (VIH). Una reducción de la infección por *T. vaginalis* podría traducirse en una disminución substancial en la transmisión del VIH hasta en un 20% (Shafir y col., 2009).

Al nivel nacional, la tricomonosis ocupa las primeras causas de morbilidad en los últimos diez años, con una tasa general en la población de 117.038 por 100 000 habitantes (Boletín del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2016). Aunque se esperaban tasas más elevadas en el grupo femenino, llama la atención los resultados observados, ya que el grupo de mujeres registra una tasa de 113.34, mientras que en el masculino es de 4.02, con una proporción de 60 mujeres por cada hombre (Boletín del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2016). Esto se puede deber a la dificultad del diagnóstico, especialmente en el hombre, ya que la mayoría son asintomáticos. Aunado a que hasta la fecha no se tiene el sitio óptimo para la obtención de la muestra, además

de que la recolección del exudado uretral y prostático es incómoda para los hombres (Hobbs y col., 1999). Por ello hay problemas para el diagnóstico de tricomonosis en el Sector Salud en nuestro país y en el mundo.

En el 2017, en nuestro país se reportaron 47,004 casos de tricomonosis (Gráfica 1), donde el número de casos parece haber disminuido progresivamente desde el 2006; sin embargo, estos datos están subestimados debido a los problemas en el diagnóstico y a que no todos los pacientes presentan síntomas. Además, el diagnóstico de la infección no se encuentra en el grupo de infecciones de transmisión sexual de vigilancia epidemiológica en el sector salud a nivel nacional. Esta infección afecta principalmente los estados de Veracruz, Edo. de México, Puebla y Chiapas (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2017).



Gráfica 1. Incidencia de Tricomonosis en México. El número de casos de tricomonosis por año del 2006 al 2016 (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2017).

2. Manifestaciones clínicas de tricomonosis.

El hombre es el único hospedero natural de *T. vaginalis*, el protozooario responsable de una infección sitio-específica del tracto genitourinario. La infección está relacionada con el género, afectando principalmente a las mujeres, ya que éstas mantienen la infección, mientras que en la mayoría de los hombres se elimina el parásito. Esto sugiere que la situación diferencial podría estar relacionada a diferentes microambientes que afectan la patobiología de *T. vaginalis*; el medio ambiente en la vagina es rico en hierro, en cambio en las glándulas prostáticas es rico en zinc. El zinc es una defensa química antimicrobiana en humanos (Krieger y Rein 1982), mientras que el hierro es un nutriente esencial para tricomonas (Lehker y col., 1991). Además, la vagina tiene un medio ambiente reductor, el cual podría contribuir a la activación de algunos mecanismos de patogenicidad (Schwebke y Burgess, 2004).

El diagnóstico clínico de *T. vaginalis* en mujeres se basa en los síntomas clásicos asociados a vaginitis de diversos orígenes, que incluyen descargas espumosas de color verde-amarillento y de mal olor, prurito, disuria, dispareunia (dolor al coito), irritación en el tracto urinario, dolor abdominal bajo, elevación del pH, presencia de poliaminas, leucocitosis y eritema vulvar (Petrin y col., 1998). El cérvix de fresa es un signo típico de la tricomonosis, el cual se caracteriza por lesiones hemorrágicas punteadas, pero sólo se presenta en el 2% de las personas infectadas (Swygard y col., 2004). Aunado a la inespecificidad de la sintomatología, más del 80% de las mujeres afectadas presentan sintomatología (Swygard y col., 2004; Poole y McClelland, 2013). En cambio, la mayoría de los hombres infectados por *T. vaginalis* son asintomáticos, aunque algunos pueden presentar síntomas como descarga uretral, uretritis, epididimitis, función del esperma reducido e infertilidad (Harp y Chowdhury, 2011). Es claro que el diagnóstico no se puede hacer sólo basado en las manifestaciones clínicas, se requieren técnicas de diagnóstico eficientes, sensibles y específicas que permitan la identificación de este microorganismo. El estándar de oro del diagnóstico de *T. vaginalis* es el cultivo *in vitro* de las secreciones vaginales o uretrales. Sin embargo, en los sistemas de Salud el diagnóstico no se realiza por cultivo sino por observación en fresco al microscopio del exudado vaginal o uretral por ser más económico y específico,

siempre y cuando se realice inmediatamente, pues depende de la movilidad del parásito.

Recientemente se han empleado métodos más eficientes para la detección de *T. vaginalis* con alta sensibilidad como son ensayos moleculares como PCR (reacción en cadena de la polimerasa), serológico ELISA (“enzyme-linked immunosorbent assay”), inmunocromatografía capilar como OSOM (Trichomonas Rapid Test (Sekisui Diagnostics, Framingham, MA)), XenoStrip-T (Xenotype Diagnostic) (Poole y McClelland, 2013; Menezes y col., 2016).

3. Estructura de *Trichomonas vaginalis*.

T. vaginalis es un protista ancestral flagelado, extracelular, varía en tamaño de 10 a 7 micras y forma típicamente piriforme aunque ocasionalmente adopta una forma ameboide al contacto con las células del epitelio vaginal o al contacto con superficies inertes (Arroyo y col., 1993). El citoesqueleto está constituido de tubulina y fibras de actina (Petri y col., 1998). *T. vaginalis* no contiene mitocondrias, característica de organismos anaerobios, pertenece a un miembro de los eucariontes microaerófilos de la clase parabasalia que presentan organelos de doble membrana, sin DNA y productores de energía llamados hidrogenosomas (Benchimol, 2004). *T. vaginalis* presenta un núcleo ovoide rodeado por una envoltura nuclear formada por una doble membrana, localizado en la parte anterior y en cuyo interior presenta una masa densa la cual se atribuye al nucleolo. El genoma está organizado en seis cromosomas haploides que al secuenciarlos se han identificado múltiples secuencias repetidas, estimando que el tamaño del genoma es de ~160 Mb, con un grupo de genes que codifica para ~60,000 proteínas (Carlton y col., 2007). Para la locomoción presenta cuatro flagelos anteriores y un flagelo recurrente adosado a la membrana ondulante los cuales tienen 9 pares periféricos y un par central de microtúbulos. El axostilo tiene forma de espícula y está constituido por una estructura filamentosa delgada longitudinal de tubulina que atraviesa y protuye la parte posterior del parásito (Ovcinnikov y col., 1974).

4. Ciclo de vida.

El ciclo de vida de *T. vaginalis* es simple, sólo presenta el estadio de trofozoíto el cual se transmite de persona a persona a través del contacto sexual. Hasta ahora no se conoce que forme quiste, aunque se ha observado la formación de pseudoquistes en condiciones adversas para el parásito, como agotamiento de nutrientes, baja temperatura donde los flagelos se internalizan y se redondea el parásito. Este parásito se reproduce por fisión binaria longitudinal, en el que primero se duplican todos los organelos locomotores seguido por los procesos de segregación cromosomal, después la célula se divide longitudinalmente y origina dos organismos (Figura 1). Su hábitat es la superficie y lumen mucosal del tracto urogenital del humano (Petrin y col., 1998; Benchimol, 2004; Schwebke y Burgess, 2004).

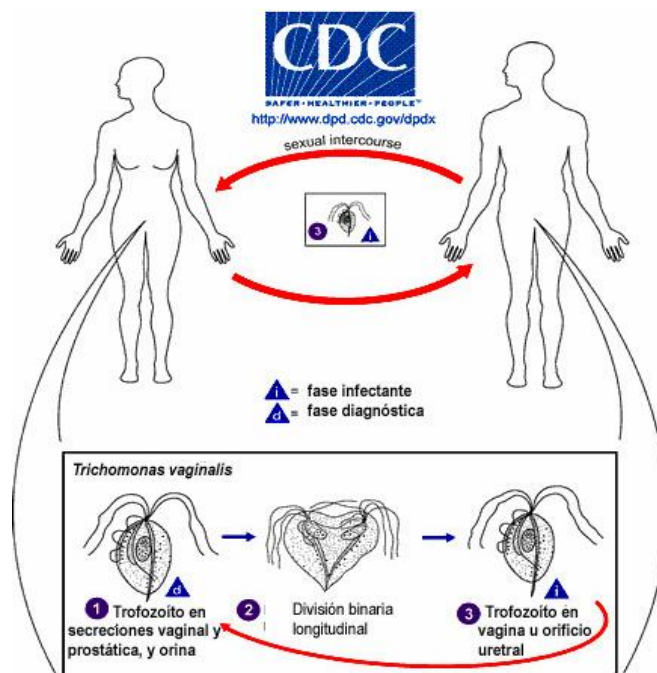


Figura 1. Esquema del ciclo de vida de *T. vaginalis*. (1) Este parásito reside en el tracto urogenital de la mujer y en la uretra y próstata del hombre, (2) donde se réplica por fisión binaria. (3) *T. vaginalis* se transmite entre humanos, su único huésped conocido, a través del contacto sexual con personas infectadas. Esquema tomado de la Base de datos: Introducción. “The *Trichomonas vaginalis* Genome Database” <http://www.cdc.gov/std/default.htm>.

5. Patogénesis.

Los mecanismos que utiliza este protozooario para causar la infección se encuentran en estudio. Este parásito coloniza la mucosa vaginal y mantiene la infección a través de sus mecanismos de virulencia. La tricomonosis está asociada con el daño a la superficie del epitelio vaginal, provocando inflamación. La citopatogenicidad es un proceso multifactorial en el cual la citoadherencia, es la primera etapa seguida por el efecto citotóxico que culmina con la fagocitosis celular (Alderete y col., 1985). El efecto responsable del daño celular depende de efectores liberados por *T. vaginalis* al contacto con la célula epitelial (Fiori y col., 1999).

La evasión de la respuesta inmune contribuye a que el parásito ocasione una infección crónica en el huésped. Este mecanismo de evasión lo realiza mediante diferentes estrategias: a través de la variación fenotípica de epítopes del inmunogéno P230 o la variación antigénica de P270 en la superficie del parásito (Alderete y col., 1991; Alderete, 1999), el mimetismo molecular e inclusive la degradación de Inmunoglobulinas (Igs) (Alderete y Provenzano, 1995). Las cisteína proteinasas (CPs) son capaces de degradar inmunoglobulinas (Igs) como la IgA, IgG, IgE e IgM generados por el huésped como parte de la respuesta inmune humoral, evitando la protección a la infección (Alderete y Provenzano, 1995). Otra forma de evadir esta respuesta es la activación del sistema del complemento a través de la vía alterna, donde los antígenos de la superficie del parásito cambian, lo que permite evadir la lisis del complemento (Gillin y Sher, 1981).

Además, *T. vaginalis* induce apoptosis en neutrófilos y células epiteliales, se asocia con un incremento en la actividad de la caspasa-3 y una disminución en los niveles de la proteína Mcl-1, provocando inflamación (Kang y col., 2006) y también están involucradas algunas CPs (Sommer y col., 2005). Las propiedades de virulencia en *T. vaginalis* (Figura 2) son procesos multifactoriales en la mayoría de los casos (Alderete y col., 1988) y las CPs participan en casi todas como en la degradación de la capa de moco (Lehker y Sweeney, 1999), en la citoadherencia

(Arroyo y Alderete, 1989, 1995; Mendoza-López y col., 2000; Hernández y col., 2004; Rendón-Gandarilla y col., 2013), en la citotoxicidad (Arroyo y Alderete, 1995; Álvarez-Sánchez y col., 2000; Hernández-Gutiérrez y col., 2003; 2004; Ramón-Luing y col., 2011), adquisición de nutrientes (Lehker y col., 1990), evasión de la respuesta inmune (Petrin y col., 1998), y en la hemólisis (Dailey y col., 1990; Cárdenas-Guerra y col., 2013).

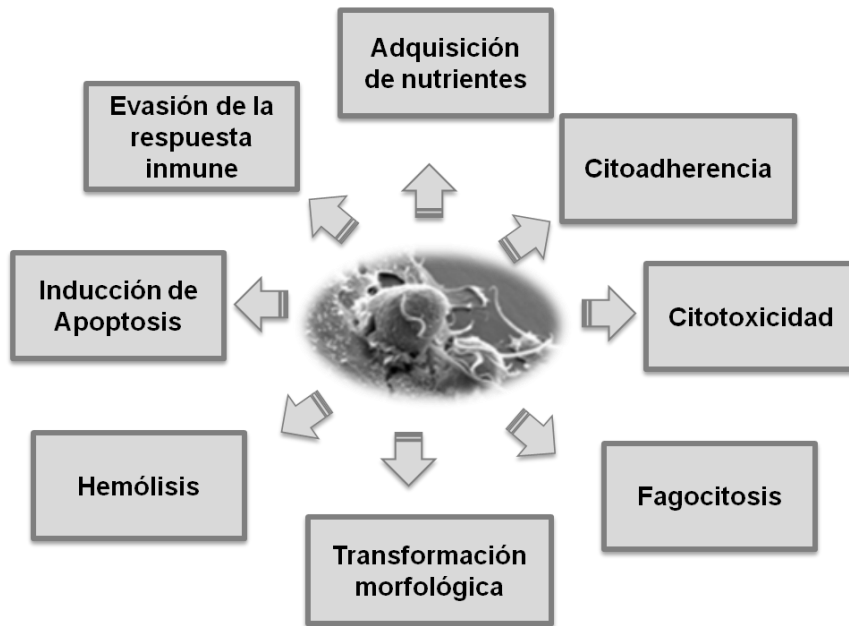


Figura2. Propiedades de virulencia de *T. vaginalis*. Estas propiedades permiten al parásito permanecer en el hospedero por largo tiempo, causando una infección crónica no mortal, pero de graves consecuencias.

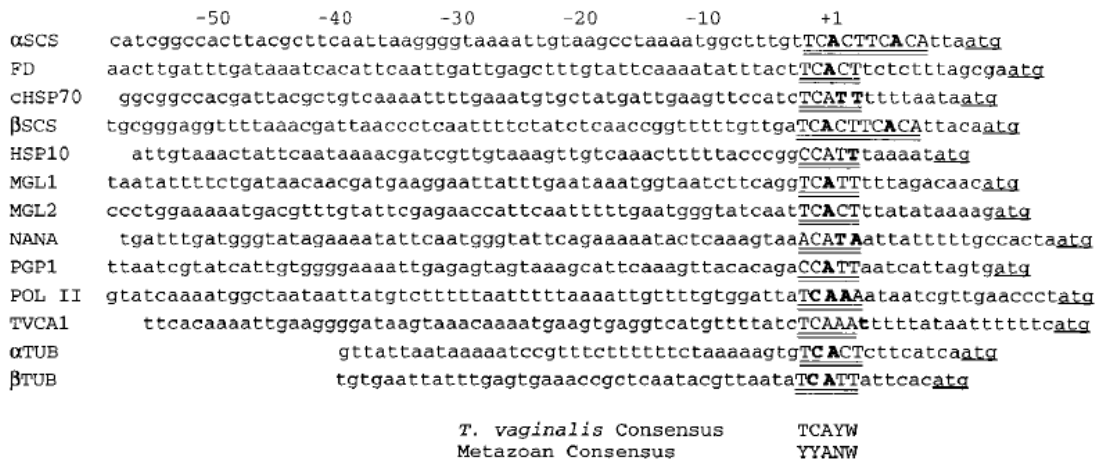
6. Regulación transcripcional en *Trichomonas vaginalis*.

La regulación transcripcional es uno de los principales mecanismos que permiten a las células modificar su comportamiento tanto interno como externo. Un gen es una secuencia de DNA que se transcribe. La transcripción es la síntesis de una molécula de RNA utilizando como templado una cadena de DNA complementaria con ayuda de algunas enzimas. La transcripción en procariontes o eucariontes, tiene tres eventos secuenciales: iniciación, elongación y terminación. La

transcripción es el primer punto de control en la expresión de un gen, la cual en eucariontes es más compleja comparada con las bacterias (Tujeta y col., 2011).

Los estudios realizados en la expresión de genes en *T. vaginalis* demuestran que estos se encuentran organizados en unidades de transcripción monocistronicas carentes de caja TATA. La RNA pol II transcribe los genes que codifican para proteínas. Los RNAm de *T. vaginalis* contienen un “capping 5” final algo característico de los transcritos de la RNA pol II. Los elementos conservados que rodean el TSS de todos los genes que codifican proteínas es homólogo al de metazoarios, el cual es reconocido por factores de transcripción asociados a la RNA pol II (Liston y Johnson, 1998).

El elemento iniciador (Inr) de 13 nucleótidos en *T. vaginalis* contiene el TSS en los genes estudiados hasta ahora, es una secuencia altamente conservada y rica en pirimidinas, siendo muy similar al elemento Inr en eucariontes (Liston y Johnson, 1998). El elemento Inr en eucariontes superiores fue primero identificado en promotores carentes de caja TATA. Funcionalmente el elemento Inr es un elemento del núcleo promotor basal análogo a la caja TATA. Ambos elementos trabajan como incorporadores de los componentes del complejo de transcripción basal y seleccionan el TSS (Zawel y Reinberg, 1995). Al realizar un análisis comparativo (Figura) entre las secuencias Inr de los genes de *T. vaginalis* con las secuencia consenso de metazoarios se observa una similitud; sin embargo, no se encontraron cajas tipo TATA o elementos presentes en el núcleo promotor de eucariontes superiores (Liston y Johnson, 1999). Lo que nos sugiere que este parásito puede utilizar elementos regulatorios distintos a los establecidos en otros eucariontes. Con esto se abre la posibilidad de encontrar secuencias nuevas participando en la regulación transcripcional.



T. vaginalis Consensus TCAYW
 Metazoan Consensus YYANW

Figura . Alineamiento de secuencias río arriba del sitio de inicio de la transcripción +1 de genes de tricomonas. Los elementos conservados se encuentran en letra mayúscula sobre una doble línea de los genes, deduciendo a partir de estas secuencias el Inr consenso de *T. vaginalis* el cual fue comparado con la secuencia consenso Inr de metazoarios (Liston y Johnson, 1999).

Con base a lo anterior se cree que el núcleo promotor en *T. vaginalis* es el elemento Inr, A nivel funcional se demostró que el elemento Inr es esencial para la transcripción así también se identificó la secuencia consenso del Inr en *T. vaginalis* T/C C A (+1) Py T/A, de esta manera se confirma la idea de que *T. vaginalis* utiliza como núcleo promotor al elemento Inr (Liston y Johnson, 1999). El análisis de los genes del genoma predice que el 75% de genes que codifican para proteínas poseen este elemento Inr funcional (Carlton y col., 2007). El elemento Inr es reconocido por una proteína de Unión al Iniciador de 39 kDa (IBP39) que reconoce específicamente el elemento Inr de *T. vaginalis*. Está compuesta por dos dominios separados por un enlace sensible a la actividad proteolítica, el dominio N-terminal reconoce específicamente el elemento Inr y el dominio C-terminal interactúa con la RNA pol II. Esta última es la responsable de direccionar la RNA pol II al TSS para iniciar la transcripción (Schumacher y col., 2003). El otro 25 % de los genes que codifican proteínas pueden usar uno o más elementos o motivos para su expresión. Los nuevos elementos identificados en el núcleo promotor en

las regiones 5' no traducidas de los genes de *T. vaginalis* que codifican proteínas presentan algunos motivos conservados que se localizan dentro de los 60 nt río arriba del TSS; estas secuencias son: Motivo 1: TCAT/CTTT/CT/C, Motivo 3: A/G/TA/GCG/CGT/CTT/A/G y Motivo 5: GG/A/TCCTTT/CT/C. El Motivo 1 contiene la secuencia del elemento Inr. El Motivo 3 se asemeja al Elemento de Reconocimiento a Myb (MRE) en metazoarios, reconocida por una proteína única que contiene un dominio de unión al DNA similar a Myb. En la secuencia del Motivo 5 no se ha encontrado ninguna secuencia conocida en los núcleos promotores en eucariontes, aunque en la cuarta posición de la secuencia si se cambia una citosina por adenosina podría parecerse a un elemento Inr el cual podría ser utilizado como Inr alternativo. M3BP es una proteína nuclear que se une específicamente al Motivo 3. Esta proteína es muy similar a IBP39 que reconoce al elemento Inr y es un nuevo factor de transcripción en eucariontes que podría formar parte del PIC-RNAPII en *T. vaginalis* (Smith y Johnson, 2011).

Una vez sintetizado el preRNA mensajero es procesado en la región 3' para dejar un RNA mensajero (RNAm) funcional. La presencia de la cola de poli A en la molécula del RNAm en el extremo 3' indica el inicio de la traducción, estabilidad del RNAm y el transporte del núcleo al citoplasma. Se han descrito tres secuencias motivos presentes en el procesamiento del extremo 3' del preRNAm de *T. vaginalis*: 1.- La señal de poliadenilación caracterizada por la secuencia del hexanucleótido AAUAAA o AAUUA localizada 10-30 nt río arriba del sitio de corte, en algunos casos puede incluir el codón de paro. 2.- El elemento río abajo (DSE; "element downstream") es una secuencia rica en "U" o "GU" comúnmente localizada 30 nt río abajo del sitio de corte. 3.- La secuencia de corte $Py(A)_{0-3}AAUU$ (Figura) (Espinosa y col., 2002).



preRNAm de *T.*
o (DSE; “element
ncias se muestran
corte (Espinosa y

7. Factores ambientales modulan las propiedades de virulencia en *T. vaginalis*.

T. vaginalis responde a los cambios del medio ambiente como: temperatura, pH, hierro, zinc, poliaminas, microflora vaginal y respuesta inmune del hospedero, entre otros (Figuroa-Angulo y col., 2012). Recientemente se ha descrito a la glucosa como otro de los factores que modulan la expresión de múltiples genes incluyendo aquellos que codifican factores de virulencia, ayudando a mantener una infección crónica (Huang y col., 2014).

La glucosa un componente presente en secreciones vaginales (Owen y Katz, 1999). Esta es la fuente principal de carbohidratos para la obtención de energía. En este proceso participa la Triosa Fosfato Isomerasa (TPI ó TIM) que se regula positivamente por glucosa y adquiere una nueva función como receptor de laminina y fibronectina componentes de matriz extracelular del hospedero cuando se relocaliza en la superficie del parásito (Miranda-Ozuna y col., 2016). *In vivo* las concentraciones de glucosa varían de ≤ 1 hasta 50 mM en el tracto genitourinario en mujeres con tricomonosis (Miranda-Ozuna y col., 2016), sugiriendo que *T. vaginalis* se encuentra expuesto a diferentes concentraciones de glucosa durante la infección, dependiente de las características de cada hospedero.

En el laboratorio se trabaja en determinar la modulación de la expresión de factores de virulencia por glucosa y su influencia en las propiedades de virulencia del parásito.

8. Aspectos generales de proteasas.

Las proteasas son una familia de enzimas que catalizan el corte de enlaces peptídicos dentro o en los extremos de las proteínas o polipéptidos, liberándose aminoácidos (aa) ó péptidos, una reacción vital para procesos fisiológicos y patológicos. Las proteasas constituyen la familia más grande de enzimas; se clasifican principalmente en base a la reacción catalítica (Barrett, 1997). Tomando de base esta característica se nombran como: Aspártico (A), Cisteína (C), Glutámico (G), Metalo (M), Asparagina (N), "Mixed" (P), Serina (S), Treonina (T), Mecanismo desconocido (U) (Rawlings y Barrett, 1993; Rawling y col., 2016).

Para cada una de estas proteasas el aa representante del nombre se encuentra presente en el sitio catalítico responsable de la actividad. Aquellas peptidasas que aún no se ha descrito el ó los aa encargados de la actividad se conocen como desconocidos (Rawlings y Barrett, 1993; Barrett, 1997; Rawling y col., 2016).

9. Las aspárticoproteasas (AP).

Las AP son comúnmente proteasas activas a pHs ácidos, se encuentran distribuidas en vertebrados, fungi, plantas y retrovirus (Davies, 1990) y fueron las primeras proteasas descritas y la segunda proteína cristalizada. Esto ha permitido un gran número de investigaciones por los pioneros de la enzimología moderna. A esta familia se han añadido nuevos miembros encontrados en diferentes organismos (Barrett, 1994). La mayoría de las APs se sintetizan como zimógenos con un segmento N-terminal de ~45 aa que obstruye el sitio activo de la proteasa, el cual se debe remover para que la enzima se active (Neurath H, Walsh KA. 1976). Estas APs presentan gran contenido de aa dicarboxílicos, Ácido Aspártico (D), Ácido Glutámico (E) y sus amidas Asparagina (N) y Glutamina (Q) y un bajo contenido de residuos básicos, a excepción del propéptido que tiene un alto contenido de residuos básicos (Szecsi, 1992).

En humanos se han identificado 5 grupos de esta familia conocidas como: Pepsinógeno A (PGA), Pepsinógeno C (PGC), Renina (REN), Catepsina E (CatE)

y Catepsina D (CatD), las cuales son inmunquímica y bioquímica distintas y con distribución celular distinta. La mayoría de las APs son proteasas gástricas, por ejemplo: la PGA se localiza en la parte final del estómago, mientras que la PGC se distribuye en el estómago y en la parte proximal del duodeno y ambas participan principalmente en la digestión de proteínas de la ingesta. La REN se encuentra presente en el riñon y en muy bajas concentraciones en varios tejidos extrarenales. La CatE se localiza en altas concentraciones en la mucosa gástrica así como en tejido linfoide, aparentemente es una proteasa intracelular mientras que la CatD es una proteasa lisosomal ubicua de tejidos (Taggart, 1992).

9.1 Características de las aspártico proteasas.

Las APs se caracterizan por presentar dos residuos AsD en la secuencia catalítica: La secuencia circundante tiene caracter hidrofóbico: el dominio N-terminal F/I/L-D-T-G-S y en el dominio C-terminal D-T/S-G-S/T. Además, estas proteasas contienen dominios conservados para modificaciones post-traduccionales como fosforilación y glicosilación (Szecsi, 1992; Davies, 1990). De acuerdo con el sistema MEROPS las APs se clasifican en cinco clanes: AA, AC, AD, AE y AF (Figura 5). Los clanes AA y AD se encuentran distribuidos ampliamente en los organismos (Santos y col., 2013; Rawling y col., 2012).

El clan AA se divide en dos familias: A1 y A2 (Figura 5). La familia A1 se encuentra en mamíferos, plantas y, son proteínas monómericas sintetizadas como una sola cadena, con un peso molecular entre ~35 kDa y 40 kDa (320 a 350 aa) y presentan los dos residuos de Asp en el sitio catalítico. Esta familia tiene una estructura terciaria que contiene aproximadamente dos lóbulos simétricos (monómeros α y β), cada uno tiene un residuo Asp para formar el sitio catalítico. Por lo que su doble simetría, a partir del dominio consenso hace pensar que posiblemente surgió a partir de una duplicación del gen ancestral (Davies., 1990; Rawlings y Barrett, 1993; Theron y Divol, 2014).

La familia A2 o retropepsina tiene una estructura monomérica en la cual cada molécula contiene solamente la mitad del sitio catalítico y la dimerización es

necesaria para formar la enzima activa (Davies., 1990; Szecsi 1992; Rawlings y Barrett, 1993). Los miembros de las familias de APs comúnmente presentan uno a tres puentes disulfuro localizados en la posición entre los aa 251 y 286. Esta posición está conservada en todos los miembros de la familia. Los puentes disulfuro tienen una función importante en el plegamiento y estabilización de la proteína (col., 20).

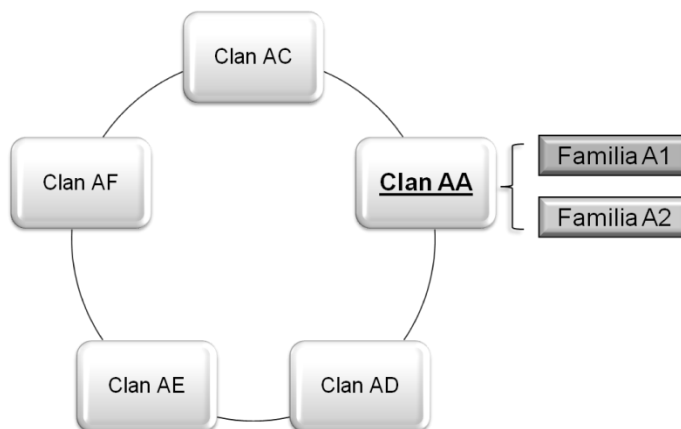


Figura 5. Las aspárticas proteasas son clasificadas en cinco clanes. Estos clanes son AA, AD, AE, AF, AC. En el clan AA se encuentran la Familia A1 y A2. (Sistema MEROPS, 2016).

9.2 Inhibición de las aspártico proteasas.

Las APs son susceptibles a la inhibición por pepstatina A, DAN (Diazoacetil DL-norleucina metil ester) y EPN (epoxi-(p-nitrofenoxi) propano). Cada uno actúa de manera específica uniéndose al carboxil de los residuos de Asp en el sitio activo, inactivando la enzima (Kay y Dunn, 1992). Las APs pertenecientes al clan AA sensibles a la pepstatina A se dividen en dos familias A1 y A2, presentando similitud en la estructura terciaria (Cuadro 1) (Rawlings y Barrett, 1993).

Cuadro 1. Clasificación del clan AA de las APs.	
Clan AA Residuo Catalítico D,D	
Familia A1: PEPSINA	Familia A2: RETROPEPSINA

Aspergillopepsina I	3.18	Retropepsina	23.16
Rizopuspepsina	23.20		
Penicilopepsina	23.21	Endopeptidasa relacionada a Retrovirus (humano)	
Endotiapepsina	23.22		
Mucorpepsina	23.23	Proteina like -Retropepsina (virus vaccinia)	
Candidapepsina	23.24		
Poliporopepsina	23.29		
Saccharopepsina	23.25		
Proteina "Barrier" (<i>Saccharomyces</i>)			
Áspartico endopeptidasa (cebada)			
Pepsina A	23.1		
Áspartico endopeptidasa P111			
Gastricsina	23.3		
Quimosina	23.4		
Pepsina Embriónica (pollo)			
Renina, submandibular	23.15		
Renina, renal	23.15		
Catepsina D	23.5		
Catepsina E	23.34		

10. Mecanismo catalítico de las aspártico proteasas.

El mecanismo ácido-base ha sido descrito para esta familia. Cuando la proteína se expone a un pH bajo, se generan eventos de cortes provocando un rearrreglo conformacional. Primeramente, una molécula de agua permite la formación de puentes de hidrógeno unidos a los dos residuos Asp en el centro catalítico. El residuo Asp32 actúa como una base, aceptando un protón, mientras que el residuo Asp215 actúa como un ácido, generando un ataque nucleofílico en el grupo carbonil amida del sustrato o el péptido a escindir. Esto conduce a la formación de un intermediario tetrahedral. Entonces el residuo Asp que actúa como una base unida al hidrógeno ataca al átomo de oxígeno, mientras que Asp que participa como ácido mantiene la unión del hidrógeno al oxígeno del residuo Asp,

actuando como ácido. Durante el estado final ocurre una reversión de la conformación alrededor del átomo de nitrógeno del enlace escindible del sustrato con la transferencia de un átomo de hidrógeno del residuo Asp actuando como una base para el átomo de nitrógeno. En paralelo, un protón es transferido del átomo de oxígeno de un residuo Asp que actúa como ácido hacia el grupo carbonil del oxígeno en la unión peptídica generando el corte. Esto produce el rompimiento en el enlace C-N y la liberación de dos productos peptídicos. Como consecuencia, el residuo Asp que actúa como una base tiene una carga negativa en este estado y por lo tanto está listo para la siguiente reacción de catálisis. Los intermediarios aniónicos en las APs son estabilizadores secuenciales por un complejo de puentes de hidrógeno en cada sitio activo de Asp, en dos intermediarios durante la catálisis⁶ (Veerapandian y col., 1992). En conjunto, estos residuos Asp contribuyen al mecanismo catalítico y proveen la base de la nomenclatura para esta clase de enzimas.

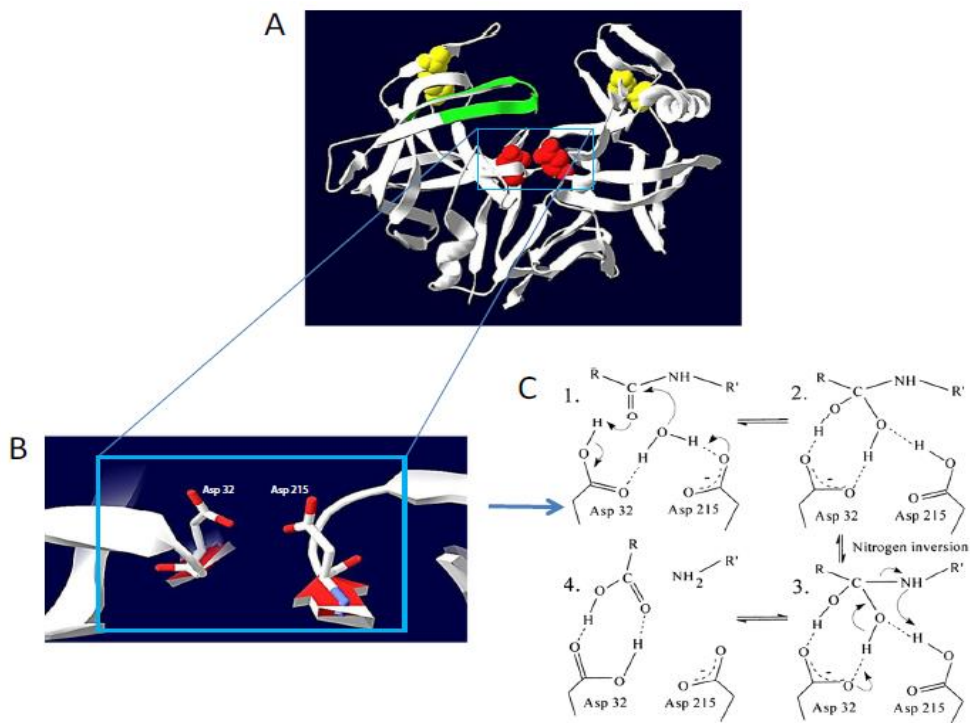


Figura 6. Estructura tridimensional y mecanismo de acción de una AP típica. a) Representación de elementos estructurales: Sitio activo (Color rojo), Puentes disulfuro (Color Amarillo) y Región asa sobre una hebra β - formando una estructura U “Hairpin” (Color verde). b) Plano del sitio activo. c) Mecanismo catalítico (Theron y Divol, 2014).

11. Las catepsinas.

Las catepsinas son hidrolasas que degradan proteínas a un pH ácido en lisosomas o en la matriz extracelular. Las catepsinas se dividen en tres subgrupos de acuerdo al aminoácido que tienen como su sitio activo (Cuadro 2) (Benes y col., 2008).

Cuadro 2. Clasificación de Catepsinas.

Catepsinas	
Cisteína Catepsinas	B, C, H, F, K, L, O, S, V, X y W
Aspártico Catepsinas	D y E
Serina Catepsinas	A y G

11.1 Catepsina D (CatD).

La catepsina D (CatD, EC 3.4.23.5) es una aspártico proteasa intracelular lisosomal de la familia pepsina, se sintetiza en los ribosomas del retículo endoplasmico rugoso como preprocatepsina D. Al perder la secuencia señal se convierte en procatepsina D (pCatD) de 52 kDa trasladándose a estructuras vesiculares intracelulares (lisosomas, endosomas y fagosomas). La pCatD es una glicoproteína unida a dos residuos N-oligosacáridos de Manosa-6-Fosfato (M-6-P)

modificado en los residuos de Asn 70 y Asn 199. La localización lisosomal es mediada por dos vías: La vía dependiente de dos receptores de M-6-P y la vía independiente de M-6-P poco estudiada (Benes y col., 2008).

11.2 Procesamiento proteolítico y maduración de la Cat D en el compartimento lisosomal.

Una vez presente en los compartimentos endolisosomales, la forma pCatD se procesa a través de eventos proteolíticos para generar la forma CatD madura (Figura 7). 1. Primeramente, a un pH bajo en endosomas tardíos el pCatD se disocia de los receptores M-6-P y se remueve del grupo fosfato. 2. El evento proteolítico inicial es la pérdida del propéptido (44 aa) del pCatD para generar un intermediario de 48 kDa (348 aa). La eliminación del propéptido es independiente de la actividad autocatalítica de CatD y es mediada por otras catepsinas. El propéptido (también definido como péptido activador) de CatD y es esencial para el correcto plegamiento, activación y liberación de la proteína a lisosomas (Zaidi y col., 2008; Vidoni y col., 2016). En los compartimentos ácidos endosomales y lisosomales el corte en el aminoácido 44 en la región N-terminal del propéptido pCatD genera una proteína de 48 kDa, estado intermedio de la forma activa de la enzima (Benes y col., 2008). 3. El intermediario de 48 kDa se procesa en dos fragmentos para generar la forma madura de la CatD. Esta etapa de procesamiento se realiza por una catepsina B o L que genera un fragmento ligero de 14 kDa del amino-terminal y un fragmento pesado de 34 kDa del carboxilo-terminal (Zaidi y col., 2008). El corte proteolítico, además de generar la disociación de la estructura globular de CatD produce la proteasa lisosomal madura activa compuesta por los fragmentos: pesado de 34 kDa y ligero de 14 kDa unidos por interacciones no covalente. Las catepsinas tipo cisteínas y la actividad autocatalítica se relacionan con el procesamiento de pCatD/CatD. Algunos otros factores que contribuyen a la activación de CatD se encuentra incluido un segundo mensajero lipídico ceramida y prosaposina (Benes y col., 2008).

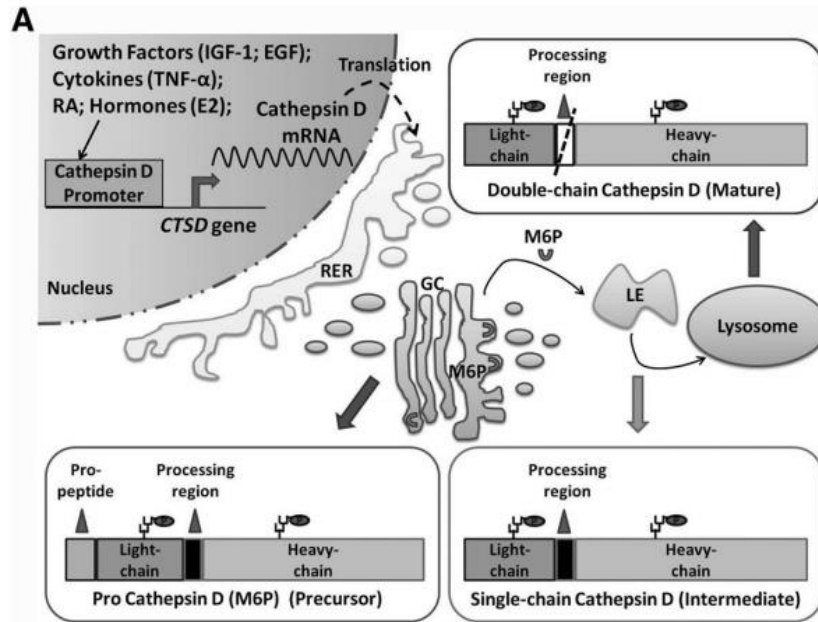


Figura 7. Etapas de maduración de la Catepsina D. Síntesis de CatD en el núcleo, transporte al RER, procesamiento de modificaciones postraduccionales en el aparato de Golgi y a los compartimentos endolisosomales dónde se generan eventos proteolíticos para generar la CatD madura residente de lisosomas (Vidoni **11.3 Funciones de la CatD.** y col., 2016).

La CatD se encuentra involucrada en algunas funciones fisiológicas como la degradación de proteínas, procesamiento de antígenos y apoptosis, entre otras (Cuadro 3) (Benes y col., 2008). Este tipo de proteasas se le ha asociado con ciertas condiciones patológicas con enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer y Parkison's) (Vidoni y col., 2016). En cáncer se ha asociado a una hipersecreción, contribuyendo a la invasividad y metástasis (Fusek y Vetvicka, 2005).

Cuadro . Proteínas blanco de catepsina D en funciones biológicas.

Funciones biológicas de CatD	Proteína blanco
Activación y degradación de polipéptidos de hormonas, quimiocinas, factores de crecimiento y sus receptores.	FGF, Plasminogéno, Prolactina, Endostatina, osteocalcina, Tiroglobulina, Insulina, Glucagón, IL-1, IGFBP, Receptor Androgénico, Hormona Paratiroidea, alfa MIP-1, beta MIP-1, SLC.
Activación de precursores enzimáticos.	Catepsina B, Catepsina L, Transglutaminasa 1.

Procesamiento de antígenos de cerebro.	Proteína α 4 β -amiloide, Tau, tubulina, Proteína básica mielina, Mhtt, Apolipoproteína E, alfa-sinucleína.
Degradación de proteínas del citoesqueleto.	Neurofilamentos, Actina, Miosina, Tropomiosina.
Fibrolisis mediada-monocito.	Fibrinógeno, Fibrina.
Regulación de apoptosis	Bid, Tiredoxina-1.
Procesamiento de activadores e inhibidores enzimáticos.	Prosaposina, alfa-1- antitripsina, Kalistatina, Cistatina C, Quininógeno.
Hidrólisis del colesterol LDL.	Apolipoproteína B.
Degradación de proteínas de ECM.	Proteoglicanos, Colágenos, Fibronectina
Otros.	Hemoglobina, Conectina, Dermicidina.

12. Proteasas en protozoarios parásitos.

Los protozoarios parásitos se encuentran entre los patógenos más prevalentes en el mundo. No es sorprendente encontrar proteasas en un gran número de procesos patogénicos en infecciones parasitarias. Las proteasas en los parásitos participan en el establecimiento, mantenimiento y exacerbación de la infección (McKerrow y col., 2016). Estos procesos facilitan la invasión del tejido del hospedero, permitiendo al parásito la digestión de proteínas como una forma de evadir la respuesta inmune del hospedero. A parte de las funciones que hacen las proteasas en los parásitos, también se emplean como herramientas de investigación para el estudio y desarrollo de la regulación de los genes de los parásitos (McKerrow, 1989; McKerrow y col., 2006).

Enfermedades como malaria, leishmaniasis, amibiasis y tripanosomiasis afectan a cientos de millones de personas. Los estudios para entender la biología molecular y bioquímica de estos organismos se han enfocado en moléculas específicas del parásito que son esenciales para el ciclo de vida o la patogénesis del mismo que provocan la enfermedad. Diferentes tipos de proteasas son frecuentemente expresadas en diferentes estadios del ciclo de vida para ayudar a la replicación y metamorfosis del parásito. Parásitos intracelulares como aquellos que producen la malaria y la enfermedad de Chagas expresan altos niveles de actividad proteolítica para asegurar la degradación de proteínas del hospedero como la hemoglobina.

En la amibiasis, las proteasas liberadas por el parásito pueden dañar a las células y tejidos del hospedero, contribuyendo al daño del tejido e invasión del parásito (McKerrow y col., 1993; 2006).

13. Aspártico proteasas (AP) identificadas en parásitos.

En nemátodos parásitos las APs participan en la degradación de la hemoglobina del hospedero. Estas se han reportado en parásitos hematófagos: circulantes en sangre como *Schistosoma mansoni* y *S. Japonicum*. Anquilostomas como *Ancylostoma canium* y *Necator americanus*, los estromboloides *Haemonchus contortus* y filaria *Onchocerca volvulus*. A pesar del gran número de APs que se conocen en nemátodos, la función de éstas durante los estadios de desarrollo no es clara (Park y col., 2012).

La AP de *Trichinella spiralis* Ts-Asp es codificada por un gen de 1281 nt que se traduce en una proteína de 405 aa con un peso molecular de ~45 kDa y un pI de 5.95 y con una identidad del 50% con otras APs de nemátodos clasificadas en la familia A1 de las catepsinas D. Este grupo de APs se ha identificado en los nemátodos hematófagos o en aquellos que invaden tejidos; su función está relacionada a la digestión de la hemoglobina y a la invasión del tejido del hospedero. Al realizar un alineamiento de secuencia de aa de Ts-Asp con otras APs se encontró que Ts-Asp comparte algunas características comunes de las APs como la secuencia señal de 15 aa (M1 a G15), presenta el motivo catalítico (DTG) el cual incluye los residuos activos D (D99, D286), una de las características principales de estas proteasas (Figura 5). También se identificaron a sus sustratos y su actividad proteolítica se inhibió completamente por inhibidores de APs (Park y col., 2012).

En *Caenorhabditis elegans* se identificaron 6 aspártico proteasas (ASP1-6) que se sintetizan como precursores con tamaños que varían de ~41.5 a 49.2 kDa y presentan un péptido señal que al procesarse genera una proteína de menor tamaño. Estas APs son susceptibles a modificaciones postraduccionales como N-glicosilación y fosforilación. Sin embargo, la proteína ASP-1 es la única que se

transcribe activamente en un subgrupo de células intestinales durante la embriogénesis tardía y en los estados larvarios tempranos durante el desarrollo. Esta comparte un 60% de identidad con otras APs de nemátodos. Además, esta proteasa contiene dominios conservados: presenta en el sitio activo los residuos de D, posee residuos de C los cuales participan en la formación de puentes disulfuro y sitios de N-glicosilación, comparte una homología estructural a la catepsina D de mamíferos y se localiza principalmente en lisosomas. Las cinco APs adicionales que se expresan en *C. elegans* son isoformas de este parásito y posiblemente otros helmintos también poseen isoformas de múltiples proteasas (Tchereponova y col., 2000).

La AP de *Opisthorchis viverrini* Ov-APR-1 es codificada por un gen de 1562 nt que se traduce en una pro-enzima de 425 aa, presenta un péptido señal con un sitio de corte entre C17 y S18, así como cinco sitios de N-glicosilación. El alineamiento de aa con otras APs reportadas mostró un 83% de identidad con APs de la familia A1. La enzima se localizó en diferentes etapas de desarrollo del parásito y en múltiples tejidos. La expresión de esta enzima solamente se encontró en compartimentos ácidos y principalmente en organelos como los lisosomas, así como en productos de secreción y excreción. Esta enzima participa en la degradación de proteínas del hospedero para la adquisición de nutrientes. Las principales proteínas blanco para estas proteasas son hemoglobina y proteínas del suero. Por otro lado, se identificó en Ov-APR-1 el sustrato preferente cortando principalmente residuos aromáticos e hidrofóbicos en los sitios N y C terminal como Lisina en el sitio N-terminal. Este último sitio se ha reportado en numerosas APs del reino fungi. Sin embargo, homólogos en mamíferos incluyendo la pepsina y catepsina D no se les ha identificado el sitio preferencial en L (Suttiapra y col., 2009). En la familia de tripanosomátidos las APs están asociadas a crecimiento celular, mecanismos de patogenicidad, considerándolas como posibles blancos terapéuticos (Santos y col., 2103).

En el género *Plasmodium*, las plasmepsinas son un grupo de APs ácidas encontradas en estos parásitos. En el caso de *Plasmodium falciparum*, más de 10

genes codifican para plasmepsinas o enzimas relacionadas. Las plasmepsinas 1, 2 y 4 (PfPM1, PfPM2, y PfPM4) y las histaspártico proteasas (PfHAP) se encuentran estrechamente relacionadas, están localizadas en vacuolas fagocíticas por lo que se cree que participan en la hidrólisis de hemoglobina. PfPM1 facilita el corte inicial de la cadena α -globina de la hemoglobina, la cual conduce al desplegamiento de la molécula y por lo tanto a la proteólisis por PfPM2, PfPM4, PfHAP, falcipainas y facilisinas. Los péptidos formados por la acción de estas enzimas son convertidos a aminoácidos libres por aminopeptidasas y otras enzimas. Aparentemente PfPM2 y PfPM4 también participan en la remodelación del citoesqueleto del eritrocito por el corte de espectrina a pH neutro (Silva y col., 1996; Goldberg y col., 1991; Na y col., 2004).

Las funciones exactas de las otras seis plasmepsinas (PfPM5-10) aún se desconocen, pero se cree que pueden estar asociadas con el mantenimiento del estadio eritrocítico asexual o en el desarrollo de diferentes estadios del parásito. El tratamiento con inhibidores de APs inhibe la hidrólisis de hemoglobina y bloquea el desarrollo del parásito *in vitro*. Esto sugiere que al menos una de las plasmepsinas es esencial para la supervivencia del parásito (Silva y col., 1996; Goldberg y col., 1991; Na y col., 2004).

14. Aspártico proteasas en *T. vaginalis* (Tv-APs).de tipo

T. vaginalis es un parásito con una alta actividad proteolítica que presenta un degradoma complejo en comparación con otros organismos (Carlton y col., 2007; Hirt y col., 2011). Las principales proteasas identificadas son cisteína proteínasas. *T. vaginalis* posee en su genoma genes que codifican para ~446 péptidasas (Cuadro 4) (Carlton y col., 2007).

Especie	Tipo Catalítico					
	No Total	Asp	Cys	Metallo	Ser	Thr
<i>T. vaginalis</i>	446	6	220	123	80	17
<i>L. major</i>	153	2	63	54	13	21
<i>P. falciparum</i>	92	10	33	20	16	13
<i>H. sapiens</i>	561	21	148	186	178	28
<i>M. musculus</i>	641	27	163	198	227	26
<i>S. cerevisiae</i>	100	15	29	36	17	3

Cuadro 4.
Proteasas
en *T.*

vaginalis y otros organismos.

Sin embargo, solamente 6 genes codifican para APs: dos genes para el Clan AA y 4 genes para el Clan AD (Cuadro 5) (Carlton y col., 2007).

Cuadro 5. Aspártico proteasas en *T. vaginalis*.

Tipo Catalítico	Clan	Familia	Número	Ejem. de Familia
Aspártico	AA	A1	1	Catepsina D
		A2	1	Retropepsina
	AD	A22	4	Presenilina
Total			6	

Hasta ahora no se ha caracterizado a ninguna AP en este parásito; posiblemente debido al bajo número de genes ha sido complicado aislar algunos de éstos.

Mediante un análisis transcriptómico de parásitos crecidos en condiciones enriquecidas y de restricción de glucosa se reportaron diferentes genes regulados por glucosa, entre los que se encontraron los que codifican para las APs. El gen TVAG_336300 presentó el mayor número de transcritos y la proteasa que codifica corresponde a una catepsina D-like que pertenece al Clan AA, familia A1, mientras que los genes para otras APs: TVAG_459080, TVAG_026700, TVAG_074490, TVAG_412920, TVAG_428310 presentaron un número muy bajo de transcritos (Huang y col., 2014). A nivel de proteína aún se desconocen los niveles de

expresión, localización y posible participación de las APs en la patogenia del parásito.

15. Efecto de la glucosa en parásitos.

En todos los organismos, los nutrientes son los principales reguladores que controlan vías de transcripción y traducción. La glucosa es la principal fuente de energía en la mayoría de las células eucariontes; sin embargo, no siempre está disponible. Los parásitos han desarrollado mecanismos para regular dichos procesos. Los estudios se enfocan principalmente en el efecto de la restricción de glucosa (RG) sobre el metabolismo, respuesta al estrés, regulación de supervivencia y muerte celular para entender el mecanismo de adaptación bajo condición de estrés nutricional.

El estrés metabólico se ha asociado con la patogénesis. En *P. falciparum* los genes *var* que codifican para PfPME “antigenically variant erythrocyte-membrane-protein” así como otras proteínas participantes en procesos metabólicos y morfológicos del parásito se sobreexpresan en RG (Fang y col., 2004).

En *Entamoeba histolytica* la RG favorece la capacidad de virulencia al incrementar la lisis celular y la eritrofagocitosis mediante la sobreexpresión de KRiP1 “lysine-rich protein 1” y LgL1 “Gal/GalNAc lectin light subunit” y disminuye la expresión de Ap-A “amoebapore A” y CP-A5 “cysteine proteinase A5”, lo que sugiere que estas dos proteínas no son requeridas para elevar la virulencia del parásito en esta condición de estrés (Tovy y col., 2011).

Estudios en el modelo unicelular de *Saccharomyces cerevisiae* la RG resultó en cambios fisiológicos y metabólicos severos, de fermentación a respiración, inhibición de la traducción, aumento de la resistencia al estrés oxidativo y autofagia (Santangelo, 2006; Busti y col., 2010). Sin embargo, las vías de señalización blanco para el mecanismo adaptativo por el estrés nutricional son poco conocidas en protistas (Huang y col., 2014). Para el caso de *Candida albicans* el metabolismo en presencia de glucosa induce un incremento en la expresión de genes participantes en el estrés, aumento en la resistencia al estrés

oxidativo y catiónico para proporcionar un ambiente de resistencia celular (Rodaki y col., 2009).

16. Efecto de la glucosa en *T. vaginalis*.

En tricomonas la glucosa es la fuente principal de carbohidratos la cual se emplea para la producción de energía en forma de ATP mediante el metabolismo de carbohidratos bajo condiciones aerobias y anaerobias. En el citoplasma, la glucosa es convertida a piruvato que es metabolizado en el hidrogenosoma por oxidación fermentativa (Müller, 1988).

Los estudios *in vitro* de pacientes con *T. vaginalis* reportan un ambiente diferencial de glucosa ≤ 1 mM considerada como una condición de restricción de glucosa o baja glucosa hasta 58 mM tomada como la condición rica en glucosa ó alta glucosa, concentración 10 veces mayor respecto a la concentraciones en sangre (Huang y col., 2014; Miranda-Ozuna y col., 2016). Sin embargo, es muy poco probable que el parásito se exponga a altas concentraciones de glucosa en el medio natural durante la infección. Recientemente se midieron las concentraciones de glucosa en las secreciones vaginales obteniendo un rango de 0.3 mM a 57 mM (Miranda-Ozuna y col., 2016). Dado que *T. vaginalis* sí puede estar expuesta a variaciones en las concentraciones de glucosa durante la infección, es importante elucidar el mecanismo adaptativo de *T. vaginalis* en RG y en AG, así como definir cómo estas condiciones de estrés pueden ayudar a establecer la infección. Cabe mencionar que estas condiciones han sido poco estudiadas en *T. vaginalis*.

El primer estudio se enfocó en los cambios de expresión en las principales vías metabólicas y el sistema antioxidante direccionado a entender la supervivencia del parásito en RG. Los resultados obtenidos demuestran el incremento en la expresión de genes antioxidantes como SOD “Superóxido dismutasa”, TrxP “Tiorredoxina peroxidasa”, Rbr “Rubreritrina” entre otros en respuesta a la RG, los cuales favorecen el aumento en la resistencia a radicales libres, como parte de una posible estrategia de sobrevivencia. Por otro lado, se observó una inhibición

en la expresión de genes en la principal vía metabólica productora de energía como: GAPDH “Gliceraldehído 3-P deshidrogenasa”, ALDO “Fructosa-bisfosfato aldolasa”, TPI “Triosa-fosfato isomerasa”, PEPCK “Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa”, PK “Piruvato quinasa” entre otros. Con esos resultados se asume que *T. vaginalis* activa otras vías para la producción de energía (Huang y col., 2014). La autofagia es otro mecanismo regulado por la RG y es considerado un proceso citoprotector cuando la célula se encuentra en un ambiente carente de nutrientes (Huang y col., 2014).

Es claro que hace falta estudiar cómo se afectan los diferentes factores de virulencia implicados en la virulencia del parásito bajo estas condiciones cambiantes de glucosa durante la infección.

II._JUSTIFICACIÓN

Hasta ahora no se ha estudiado la participación de proteasas tipo AP que se expresen en el parásito bajo diferentes condiciones ambientales como glucosa. Ni

tampoco se sabe si las APs pueden participar en la virulencia de *T. vaginalis*. Por lo que es importante caracterizar a la *Tv-CatD*, ya que nos permitirá determinar si se modula diferencialmente en condiciones ambientales de glucosa, así como conocer su localización y función en *T. vaginalis*.

III._HIPÓTESIS

Trichomonas vaginalis expresa una aspártico proteasa tipo catepsina D (*Tv-CatD*) que se modula diferencialmente por glucosa, se encuentra activa y degrada hemoglobina.

IV._OBJETIVO GENERAL

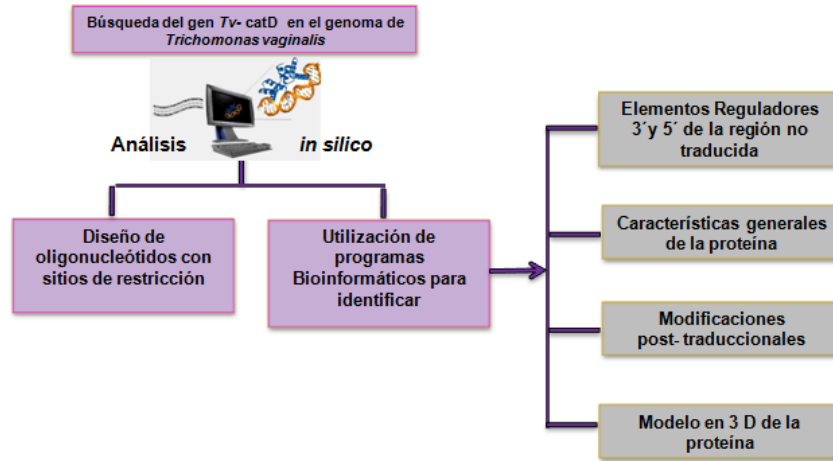
Caracterizar a la aspártico proteasa tipo catepsina D de *T. vaginalis* (Tv-catD)

OBJETIVOS PARTICULARES

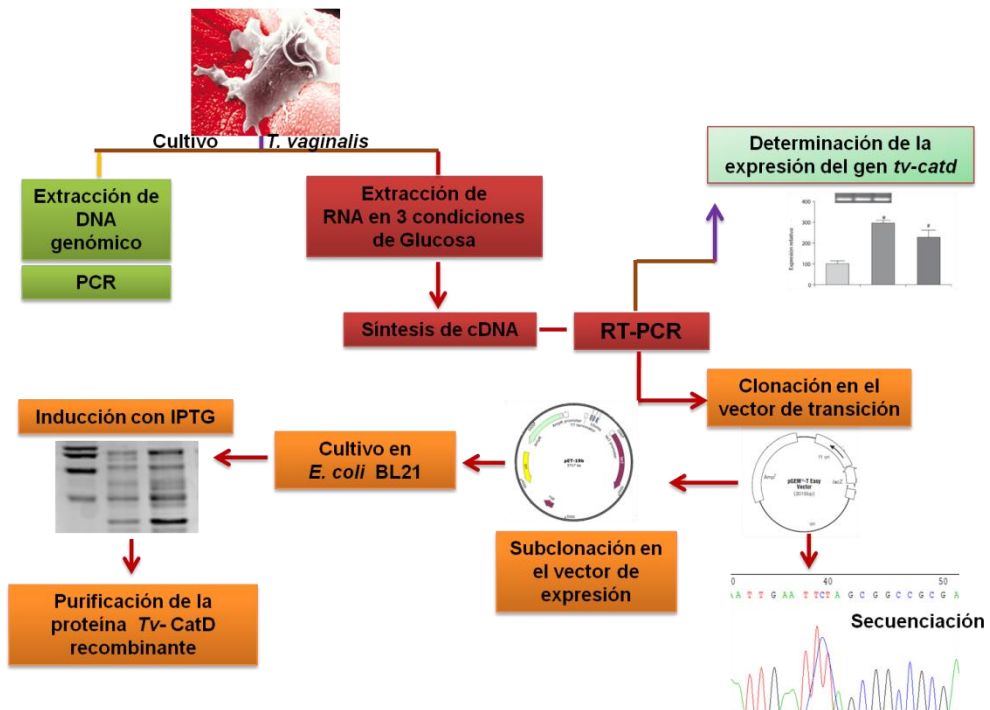
1. Identificar secuencias reguladoras de la expresión genética descritos para *T. vaginalis* en el gen *tv-catd*, así como posibles sitios de modificaciones postraduccionales de la proteína Tv-CatD mediante análisis bioinformático.
secuencias reguladoras del gen *tv-catd* descritas para *T. vaginalis* así como posibles sitios de modificaciones postraduccionales de la proteína Tv-CatD mediante análisis bioinformático.
2. Estudiar el efecto de la glucosa en la expresión del gen y de la cantidad de proteína Tv-CatD.
3. Determinar la localización subcelular de la *Tv-CatD* en *T. vaginalis*.
4. Determinar si *Tv-CatD* se encuentra activa en *T. vaginalis* e identificar si tiene actividad de hemoglobinasas.

V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

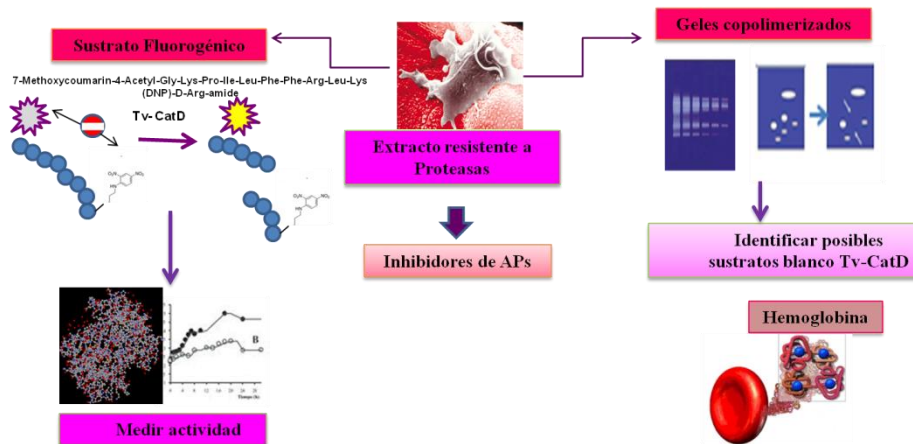
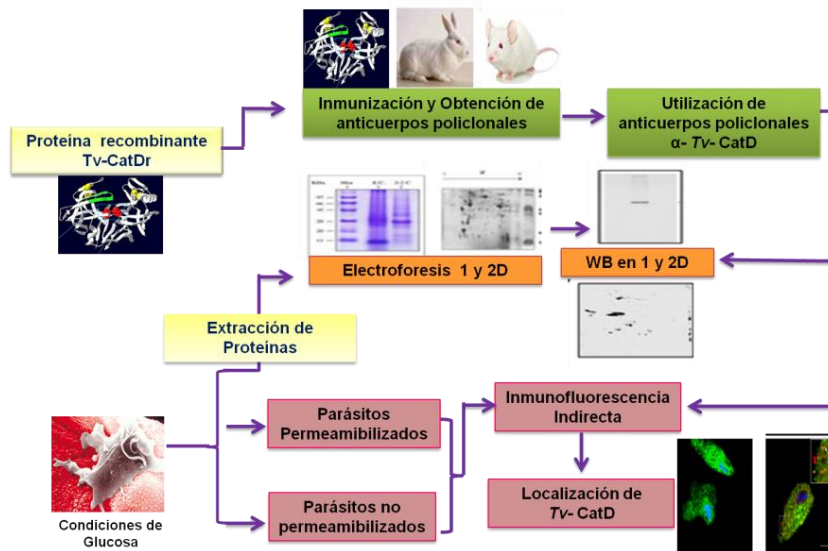
Objetivo 1:



Objetivo 2:



Objetivos 2, 3 y 4:



VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis *in silico* del gen y proteína Tv-catD.

Cultivo de *T vaginalis*.

El aislado CNCD 188 de *T. vaginalis*, se cultivó por 20 h a 37 °C en medio TYG (triptona-extracto de levadura-glucosa 25 mM) por tres días con 10% de suero de bovino adulto inactivado por calor (Diamond, 1957). Para cultivos suplementados con las diferentes concentraciones de glucosa, al medio TY se dejó sin glucosa o se adicionó glucosa a partir de un stock de 1 M (MERKC). Las concentraciones de glucosa: baja glucosa (<1 mM, RG), normal de glucosa (25 mM, NG) y alta glucosa (50 mM, AG) (Miranda-Ozuna y col., 2016).

Extracción de DNA genómico.

La extracción de DNA genómico de *T. vaginalis* se realizó a partir de 20×10^6 de parásitos por medio de la técnica de fenol-cloroformo. Los parásitos se lavaron tres veces con 20 ml de PBS, pH 7.0 centrifugando a 1800 rpm por 5 min a 4°C. El botón celular se resuspendió en 2 ml de PBS y se transfirieron a dos tubos Eppendorf de 1.5 ml. Posteriormente, a cada tubo se le agregó 300 µl de amortiguador de lisis (SDS 0.2%, NaCl 100 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8.0) y 300 µl de fenol (equilibrado con Tris-HCl, pH 8.0), se agitó suavemente por 30 s y se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min a 4°C en microcentrífuga. La fase superior se tomó cuidadosamente, sin tocar la interfase, se colocó en un tubo Eppendorf nuevo con 300 µl de fenol y 300 µl de cloroformo al 100%, se agitó y se centrifugó de la misma forma que en el paso anterior. La fase superior se colocó en un tubo Eppendorf nuevo con 500 µl de cloroformo al 100%, se agitó y se centrifugó. Posteriormente, la fase superior se colocó en otro tubo Eppendorf nuevo y el DNA se precipitó con 40 µl de acetato de sodio 3 M pH 5.3 y 1 ml de etanol absoluto (2.5 volúmenes de etanol absoluto y 1/10 volumen de acetato de sodio 3 M) a -20°C durante 2 h y se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 min para

obtener los ácidos nucleicos. El sobrenadante se retiró y el botón de ácidos nucleicos se lavó con 1 ml de etanol al 70%, se retiró el etanol y la pastilla se secó y se resuspendió en 50 µl de agua de ampolleta. Finalmente, se agregó ribonucleasa A (0.4 µg/ml) y se incubó durante 1 h a 37°C. El DNA se analizó en geles de agarosa al 1% en TBE 1× y se almacenó -20°C.

Diseño de oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos correspondientes para el gen completo Tv-CatD se diseñaron anclando en los extremos 5' y 3'. Oligonucleótido en sentido Fw-Cathepsin D-like AP 5'- CCCATATGCTAACTTTCTTCCTTTCTTCTG-3' y oligonucleótido en antisentido Rv-Cathepsin D-like AP 5'- CCCTCGAGTTACCACTTAGCAAGGG-3' de la secuencia codificante completa del gen *tv-catd* se adicionaron los sitios de restricción para las enzimas *NdeI* en el extremo 5' y *XhoI* en el extremo 3' del gen (letras subrayadas). Estos sitios se eligieron para la subclonación de la secuencia codificante para el gen *tv-catd* en el vector pColdI (TaKara), ya que estos forman parte del sitio múltiple de clonación de este vector y estos sitios no se encuentran en la secuencia del gen *tv-catd* a clonar. Los oligonucleótidos se sintetizaron químicamente (SIGMA-ALDRICH) y se resuspendieron con agua estéril a una concentración de 1 µg/µl para trabajo y se almacenaron a -20°C. Para el caso de la amplificación del gen *tv-catd* con el tamaño de ~180 pb (fragmento 1) usado para las RT-PCR tiempo final se diseñó el oligonucleótido (nucleótido 933 al 957) en sentido Fw-CatD-like AP rt 5'- CGTCATGAGAGTTAACGCAGGATCC-3' y se usó el antisentido previamente descrito. Por otra parte, se diseñaron oligonucleótidos para amplificar un fragmento de ~162 pb (fragmento 2) para el ensayo del tiempo real (cuantitativa) el oligonucleótido en sentido (nucleótido 634 al 653) Fw-Tv-qcatd TACAACCCAGATGCTTTCTC oligonucleótido en antisentido (nucleótido 777 al 796) Rv-Tv-qcatd GCATAGATGTGCCTGTATCA.

Extracción de RNA total.

A partir de un cultivo de 15 ml (2×10^6 /ml) de parásitos, se colocó en tubo Falcón de 50 ml nuevo, se centrifugó a 1800 rpm por 5 min a 4°C, se desechó el

sobrenadante, la pastilla se pasó a un tubo Eppendorff nuevo de 1.5 ml, se adicionó 1 ml de trizol (por cada 30×10^6 de parásitos) más 0.2 ml de cloroformo por cada ml de trizol, se mezcló 15 veces por inversión, se incubó por 3 min a temperatura ambiente (TA), se centrifugó la muestra a 8000 rpm por 20 min a 4°C, se recolectó la fase acuosa se transfirió a un tubo Eppendorff de 1.5 ml nuevo, se precipitó el RNA, se adicionó 0.5 ml de alcohol isopropílico (2-propanol) por cada ml de trizol, se incubó la muestra por 15 min a TA, se centrifugó a 8000 rpm por 25 min a 4°C, se desechó el sobrenadante con cuidado, se lavó la pastilla con 1 ml de etanol al 75% en agua DEPC (1 ml de etanol al 75% DEPC por 1 ml de trizol), se resuspendió la pastilla y se centrifugó a 8000 rpm por 10 min a 4°C, se desechó el sobrenadante con mucho cuidado, el tubo se dejó destapado por 10 min a TA para secar restos de etanol, se resuspendió la pastilla en 60 μ l de H₂O DEPC, (si no se resuspendió la muestra totalmente realizar los siguientes dos pasos), la muestra se calentó a 70°C por 5 min, se incubó en hielo por 5 min y las muestras se almacenaron a -70°C. Se visualizó la integridad de las muestras corriendo un gel de agarosa al 1% en amortiguador TBE 1 \times .

Tratamiento de RNA con DNasa I (Para eliminar trazas de DNA genómico).

RNA total 10 μ g se colocaron en un tubo Eppendorff de 1.5 ml estéril, se agregó 4 μ l de amortiguador DNasal 10 \times (Invitrogen), se agregó 3 μ l (3 U) DNasa I (libre de RNasas), se aforó a un volumen de 40 μ l con agua DEPC, se mezcló y se centrifugó por 30 s a 13000 rpm, se incubó la muestra por 15 min a TA, se agregó 2 μ l de EDTA 25 mM, se llevó la muestra a un volumen final de 100 μ l con agua DEPC, se calentó por 10 min a 65°C para inactivar la enzima, se precipitó el RNA con 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M (en H₂O-DEPC) y 2.5 volúmenes de etanol absoluto, se incubó toda la noche a -70°C, se centrifugó por 15 min a 13000 rpm, se desechó el sobrenadante, se dejó secar la pastilla y se resuspendió en 10 μ l en H₂O-DEPC. Para confirmar que el DNA genómico se había eliminado por completo, se realizó una PCR con las muestras tratadas con DNasa I. Las condiciones para el termociclador (MyCycler Thermal, Bio-Rad) fueron las

empleadas para amplificar el gen *tv-catd*. Como control de la enzima se utilizó DNA genómico de Tv, los amplicones obtenidos en las reacciones se analizaron en un gel de agarosa al 1% en amortiguador TBE 1×.

Síntesis de cDNA.

Para la síntesis de cDNA se inició con una concentración de 10 µg de RNA total tratado previamente con DNasa I, se resuspendió en 11 µl de H₂O-DEPC, a la muestra se adicionaron los siguientes componentes (Kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis. Thermo SCIENTIFIC): 1 µl Oligo dT (0.8 µM), 11 µl RNA total [10 µg] se incubó a 65°C por 5 min, se colocó en hielo, se adicionó 4 µl del amortiguador de reacción 5x, 2 µl de mezcla de dNTP (1 mM), 1 µl del Inhibidor RNasa RiboLock 1U/µl, volumen final 20 µl, la muestra se resuspendió, se centrifugó a 13000 rpm y se incubó a 42°C por 1 h, al final la reacción se calentó a 70 °C por 5 min y se colocó en hielo. El cDNA se cuantificó en el equipo Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) y la muestra se almacenó a -20 °C.

RT-PCR semicuantitativa y cuantitativa.

Para el ensayo de RT-PCR punto final se trabajó con 500 ng de cDNA para cada condición para la amplificación del gen usando el grupo de oligonucleótidos para el fragmento de 180 pb. En un tubo Eppendorf estéril de 500 µl se adicionaron los siguientes componente: 5 µl de amortiguador para PCR 10×, 1 µl de cada oligonucleótido dilución 1:25 (stock 1 µg/µl) sentido Fw-CatD-like AP rt y antisentido Rv-Cathepsin D-like AP, 2 µl MgCl₂, a la reacción se adicionó 1 µl de deoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTP's) 1 mM (dATP, dTTP, dGTP y dCTP) y 0.5 µl de enzima polimerasa Taq (Invitrogen), se llevó a un volumen final de 50 µl con la adición de H₂O. Como control positivo usamos 200 ng de DNAg. Además incluidos dos controles negativos sin DNA genómico y RNA tratado con DNasa I. Las condiciones de amplificación fueron 95°C por 2 min, 1 ciclo, después 25 ciclos de 95 °C 1 min, 63 °C 1 min, 72 °C 1 min y las condiciones de extensión final de

72 °C 7 min 1 ciclo. Después de la corrida en el termociclador (Bio-Rad) las muestras se corrieron en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio (0.5 µg/µl), en amortiguador TBE 1×.

Como control de carga usamos el mRNA de *β-tubulina* para lo cual se usaron los siguientes oligonucleótidos: en sentido BTUB9 5'-CATTGATAACGAAGCTCCTTTACGAT-3' y en antisentido BTUB2 5'-GCATGTTGTGCCGGACATAACCAT-3 (Madico y col., 1998). Las condiciones de amplificación fueron 95°C por 2 min, 1 ciclo, después 25 ciclos de 95 °C 1 min, 48 °C 1 min, 72 °C 1 min y las condiciones de extensión final de 72 °C 7 min 1 ciclo. Después de la corrida en el termociclador las muestras se corrieron en gel de agarosa al 0.8 ó 2% con bromuro de etidio (0.5 µg/µl), en amortiguador TBE 1×.

Ensayo de RT-PCR cuantitativa.

Para este ensayo se usó el kit “SuperScrit III Platinum SYBR Green One-Step qRT-PCR” (Invitrogen). Los oligonucleótidos utilizados para *tv-catd* fueron Tv-qcatd sentido y Rv-Tv-qcatd antisentido. La mezcla de reacción en volumen final de 20 µl se adicionaron los siguientes componentes: 10 µl del amortiguador SyBR 2× (3 mM de MgCl₂ y 0.2 mM dNTPs), 10 µM del oligonucleótido en sentido y antisentido, 0.2µl del “Reference Dye” (“5-carboxy-X-rhodamine”) este indicador es opcional a una concentración 25 µM, ≤ 10 µl de cDNA o bien aforar con H₂O-DEPC.

Preparación de la mezcla de reacción con todos los componentes de la reacción excepto el DNA. Se preparó una mezcla de reacción suficiente para el total de reacciones que se corrieron: tres replicas para cada punto de la dilución (cinco diluciones), reacción como negativo se le adicionaron todos los componentes excepto DNA. El proceso de validación se revisó con la finalidad de probar los productos de PCR a medir (gen *β-tubulina* y gen problema *tv-catd*) para la eficiencia de los mismos. Las amplificaciones se hicieron con diferentes cantidades de DNA (diluciones seriales a partir de un stock). Preparación de la curva estándar de DNA a partir del stock 500 ng. Para la preparación de los

estándares, se rotularon 5 tubos eppendorf (St1 a St5). Se inició con el estándar 1 (St1), tomar del 5 µl del stock de cDNA y se agregó al tubo correspondiente, se homogenizó. Para el St2 se adicionaron 5 µl del St1 y se aforó a 20 µl con agua, se homogenizó. Se repitieron estos pasos hasta formar los 5 estándares.

Condiciones de amplificación en el equipo del termociclador 95°C por 10 min, 1 ciclo, después 40 ciclos de 95 °C 30 seg , 55 °C 15 seg, 72 °C 30 seg (Applied Biosystems 7500). Finalmente se obtuvieron los valores de Ct con los cuales se procedió hacer los cálculos. El método aplicado para la expresión génica fue por el método de CT comparativo ó 2 delta Ct (Schmittgen y Livak, 2008).

Amplificación de la secuencia completa del gen *tv-catd*.

El cDNA obtenido de la condición de NG se cuantificó y trabajó con 500 ng de cDNA para cada condición para la amplificación del gen completo se usaron los oligonucleótidos sentido Fw-Cathepsin D-like AP y antisentido Rv-Cathepsin D-like AP. En un tubo Eppendorf estéril de 500 µl se adicionaron los siguientes componente: 5 µl de amortiguador Easy A 10× (Aligment), 1 µl de cada oligonucleótido dilución 1:25 (stock 1 µg/µl), 2 µl MgCl₂ (2 mM), se adicionó 1 µl de deoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTP's) 1 mM y se usó una enzima de alta fidelidad Easy A y se llevó a un volumen final de 50 µl con la adición de H₂O. Las condiciones de amplificación fueron las mismas a las previamente mencionadas.

Purificación del fragmento del gen *tv-catd*

A partir de cDNA de la condición de GN, se prepararon 4 reacciones de PCR y se prosigió a hacer la purificación del fragmento de DNA con el kit "Quick Gel Extraction Pure Link" (Invitrogen), se cortó el fragmento de agarosa (con el producto de interés) con un bisturí estéril en un transiluminador de luz ultravioleta, los fragmentos se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 ml, se agregó a cada tubo 800 µl del amortiguador de solubilización, se incubó a 50 °C por 10 min, se mezcló por inversión cada 2 o 3 min durante la incubación. Después que el gel se disolvió completamente se revisó el color de la mezcla la cual debe tener un color similar al del amortiguador. Para la purificación del DNA se tomaron 1.6 ml de la muestra y se colocó en la columna de purificación del Kit, se centrifugó a 13 000 rpm durante 1 min a 4 °C; para que se uniera el DNA a la columna; se

descartó el eluido, se le añadió 600 µl del amortiguador de lavado a la columna, se centrifugó a 13 000 rpm durante 2 min a 4 °C, se descartó el eluido, a la columna se le dió una última centrifugación adicional para eliminar el etanol residual. Para eluir el DNA se agregó 50 µl de agua inyectable y antes de centrifugar se dejó 5 min a TA. La purificación del DNA se verificó en un gel de agarosa al 0.8% en TBE 1×. El DNA purificado se almacenó a -20 °C.

Clonación del gen *tv-catd* en el vector PGEM-T Easy.

La ligación del DNA purificado con el vector pGEM-T Easy (Promega) se realizó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, se agregó: 5 µl de amortiguador de ligación 2×, 0.5 µl (25 ng) del vector pGEM-T Easy, 1 µl de T4 ligasa, 1.5 µl de DNA purificado (75 ng), volumen final 10 µl y se incubó toda la noche a 4°C. En condiciones de esterilidad, al día siguiente se realizó la transformación en 100 µl de células competentes "JM109" a las cuales se adicionó la reacción de ligación, se agitó suavemente y se incubó 30 min a 4°C, se dió un choque térmico a la muestra a 42 °C por 45 s, se colocó en hielo durante 3 min y a temperatura ambiente (TA) 2 min, se adicionó 900 µl de medio Luria Bertani (LB) a 37 °C, se mezcló por inversión, se pasó la muestra de ~1000 µl a un tubo Falcon de 15 ml estéril, se incubó a 37°C durante 1 h. Se preparó una caja de LB agar con ampicilina a una concentración de 100 µg/ml y se dejó gelificar, se adicionó a la superficie del agar 20 µl de Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG; stock 0.1 M) y 20 µl X-gal (stock 50 mg/ml) y se extendió con una espátula estéril. Transcurrida la hora se pasó la muestra del tubo Falcon a un tubo Eppendorff de 1.5 ml estéril, se centrifugó a 13000 rpm por 1 min, se desechó el sobrenadante, se dejó aproximadamente ~30 µl de medio LB, se resuspendió la pastilla, la suspensión bacteriana se colocó en la superficie de la caja de agar, se plaqueó la muestra, se incubó a 25°C durante 18 h. El crecimiento de colonias azules y blancas se observó y las colonias blancas se seleccionaron para realizar Minipreps.

Minipreps: Extracción de DNAp por lisis alcalina.

Para la extracción de DNA plasmídico (DNAP) se creció un cultivo bacteriano en 5 ml de medio LB con ampicilina [100 µg/ml], se incubó a 25 °C y 200 rpm durante 18 h. Transcurrido el tiempo se colocó en un tubo Eppendorf 1.5 ml estéril, 750 µl de cultivo más 250 µl de glicerol estéril al 50% se almacenó a -70°C para su preservación de la clona positiva. Por otra parte, el cultivo se colocó en tubo Eppendorff 1.5 ml estéril, se centrifugó a 13,000 rpm por 1 min, se desechó el sobrenadante, se resuspendió la pastilla celular con el medio remanente se adicionó 100 µl de solución I fría, se homogenizó con vortex, se agregó 200 µl de solución II fresca, se mezcló por inversión el tubo (no utilizar vortex), se dejó en hielo e inmediatamente se adicionó 150 µl de solución III fría, se mezcló suavemente por 10 s, se dejó en hielo por 5 min y se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 min. Posteriormente, por decantación se colocó en un tubo Eppendorf para realizar las extracciones fenólicas; 1ª Extracción 1:1 volumen fenol, se agitó con vortex, se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min, se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo; 2ª Extracción con 1 volumen de cloroformo, se homogenizó con vortex, se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min, se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo; se precipitó el DNA plasmídico con 2 volúmenes de etanol absoluto durante 20 min a -70°C o a -20°C mínimo 2 h, se centrifugó a 13,000 rpm a 4°C durante 15 min, se lavó la pastilla con etanol al 70%, se dejó secar la pastilla, se resuspendió en 40 µl de amortiguador de Tris y EDTA (TE) RNasa [20 µg/ml] y se incubó 1 h a 37°C. Para posteriores usos, el DNAP se guardó a -20°C.

Digestión del DNAP de las clonas candidatas.

El DNAP de la clona positiva 22 se trató con diferentes enzimas de restricción (New England Biolabs). Enzima *Apal* 1 µl, 1.0 µl de amortiguador 3 (10×), 1.0 µl de BSA 10×. Enzima *Ndel* 1 µl, 1.0 µl de amortiguador 4 (10×). Enzima *Xho1* µl I, 1.0 µl de amortiguador 2 (10×). A cada reacción con la enzima correspondiente se le adicionó 2 µl DNAP, se aforó a un volumen final de 10 µl con H₂O inyectable y se mezcló e incubó durante 3 h a 37°C. El resultado de la digestión se visualizó en gel de agarosa al 0.8 % con TBE 1×.

Secuenciación de DNA.

Las secuencias de DNA de las clonas positivas se realizó en el secuenciador automático 3730xL (Applied Biosystem) del laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología, UNAM.

El alineamiento de la secuencia de DNA de las clonas candidato se comparó con la región codificante del gen del genoma de *T. vaginalis* TVAG_336300. <http://trichdb.org/trichdb/>. El programa utilizado para hacer alineamiento fue nworkbench biology <http://workbench.sdsc.edu/>.

Reacción de restricción secuencial masiva con *NdeI* y *XhoI*.

A partir del Minipreps por kit (Fermentas) se adicionaron ~20 µg DNAp, 10 µl amortiguador 4 (10×), 3 µl enzima *NdeI* (New England), H₂O inyectable para un volumen final de 50 µl, se mezcló e incubó 3 h a 37°C. El DNA se precipitó con 1/10 de acetato de sodio 3 M y 2 volúmenes de etanol absoluto, se incubó 20 min a -70°C ó 2 h a -20°C, se centrifugó a 13,000 rpm 15 min, se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió con H₂O inyectable. La muestra se incubó con 5 µl de amortiguador 2 (10×), 3 µl de enzima *XhoI* (New England), H₂O inyectable para un volumen final de 50 µl, se mezcló e incubó 3 h a 37°C, se adicionó 3 µl de amortiguador de carga para DNA (BM 6×), se calentó a 65°C por 5 min para eliminar estructuras secundarias del DNAp, se separó en un gel de agarosa al 1% ó 0.8% en TBE 1× a 80V, se visualizó con luz UV y la banda de interés se cortó para su purificación.

Purificación del DNA del gen *tv-catd* y del vector pColdI.

A partir del gel de agarosa se prosiguió a hacer la purificación del fragmento de DNA con el kit "Quick Gel Extraction Pure Link" (Invitrogen), se cortó el fragmento de interés del gel de agarosa con un bisturí estéril en un transiluminador de luz ultravioleta. Los fragmentos de agarosa se colocaron en tubos Eppendorff de 1.5

ml, se agregó a cada tubo 800 μ l del amortiguador de solubilización, se incubó a 50 °C por 10 min se mezcló por inversión cada 2 o 3 min durante la incubación. Después que el gel se disolvió completamente se revisó el color de la mezcla el cual presentó un color similar al del amortiguador. Para la purificación del DNA se tomó un volumen de ~1.0 ml, se colocó en la columna de purificación del Kit (unión del DNA), se centrifugó a 13,000 rpm durante 1 min a 4 °C, se descartó el eluido, se añadió 600 μ l del amortiguador de lavado a la columna, se centrifugó a 13 000 rpm durante 2 min a 4 °C, se descartó el eluido, para eliminar el etanol residual de la columna se le dió una centrifugación adicional. Para eluir el DNA se agregó 50 μ l de agua inyectable y antes de centrifugar se dejó 5 min a temperatura ambiente. La purificación del DNA se verificó en un gel de agarosa al 0.8% en TBE 1 \times . El DNA purificado se almacenó a -20 °C.

Subclonación del gen *tv-catd* en el vector de Expresión pColdI.

La ligación se realizó con el DNA purificado con el vector pColdI (Takara) relación 1:3 (vector: inserto). En un tubo Eppendorff de 1.5 ml se agregó: 3.5 μ l de amortiguador de CurSmart 10 \times , 26.5 μ l (50 Femtos) del vector pColdI, 2.3 μ l de DNA purificado (150 Femtos), 1 μ l de T4 ligasa (400 U), volumen final 35 μ l y se incubó toda la noche a 16°C. En condiciones de esterilidad se realizó la transformación en 100 μ l de células competentes "JM109" a las cuales se le adicionó la reacción de ligación, se agitó suavemente y se incubó 30 min a 4°C, se dió un choque térmico a la muestra a 42°C por 45 s, se colocó en hielo durante 3 min y a TA 2 min, se adicionó 900 μ l de medio LB (incubado previamente en baño María), se mezcló por inversión del tubo, se pasó la muestra de ~1 ml a un tubo Falcon de 15 ml estéril, se incubó a 37°C durante 1 h. Se preparó una caja de LB agar con ampicilina a una concentración de 100 μ g/ml y se dejó gelificar, se pasó la muestra del tubo Falcon a un tubo Eppendorff de 1.5 ml estéril, se centrifugó a 13,000 rpm por 1 min, se desechó el sobrenadante, se dejó aproximadamente ~30 μ l de medio LB, se resuspendió la pastilla, la suspensión bacteriana se colocó en la superficie de la caja de agar, se plaqueó la muestra y se incubó a 25°C durante

18 h. El crecimiento de colonias se observó y se seleccionaron para realizar Minipreps.

Digestión del DNAp de las clonas candidatas.

Las clonas candidatas se trataron con la enzima *NdeI* (New England), 3 µl de DNAp, 1.0 µl de amortiguador 4 (10×), 0.5 µl de la enzima *NdeI* ó enzima *XhoI* (New England), 3 µl de DNAp, 1.0 µl de amortiguador 3 (10×), 1.0 µl de BSA (10×), 0.5 µl de la enzima *XhoI* volumen final de 10 µl de H₂O inyectable. Doble restricción secuencial primero se incubó por 3 h con una enzima después se trató con la enzima faltante por otras 3 h para finalmente observar la liberación del fragmento de interés. Como control negativo se utilizó DNAp de la clona vacía. se mezcló e incubó de la manera anterior 37°C. El resultado de la digestión se visualizó en gel de agarosa al 0.8 % con TBE 1×.

Extracción de DNAp por kit.

De un cultivo de 5 ml con ampicilina, posteriormente se procedió a extraer el DNAp tal y como lo indica el protocolo de kit Minipreps (Fermentas), se realizaron las restricciones respectivas y se enviaron a secuenciar las clonas positivas.

Inducción de la proteína recombinante Tv-CatD con IPTG.

La expresión de la proteína recombinante se hizo en células competentes BL21 (DE3) de *E. coli* a partir del glicerol clona 23 (gen *tv-catd* en el plásmido de expresión) almacenado a -70 °C, se tomó una asada para inocular en 20 ml de Medio LB con ampicilina (100 µg/ml), se incubó a 37°C por 16 h a 200 rpm, se reinocularon 20 ml del cultivo en 500 ml de Medio LB con ampicilina en matraz de 1 lt, se incubó a 37°C por 2 h a 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 a 600 nm. La Inducción de la proteína recombinante se hizo de acuerdo al manual del sistema pColdI (Takara-BIO) adicionando IPTG 1 mM a 37 °C por 20 h. El análisis de la expresión de la proteína recombinante se visualizó por electroforesis

desnaturalizante (SDS-PAGE) en geles de poliacrilamida al 10%. Las proteínas de cada una de las pastillas obtenidas de los cultivos se solubilizaron con amortiguador de muestra 1× (BM 1×) y se hirvieron por 3 min.

Para saber si la proteína recombinante es soluble, el cultivo bacteriano se centrifugó a $2,500 \times g$ para obtener una pastilla de bacterias, la cual se resuspendió con vortex por 10 min en 20 ml de amortiguador de lisis (NaCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7.5, EDTA 2 mM); los lisados se sonicaron en frío por 6 ciclos de 30 s, a velocidad constante. Después, los lisados bacterianos se centrifugaron a $30,000 \times g$ por 25 min y la pastilla obtenida, fase insoluble (cuerpos de inclusión; CI) como el sobrenadante (fase soluble) se corrieron por SDS-PAGE al 10%.

Otro método para conocer si la proteína es soluble fue a partir de ~1.5 ml de cultivo se empastilló y se resuspendió en 2.5 ml del amortiguador de solubilización (Cloruro de guanidinia (GndHCl) 6 M a pH 7.5, NaCl 0.5 M, Tris HCl 20 mM), se incubó la muestra a 37°C por 30 min a 110 rpm, se incubó en hielo por 10 min, se lisaron por sonicación 6 ciclos por 30 s a una amplitud del 40%, se centrifugó a 13,000 rpm por 20 min a 4 °C y se separaron las fracciones: sobrenadante (fracción citoplasmática soluble), pastilla (CI).

La Tv-CatD recombinante se encontró en la fase insoluble ó CI a los cuales se les hicieron 4 lavados con diferentes amortiguadores, por 1 gr de pastilla/ se resuspendió en 5 ml del amortiguador de lavado 1 pH 8 (NaCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7.5, EDTA 2 mM, PMSF 2 mM), se dejó en agitación por 10 min después se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min a 4°C, la pastilla se lavó nuevamente en 5 ml del amortiguador del lavado 2 pH 8 (GndHCl 2 M, Tris-HCl 20 mM, DTT 1 M). Nuevamente se lavaron con el amortiguador del lavado 3 pH 8 (Tris-HCl 20 mM, DTT 1 M, Triton X-114 al 1%), por último se hizo con el amortiguador del lavado 4 pH 8 (Tris-HCl 20 mM). Finalmente, la pastilla se resuspendió en el amortiguador de solubilización pH 7.5 (GndHCl 6 M, NaCl 0.5 M, Tris-HCl 20 mM) en agitación toda la noche. Al otro día, se centrifugó a 13,000

rpm la muestra y toda la fracción soluble se filtró por una membrana 0.22 μm . Posteriormente, esta fracción se pasó por una resina de níquel.

Purificación de la proteína recombinante por cromatografía de afinidad a níquel.

Una resina de níquel columna comercial Sepharosa 6 Ni (GE Healthcare) se usó mediante un método semiautomático. La columna se hidrató con agua milli Q, se equilibró con amortiguador de equilibrio pH 7.5 (Urea 8 M, NaCl 0.5 M, Tris-HCl 20 mM, imidazol 5 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, glicerol 1%) y se pasó el lisado de bacterias ya filtrado. Posteriormente, la columna se lavó con el amortiguador de lavado 1, pH 7.5 (amortiguador A: Urea 8 M, NaCl 0.5 M, Tris-HCl 20 mM, imidazol 500 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, glicerol 1%) y con el amortiguador del lavado 2, pH 7.5 amortiguador A + amortiguador B: (amortiguador B: Urea 7 M, NaCl 20 mM, Tris-HCl 20 mM, imidazol 500 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, 1% glicerol) y la proteína recombinante se eluyó con el amortiguador B.

Purificación de la proteína recombinante por cromatografía de intercambio iónico.

La muestra obtenida por cromatografía de afinidad se diluyó en una relación 1:4, se pasó por una resina "Q Sepharose Fast Flow" (GE Healthcare) de 1 ml. La resina se equilibró con amortiguador de equilibrio pH 7.5 (amortiguador A: Urea 7 M, NaCl 1M, Tris-HCl 20 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, glicerol 1%) y se pasó la muestra diluida. Posteriormente, la columna se lavó nuevamente con el amortiguador A, después se hizo un lavado con los amortiguadores A+B pH: 7.5 (amortiguador B: Urea 8 M, NaCl 20 mM, Tris-HCl 20 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, glicerol 1%); la proteína recombinante se eluyó con el amortiguador B. La proteína recombinante purificada se visualizó por SDS-PAGE al 10%.

Diálisis de la proteína recombinante Tv-CatD.

Para obtener la proteína soluble en PBS se procedió hacer la diálisis en una membrana de 0.64 mm. Primero se realizó una dilución 1:1 (muestra:amortiguador 1) para posteriormente dejar ~18 h a 4 °C en agitación la membrana en el

amortiguador 1 (Urea 4 M, NaCl 20 mM, Tris-HCl 20 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, glicerol 1%); segundo pase amortiguador 2 (2 M Urea, NaCl 20 mM, Tris-HCl 20 mM) aproximadamente 8 h; tercer pase se dejó en PBS pH 7 en agitación 12 h a 4°C . Finalmente, se recuperó la proteína recombinante, se cuantificó usando el nanodrop 2000 y se visualizó por SDS-PAGE al 10%.

Producción de anticuerpos policlonales anti-Tv-CatD en ratón y conejo.

Para producir anticuerpos policlonales contra Tv-CatD recombinante se inmunizaron dos especies de animales, ratón y conejo. Un conejo macho de 6 semanas de edad. El suero preinmune control se obtuvo antes de inmunizar al conejo. Se hicieron tres inmunizaciones cada dos semanas por vía intramuscular con 300 μ g de proteína recombinante en adyuvante TiterMax Gold® (Sigma), respetando un la relación por cada 100 μ g de proteína: 40 μ l del adyuvante en un volumen total de ~1.2 ml. La reactividad de los sueros entre las inmunizaciones se analizó por ensayos de WB hasta alcanzar el título adecuado. El anticuerpo se almacenó en alícuotas de 500 μ l con azida de sodio al 0.1%.

Inmunización en ratones: 10 ratones Balb/c machos de 4 semanas. El suero preinmune control se obtuvo antes de inmunizar a los ratones. Se realizaron 3 inmunizaciones cada 15 días por vía intravenosa ~50 μ g de proteína recombinante por ratón en adyuvante TiterMax Gold® (Sigma). La reactividad de los sueros entre las inmunizaciones se revisó por ensayos de WB cada 15 días hasta alcanzar el título adecuado. El anticuerpo se almacenó en alícuotas de 200 μ l con Azida de Sodio al 0.1%.

	Especie Ratón	Especie Conejo
Emulsión de Inmunización 100 μ g:40 μ l (depende del antígeno)	Adyuvante Titer Max gold	
Sitio de administración	Subcutánea	Intramuscular
Primer sangrado	Después de 15 días de inmunización.	Después de 15 días de inmunización.

Segundo sangrado	Después de 15 días de inmunización.	Después de 15 días de inmunización.
Tercer sangrado	Después de 15 días de inmunización.	Después de 15 días de inmunización.
Sangrado a muerte	1.5 meses.	1.5 meses.

Extracción de Proteína Total de *T.vaginalis* por precipitación con ácido tricloroacético (TCA al 10%).

Parásitos en fase logarítmica de crecimiento, se cultivaron en las tres condiciones de glucosa, se lavaron tres veces con PBS frío pH 7.0, se resuspendieron 20×10^6 parásitos en 0.9 ml de PBS frío pH 7.0 y 0.1 ml de TCA al 100%, se mezcló bien y se incubó 18 h a 4 °C. Posteriormente, la muestra se centrifugó a aproximadamente 13,000 rpm por 5 min a 4 °C en microcentrífuga y las pastillas se lavaron cinco veces con PBS frío pH 7.0 centrifugando a 13,000 rpm por 5 min a 4 °C. Las paredes del tubo se secaron con un hisopo estéril entre cada lavado. La pastilla se resuspendió en 300 μ l de amortiguador de Muestra 1 \times (BM 1 \times), se hirvió, se centrifugó a 13,000 rpm /3 min y se cargó ~80 μ g de proteínas de cada condición en minigeles de poliacrilamida al 10%. Las proteínas separadas se transfirieron a membranas de NC de 0.45 μ m (BIO-RAD®).

Obtención de extractos resistente a proteasas de *T. vaginalis* con desoxicolato de sodio (DOC).

Parásitos en fase logarítmica de crecimiento cultivados en las tres condiciones de glucosa se lavaron tres veces con PBS frío pH 7, se resuspendieron 20×10^6 parásitos en 0.5 ml de PBS frío pH 8.0, se le adicionó 50 μ l de DOC al 10% (concentración final 0.5%), se incubó 20 min a temperatura ambiente y se le agregó 150 μ l de PBS pH 8.0, mezclando bien. El lisado se colocó sobre un colchón de sacarosa al 10% en PBS pH 8.0 con rojo de fenol, se centrifugó a

13,000 x rpm por 30 min, se recuperó el sobrenadante (extracto resistente a proteasas; PREs) y se colocó BM 2x en relación 1:1, se hirvió por 5 min y se cargaron ~80 µg de proteína de cada condición en minigeles de poliacrilamida al 10%. Las proteínas separadas se transfirieron a membranas de NC de 0.45 µm. Para el caso de los ensayos de actividad se recuperó el sobrenadante y se mantuvieron en hielo hasta usar.

Electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa.

Preparación de la cámara de electrotransferencia: en una charola se colocó amortiguador de transferencia donde se preparó la cámara húmeda (evitando dejar burbujas) en el siguiente orden: lado oscuro de la unidad de transferencia, esponja, papel filtro Whatman® No. 3, gel de poliacrilamida a ser transferido (colocando los marcadores del lado derecho), membrana de NC de 0.45 µm, papel filtro Whatman® No. 3, esponja y lado transparente de la unidad de transferencia. Enseguida, se colocó el lado negro de la unidad de transferencia coincidiendo con la cara negra de la cámara de transferencia, las cuales se colocaron en el tanque de transferencia junto con la unidad de enfriamiento. La transferencia se realizó en agitación suave en frío a 100 volts durante 1 h.

Posteriormente, se verificó la transferencia de las proteínas en las membranas al teñir con solución de rojo de Ponceau al 100% y se destiñeron con PBS-Tween 0.1 % pH 7.0; después, las membranas se bloquearon con leche al 10% en PBS-Tween 20 al 0.1% toda la noche en agitación suave a 4°C.

Ensayos de Western Blot.

Las membranas transferidas y previamente bloqueadas se lavaron cinco veces con PBS-Tween 20 al 0.1% en agitación durante 10 min (por lavado) a TA. A continuación, se incubaron toda la noche en agitación suave a 4°C con el anticuerpo primario anti-Tv-CatD de ratón dilución 1:100 en PBS-Tween 20 al 0.1%, leche al 2.5% toda la noche en agitación suave a 4°C. Como controles se usaron los anticuerpos primarios anti-Eh Hexoquinasa de Conejo (1:1000) y anti-

Tv-CP4 de Conejo (1:200). Las membranas se lavaron cinco veces con PBS-Tween 20 al 0.1% en agitación durante 10 min a TA; se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (HRPO) diluido 1:3000 (ZYMED®) en PBS-Tween 20 al 0.1%, leche al 2.5% durante 2:5 h a TA con agitación suave. Las membranas se lavaron cinco veces con PBS-Tween 20 al 0.1% en agitación durante 10 min a TA y se revelaron con el método de la peroxidasa por quimioluminiscencia, con el kit de revelado Thermo Scientific® (Amersham Pharmacia, Biotech UK) acorde a lo recomendado por el fabricante. Brevemente, se mezclaron las soluciones A+B en una relación 1:1, se cubrieron con acetato y se revelaron en el fotodocumentador Chemidoc-XR Bio-Rad®. El revelado para Tv-CatD se realizó por color y las membranas se sumergieron por 5 min a TA en la solución de revelado que contiene 7.5 mg de 4-cloro-naftol (sustrato para HRPO) (BIO-RAD®), 2.5 ml de metanol frío, 12.5 ml de TBS (apéndice) y 7.5 µl de peróxido de hidrógeno al 30%.

Electroforesis bidimensional (2 DE).

Para el isoelectroenfoco, 60×10^6 parásitos cultivados en baja (≤ 1 mM) y alta Glucosa (50 mM), en el último lavado se eliminaron los restos de PBS pH 7 mediante centrifugación a 5,000 rpm/10 min y cuidadosamente se retiró el PBS, la pastilla se resuspendió en 150 µl de amortiguador de isoelectroenfoco (IEF) (Bio-Rad) se incubó 20 min a TA para realizar lisis por agitación, se centrifugó por 20 min a $13,000 \times g$ para eliminar los restos celulares. El sobrenadante de cada una de las muestras se cargó en la celda del equipo Protean IEF cell (Bio-Rad) para la primera dimensión se utilizaron tiras de isoelectroenfoco con un gradiente lineal de pH inmovilizado (ReadyStrip IPG strip pH 4-7, Bio-Rad). La rehidratación de las tiras con cada una de las muestras se realizó por hidratación activa a 20°C durante 16 h a 50 volts. La primera dimensión se realizó de acuerdo al manual ReadyPrep 2-D starter kit. Paso 1, se corrió a 250 volts por 20 min; paso 2, se

corrió a 4,000 por 3 h y en el paso 3 se corrió de 4,000 hasta alcanzar los 10,000 volts/h (Ramón-Luing y col., 2010; Rendón-Gandarilla y col., 2013). Una vez terminada la corrida, los geles se utilizaron inmediatamente para realizar la segunda dimensión (2-DE) en minigeles preparativos de poliacrilamida de 7 cm de ancho x 8 cm de largo y de 1.0 mm de espesor, a una concentración del 10% de poliacrilamida. La muestra se preparó antes de cargar el gel como sigue: A la muestra se le agregó el amortiguador de equilibrio I (urea 6M, SDS 2%, Tris-HCl 0.375M, pH 8.8, glicerol 20% y DTT 2%; Bio-Rad). Amortiguador de equilibrio II (urea 6M, SDS 2%, Tris-HCl 0.375M, pH 8.8, glicerol 20% y iodoacetamida 2.5%; Bio-Rad) por 10 min en agitación suave, se decantó y las tiras se colocaron en un tubo con amortiguador de corrida 1× (Tris-Glicina-SDS) (Ramón-Luing y col., 2010), se calentó la solución de “overlay” agarosa de bajo punto de fusión al 0.5% (Sigma 2-D) en horno de microondas para disolverla y utilizarla para inmovilizar las tiras dentro del gel. Para el caso de las muestra de zimogramas a la solución de Equilibrio II no se adicionó iodoacetamida. Los geles se corrieron a 100 volts constante por ~1 h. Se procesaron tres tiras. 1. Tinción con Plata. 2. Transferencia a membrana de NC de 0.45 µm para WB. 3. Zimograma después del isoelectroenfoco, las tiras se corrieron en geles preparativos de poliacrilamida al 10% copolimerizados con Hb al 0.3% y se activó por ~60 h a 37 °C en agitación suave.

Tinción con Plata.

El gel de poliacrilamida se incubó con la solución de fijación (30% de etanol, 10 % Ácido acético) toda la noche a 4°C, se realizaron tres lavados de 30 min, se adicionó etanol al 20%, se enjuagó 10 min con agua bidestilada, se adicionó la solución de sensibilización (Tiosulfato de sodio 2 g/l) por 1 min, se hicieron dos lavado con agua bidestilada de 20 s, se tiñó con la solución de plata (Nitrato de plata 2g/L), se enjuagó nuevamente con agua 5-10 s, se adicionó la solución reveladora (Formaldehído 37%, Carbonato de Potasio 30 g/l, Tiosulfato de Sodio 10 mg/l) y se observó la aparición de puntos, finalmente se adicionó la solución de

paro (Tris-base 50 g/l, 2.5% ácido acético). El gel se almacenó en agua bidestilada.

Ensayos de actividad usando un sustrato específico fluorogénico.

Para determinar la actividad de Tv-CatD se usó un sustrato fluorogénico específico para CatD (Yasuda y col., 1999) "7-Methoxycoumarin-4-Acetyl-Gly-Lys-Pro-Ile-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Lys(DNP)-DArg-amide" (Sigma) y PREs se cuantificó la concentración de proteínas obtenidas [100 µg], se mantuvieron en hielo hasta su uso (~10 min). Los reactivos a utilizar se incubaron a 37°C ya que eso nos permitió obtener una lectura óptima. En una placa de 96 pozos con fondo oscuro (Thermo Scientific), se adicionaron los reactivos de reacción: 60 µl de amortiguador de acetatos 50 mM a pH 4.5, sustrato fluorogénico [20 µM] a partir del stock 1000 µM, se adicionó 100 µg de PREs. Como control se usó una reacción sin extracto resistente a proteasas; se hizo por triplicado de cada muestra. Longitud de onda de lectura: Excitación 328 nm, Emisión 393 nm. Tiempo de lectura fue cada 10 s durante 2 min en el espectrofluorómetro (SpectraMax® Gemini EM; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

La actividad de Tv-CatD se probó a varios pH (3.5, 4.5, 5.5, 6.5, and 7.0). Las reacciones de los extractos resistente a proteasas se incubaron con acetato de sodio (pH 3.5-5.5) ó fosfato de sodio (pH 6.5-7.0) (Yasuda y col., 1999). Para estos experimentos 1 unidad de enzima se determinó en función del tiempo por 1 min, la actividad de la enzima fue estimada por la pendiente máxima de unidades relativas de fluorescencia (RFU) vs Tiempo se hizo por triplicado. La actividad específica de la enzima se definió como: RFU/(Min * µg del PREs). Para los ensayos de inhibición usamos dos inhibidores de APs (Kay, 1985): Pepstatina A (Sigma) a las concentraciones de 0, 40, 80 y 160 µM, DAN (Diazoacetil DL-norleucina metil ester) (Santa Cruz) a la concentración de 1 mM en presencia de sulfato de cobre (Merck) 1 mM (Rajagopalan y col., 1966) y como control una reacción sin Cu²⁺.

Ensayo de inhibición en presencia el sulfato de cobre (CuSO_4) a diferentes concentraciones (0.5, 1.0, 5.0, and 10 mM), el CuSO_4 se resuspendió en H_2O , se adicionó a la reacción e inmediatamente se hicieron las lecturas. La actividad sin Cu^{2+} se tomó como el 100% condición de ≤ 1 mM y 50 mM de glucosa. Este ensayo se hizo a pH 4.5 por duplicado de manera independiente con resultados similares.

Zimogramas 1 y 2-DE copolimerizados.

Preparación del gel sustrato utilizando gelatina al 0.2 %, se pesaron 0.0036 gr de gelatina (BioRad) para un gel al 10%. Para el caso del gel sustrato de hemoglobina humana (sigma) se pesó 0.03 gr para la concentración de trabajo de 0.3 % ambos sustratos se disolvieron en 10 mL de H_2O y se sustituyó en el gel separador de Poliacrilamida con SDS el agua por la solución de gelatina ó Hb.

Las proteínas separadas en los geles de sustratos de SDS-PAGE se renaturalizaron al incubar con Tritón X-100 al 0.2 % por 30 min a TA, se retiró la solución y se añadió el amortiguador de acetatos al 1 M pH 4.5 con β -mercaptoetanol al 1%, se incubó por 24 ó 60 h a 37°C , se retiró la solución y se colocó la solución colorante de azul de Coomassie (CBB) R-250 ~18 h y, se destiñó el gel hasta observar la aparición de manchas claras contra un fondo oscuro.

A partir de la obtención de los extractos de 20×10^6 se adicionó Pepstatina A a 100 μl por reacción a diferentes concentraciones y se incubaron por 20 min a 37°C . Posteriormente, las muestras se corrieron en geles copolimerizados con gelatina al 0.2 % (Bio-Rad) o hemoglobina al 0.3 % (Sigma), ambos sustratos disueltos en agua destilada. Los geles se activaron por ~18 h a 37°C , transcurrido el tiempo se retiró la solución y se colocó la solución colorante CBB. Como control negativo se adición solo el vehículo DMSO. Para geles de 2-DE se incubaron a la concentración de 1 mM por ~60 hr. El sulfato de cobre se adicionó durante la activación a la concentración de 1 mM, se incubaron por ~60 h se hicieron recambios cada ~18 hr. Como control negativo no se adicionó Cu^{2+} .

Ensayo de inmunofluorescencia indirecta.

Los parásitos se cultivaron sobre cubreobjetos en placas estériles de 6 pozos en un volumen de 5 ml y se incubaron a 37°C/20 h, se recuperaron los cubreobjetos con los parásitos adheridos, se lavaron 3× sumergiendo las laminillas en PBS pH 7 para eliminar los parásitos no adheridos. Los parásitos sobre las laminillas se fijaron con paraformaldehído 2% en PBS (preparado al momento) el cual genera una permeabilización parcial (Miranda-Ozuna y col., 2016) durante 30 min a TA y las laminillas se lavaron 5× con PBS pH 7 (1 ml por laminilla) a TA. Los parásitos se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.07 % durante 10 min, se lavaron 5× con PBS-BSA al 1% (1 ml cada vez) a TA, se bloquearon con 1 ml de PBS-Glicina 0.5 M por 1 h a temperatura ambiente, se lavaron 3× con PBS-Glicina 0.5 M (1 ml cada vez) y se bloquearon con 1 ml de PBS-Suero fetal bovino al 1% durante 15 min a TA, se lavaron 5× con PBS pH 7 filtrado (1 ml cada vez) y se incubaron con el anticuerpo primario anti-Tv-CatDr de ratón (Dil. 1:40 en PBS pH 7) en cámara húmeda (tapa de la placa de 6 pozos con algodón humedecido), donde la cara con los parásitos de cada laminilla se colocó sobre un volumen 20 µl del anticuerpo anti-Tv-CatDr. Las cámaras se sellaron con papel parafilm y se incubaron a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, las laminillas se transfirieron de nuevo a las cajas de 6 pozos y se lavaron 5× con PBS pH 7 para eliminar el exceso de anticuerpo primario y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a FITC (Thermo Scientific No 31569) (Dil. 1:100 en PBS pH 7) durante 2 h cubierto de la luz en cámara húmeda como se mencionó en el paso anterior, donde la cara con los parásitos de cada laminilla se colocó sobre un volumen de 20 µl del anticuerpo secundario, se transfirieron nuevamente a las placas de 6 pozos y se lavaron 5× con PBS pH 7 (1 ml por pozo) a temperatura ambiente para eliminar el exceso de anticuerpo no unido. Por último, los parásitos se incubaron con DIL para teñir los fosfolípidos de la membrana (dilución 1:1000 en agua mili Q filtrada) durante 1 h a temperatura ambiente, se lavaron 5× con PBS pH 7 (1 ml por lavado) y se procedió al montaje de las laminillas en portaobjetos con 7 µl de

Vectashield con DAPI y se sellaron las orillas de las laminillas con barniz de uñas transparente. Las laminillas se analizaron por microscopía confocal (Zeiss).

Marcaje con LisoTracker: Los parásitos se crecieron en las dos condiciones de glucosa, se procedió a trabajar con $\sim 5 \times 10^5$, se lavaron 3 veces con PBS pH 7, se resuspendió en 500 μ l del amortiguador 1 \times del kit "CYTO-ID Autophagy Detection" (Enzo Life Sciences Inc. Switzerland) para la tinción de lisosomas se adicionó LysoTracker Red DND-99 (Invitrogen) 2 μ M, se incubaron durante 30 min a 37°C en agitación muy suave cubierto de la luz, después los parásitos se lavaron 3 veces con el amortiguador 1 \times previamente mencionado, se fijaron con Formaldehído al 4% durante 10 min a TA, se lavaron 2 veces con NH₄Cl 20 mM en PBS, se lavaron 2 veces con BSA 0.2% en PBS, se incubó con el anticuerpo anti-Tv-CatD dilución 1:40 resuspendido en PBS-BSA durante de 2 h, se hicieron 5 lavados con BSA-PBS, se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a FITC dilución 1:100 resuspendido en PBS-BSA durante de 2 h y se procedió al montaje de las laminillas.

Ensayo de secreción *in vitro*.

El ensayo de secreción fue similar al reportado por Hernández-Gutiérrez y col., 2004. Después de 20 h de crecimiento en las diferentes concentraciones de glucosa, 25×10^6 parásitos se recolectaron, se lavaron tres veces con PBS 1 \times y se resuspendieron en 5 ml de PBS/glucosa (25 ó 50 mM, para el caso de RG no se adicionó glucosa) a una densidad de 1×10^6 parásitos/ml. Los parásitos se incubaron por 1 h a 37 °C, la viabilidad de los parásitos se comprobó por exclusión con azul de tripano. Los parásitos se recolectaron por centrifugación a 1,800 rpm/ 5 min y el sobrenadante (Productos de Secreción; PS) se precipitó por TCA a 10% toda la noche a 4°C, así como una fracción de parásitos antes y después de secretar, se centrifugó a 2,800 rpm por 15 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y la pastilla se lavó tres veces con acetona fría y se centrifugó cada lavado a 13,000 rpm/5 min a 4 °C. El precipitado se resuspendió en amortiguador de

muestra 1× y se hirvió 5 min. Las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida al 10%, duplicados de estos geles se transfirieron a membrana de NC de 0.45 μm y se retaron con los anticuerpos anti-Tv-CatDr (Dil. 1:100), anti-TvCP4 (Dil. 1:2000) como control positivo y anti-EhHk (Dil.1: 1000) como control negativo.

Para el caso de los geles en 2-DE se pusieron a secretar 60×10^6 de parásitos en la condición ≤ 1 mM de glucosa se continuó con el procesamiento de la muestra en 2-DE.

VII._RESULTADOS

Análisis *in silico* de los genes APs en *T. vaginalis*.

El genoma de *T. vaginalis* tiene seis genes que codifican para aspártico proteasas, por lo que se hizo la búsqueda de las secuencias en la base de datos del genoma de *T. vaginalis* de lo reportado en los transcriptomas y ESTs (“Expressed sequence tag”). Dos genes de APs están ubicados en el Clan AA; familia A1 corresponde al gen tipo catepsina D (Tv-CatD) con el TVAG_336300 y familia A2 para el gen retropepsina (retrotransposon nombrado en el genoma) con TVAG_459080. Los otros cuatro genes pertenecen al clan AD que codifican para la familia presenilina (Cuadro 6).

En la búsqueda de los genes APs en los transcriptomas reportados en *T. vaginalis* encontramos en el transcriptoma de glucosa por Huang y col., 2014 que el gen que mayor se expresa es *tv-catd* comparado con los otros (Cuadro 6). Además, los ESTs de las condiciones experimentales estudiadas como parásitos no normalizados, trofozoitos en la fase log (TvE), cultivo no sincronizado (TvEST), trofozoitos fase G2/M (TvG2M), cultivos en bajo hierro (TvLI), cultivos en baja glucosa (TvLG), citoadherencia en contacto con las células epiteliales vaginales (TvVEC) mostraron que *tv-catd* presenta un mayor número ráfica 2). Estos análisis muestran que una de las condiciones que podría estar regulando la expresión del

gen *tv-catd* es la glucosa así como las otras condiciones estudiadas para los ESTs.

Cuadro 6. Análisis del transcriptoma y ESTs de APs.

Gráfica 2. Condiciones experimentales de ESTs para Tv-CatD. 28 ESTs reportados en el genoma de *T. vaginalis* en las siete condiciones experimentales como trofozoitos en la fase log (TvE), cultivo no sincronizado (TvEST), trofozoitos fase G2/M (TvG2M), cultivos en bajo hierro (TvLI), cultivos en baja glucosa (TvLG), citoadherencia en contacto con las células epiteliales vaginales (TvVEC). Cada barra muestra el número de ESTs reportados para cada condición.

Alineamiento múltiple de secuencias de proteasas de tipo Aspártico (APs) en *T. vaginalis*.

Los pesos moleculares de las APs de *T. vaginales* varían entre 50 y 28 kDa y los puntos isoeléctricos entre básicos y ácidos (Cuadro 7). El análisis comparativo de los aa de las APs distribuidas en los clanes AA y AD predijo una identidad de ~18% de las otras APs con respecto a la Tv-CatD. El sitio catalítico muestra cambios entre los residuos que rodean el ácido aspártico (D) catalítico. Un

^a **Cuadro 7.** Comparación de las secuencias de aa de las APs de *T. vaginalis*.

Figura 8. Alineamiento múltiple de las secuencias de APs de *T. vaginalis*.

Secuencias de aa de las APs identificadas en el genoma de *T. vaginalis*: TVAG_026700, TVAG_428310, TVAG_412920, TVAG_074490 corresponden a las presenilinas; TVAG_336300 para Tv-CatD y TVAG_459080 para retropepsina. Sitios catalíticos de Tv-CatD respecto a las 5 APs (cuadro rojo).

Construcción del árbol filogenético a partir de secuencias de aminoácidos diferentes de CatDs con Tv-CatD.

Análisis filogenético de Tv-CatD con otras CatDs de *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Drosophila melanogaster*, *Aedes aegypti*, *Schistosoma mansoni*, *Dictyostelium discoideum*, *Plasmodium falciparum* (plasmepsina II) y la Pepsina A de *Homo sapiens* (Figura 9). Esto nos muestra que estas proteínas comparten el mismo ancestro en común, además se observa como la rama principal se subdivide en dos raíces partiendo del mismo nodo, agrupando las secuencias de CatDs y el separando la secuencia de Pepsina A. Además, observamos que Tv-CatD tiene una relación muy cercana con *P. falciparum* y *D. discoideum*.

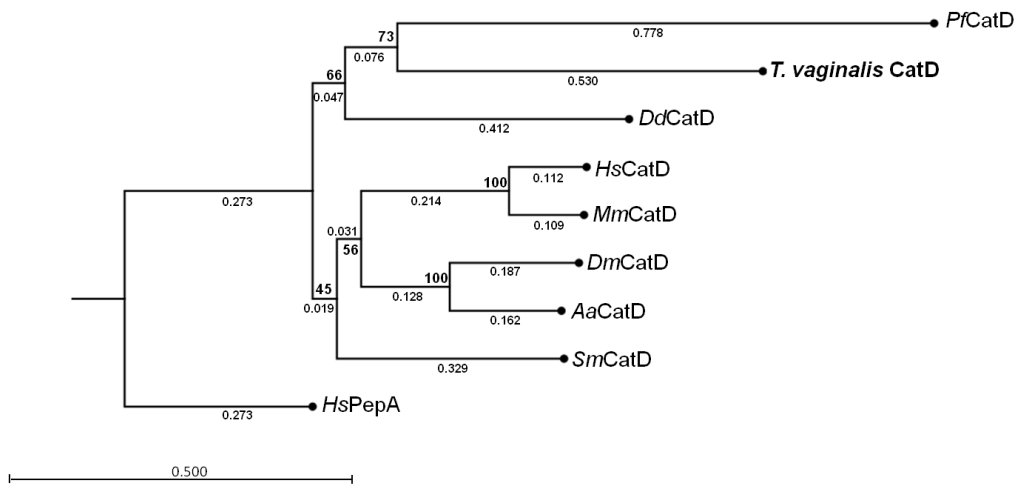


Figura 9. Relación filogenética con la CatD de otros organismos de Tv-CatD.

Relación evolutiva de Tv-CatD con catepsinas D (CatDs) de otros organismos a partir del alineamiento múltiple de secuencias de aa. *Hs*: *Homo sapiens* (P07339.1); *Ms*: *Mus musculus* (P18242.1); *Dm*: *Drosophila melanogaster* (NP 001334714); *Ae*: *Aedes aegypti* (Q03168.1); *Sm*: *Schistosoma mansoni* (XP_018651075.1); *Dd*: *Dictyostelium discoideum* (XP_641645.1); *Pf*: *Plasmodium falciparum* (P46925.1, plasmepsin II) y Pepsina A *Homo sapiens* (NP_055039.1; HsPepA). El número sobre cada rama representa el valor del análisis “bootstrap” de 100 réplicas. Software CL Main workbench.

Análisis in silico del gen tv-catd.

El gen *tv-catd* con el TVAG_336300 tiene un marco de lectura de 1113 pb ubicado en el contig DS113816 con dirección opuesta 3' a 5', localizado entre 17570 – 18725 sin intrones. Los genes vecinos río arriba y río abajo del gen *tv-catd* son TVAG_336310 y TVAG_336290 (proteínas hipotéticas) y TVAG_336320 (proteína hidroxilamina reductasa) TVAG_336280 (Lys-tRNA:RNA de transferencia de Lisina), respectivamente (Fig. 10).

El análisis *in silico* mostró que el gen *tv-catd* es único en el genoma. Una vez localizado en el contig ubicamos los codones de inicio y paro de la traducción, delimitando las regiones intergénicas (RI). La RI 5' tiene un tamaño de 1636 nt; de los cuales se tomaron 70 nt río arriba del ATG para la búsqueda de las secuencias consenso para la maquinaria de transcripción basal reportada (Fig. 9). En esta región se encontró dos posibles elementos Inr que contienen el Sitio de Inicio de la Transcripción (TSS, +1). El primer elemento Inr TAATT más cercano se encontró entre 7-11 nt río arriba del ATG; el segundo elemento TCAAT está entre 48-52 nt río arriba y un motivo 3 (M3), AACCGTTT, se encuentra entre 21-28 nt río arriba del ATG.

Probables elementos ó motivos involucrados en la señal de poliadenilación en la región 3' reguladora del gen tv-catd

En *T. vaginalis* se han descrito tres motivos involucrados en el mecanismo de poliadenilación en la región 3' río abajo del codón de paro TAA (Espinoza y col., 2002; Fuentes y col., 2012). La RI 3' es de 637 nt del gen *tv-catd*; en los primeros 70 nt de la RI, se identificaron los posibles sitios reguladores de la poliadenilación:

1. Señal de poliadenilación (PS) caracterizada por el tetranucleótido UAAA (en algunos casos puede incluir el codón de paro) localizado entre 11 y 30 nt río arriba del sitio de corte (CS). Para el gen *tv-catd* la PS está en 5 a 8 nt río abajo del codón de paro y a 24-27 nt del posible CS.
2. La secuencia de corte para poliadenilación, Py (A)₀₋₃ AAUU, en el gen *tv-catd* se localizó 32-37 nt del codón de

paro con la secuencia CAATT. 3. El elemento río abajo “DSE”, una secuencia con repetidos U or GU localizado dentro de los primeros 30 nt río abajo del sitio de corte. En el gen *tv-catd* se localizó la secuencia putativa rica en TTTTTTT, 9 nt río abajo del sitio de corte (Figura 10) (Espinosa y col., 2002; Fuentes y col., 2012).

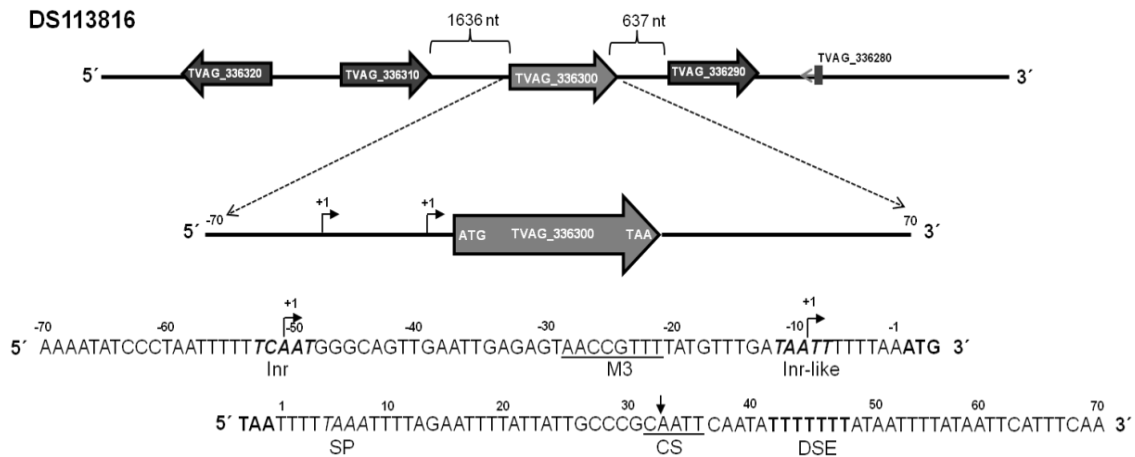


Figura 10. Elementos reguladores de la región 5' y 3' de la secuencia genómica gen *tv-catd* de *T. vaginalis*. Ubicación del contig DS113816 del TVAG_336300 se encuentra en dirección opuesta 3' a 5'. El tamaño de las RI 5' y 3' es de 1636 nt y 637 nt, respectivamente. La región 5' río arriba contiene dos posibles elementos promotores de inicio (Inr) de *T. vaginalis* (negrita cursiva, flecha (+1)) indican el sitio putativo de inicio de la transcripción (TSS). Los codones de inicio (ATG) y paro (TAA) están indicados (negrita). Secuencia del motivo M3 (subrayado). La región 3' río abajo del codón de paro TAA presenta una señal putativa de poliadenilación. Señal de poliadenilación (PS) secuencia TAAA no incluye el codón de paro, posible secuencia del sitio de corte Py (A)₀₋₃ AAUU (CS; subrayado) y la secuencia río abajo rica en U (DSE; negritas). Las líneas que flanquean la flecha con el TVAG_336300 representan 70 nt.

Análisis in silico de la proteína Tv-CatD.

El transcrito del gen *tv-catd* tiene un tamaño de 1113 nt que se traduce a una proteína precursora de 370 aa con un peso molecular hipotético de ~41 kDa, Tv-CatD. Esta proteasa pertenece a la familia A1 de las aspártico proteasas, del clan

AA. Tv-CatD no presenta un péptido señal consenso descrito para eucariontes, pero tiene un propéptido de 56 aa. Al madurar para activarse pierde la región del propéptido (56 aa) y se genera una proteína madura de ~35 kDa. Iniciando con el residuo Q, a partir de este residuo se asignó la numeración a los aa de la región madura. Tv-CatD presenta algunas similitudes y diferencias con una CatD típica de humano (hCatD). Algunas de las similitudes son: I) Los residuos Asp catalíticos. II) ocho residuos Cys. III) región flap y IV) Dos residuos de Asn para N- glicosilación (Figura 11) (Baldwin y col., 1993; Davies, 1990; Szecsi y Scand, 1992).

Los residuos Asp catalíticos esenciales para la actividad proteolítica se encuentran conservados en las secuencias DTGS y D-T/S-G-S/T en los dominios N-terminal y C-terminal (Baldwin y col., 1993; Davies, 1990; Szecsi y Scand, 1992) estos se encuentran conservados pero en diferente posición Asp-20 y Asp-205 comparadas con las posiciones Asp-33 y Asp-231 de hCatD. Además, ocho residuos de Cys, dos residuos en la posición Cys-27 y Cys-96 presentes en hCatD forman un puente disulfuro para Tv-CatD se encuentra presentes en una posición similar Cys-18 y Cys-68. Sin embargo, ambas proteínas comparten seis Cys adicionales en posiciones similares para hCatD (Cys-46, Cys-53, Cys-222, Cys-226, Cys-265 y Cys-302 y para Tv-CatD Cys-33, Cys-38, Cys-194, Cys-200, Cys-231 y Cys-268 (Figura 11).

La región "Flap" o estructura "β-hairpin" en hCatD comprende los aa 140-155, Tv-CatD presenta una secuencia similar de la posición 57-72, la cual se propone que posiblemente sufre un cambio conformacional al interactuar con el sustrato. La región de tres Pro continuas únicas en hCatD en la posición 312-314, en Tv-CatD se encontró sólo una Pro- en la posición 279 (hCatD 313). La región de reconocimiento de Fosfotransferasa compuesta por la Lys-203 y los residuos 265-292 (numeración de hCatD), Tv-CatD presenta la Lys-173 cercana en la posición de la de humano y 10 residuos conservados de la región (Metcalf y Fusek, 1993; Baldwin y col., 1993). Tv-CatD podría presentar modificaciones post-traduccionales: dos señales de N-glicosilación en la posición Asn-114 y Asn-237, cinco sitios de fosforilación en residuos de Ser (Figura 11); sin embargo, no se

encontraron posibles modificaciones lipídicas como: palmitoilación, miristilación, o sumoilación.

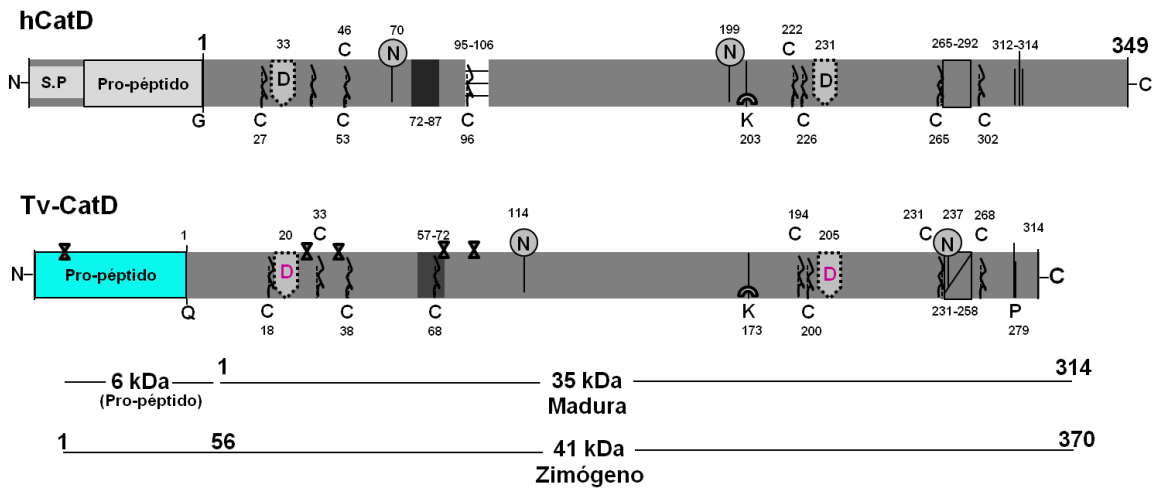


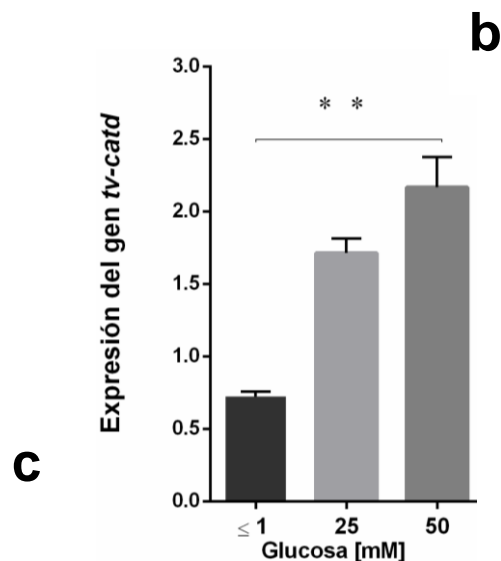
Figura 11. Análisis *in silico* de la secuencia de aa de la proteína Tv-CatD. El análisis de Tv-CatD a nivel de secuencia de aa predice una proteína de 370 aa. Propeptido de 56 aa (cuadro gris claro; peso molecular ~6 kDa) y la secuencia de la proteasa madura (cuadro gris oscuro; peso molecular ~35 kDa). Residuos catalíticos aspárticos posición 20 y 206 (D; cuadro gris en forma de flecha con contorno punteado). Región Flap 57-72 (cuadro de gris oscuro con línea). Sitios de N-glicosilación 114 y 237 (N; Círculo gris con una línea vertical). Residuo de Lisina 173 (K; medio círculo color gris oscuro con una línea vertical). Región de reconocimiento de la fosfotransferasa 231 y 258 (cuadro enmarcado negro con línea perpendicular). Residuo de prolina 279 (P; dos líneas verticales). Residuos de Cisteína (posición: 18, 33, 38, 68, 194, 200, 231, 268 (línea curva)). Así como 5 posibles sitios de fosforilación. La secuencia de Tv-CatD se comparó con hCatD.

Expresión del gen tv-catd en las tres condiciones de glucosa.

Para conocer la regulación de la expresión a nivel de transcrito del gen *tv-catd* por glucosa los parásitos se crecieron en las tres condiciones de glucosa (≤ 1 , 25 y 50 mM), se hizo la extracción de RNA, la síntesis cDNA, para ensayos de RT-PCR

tiempo final y cuantitativo (tiempo real). Como gen control usamos el gen de *β-tubulina* con un fragmento de ~112 pb que no muestra cambios en las tres condiciones analizadas (Figura. 12a; carriles 1 al 3). En el ensayo de RT-PCR semicuantitativo, los resultados de densitometría de las bandas mostraron que existe un incremento significativo del transcrito *tv-catd* (fragmento ~180 pb) en parásitos crecidos en alta glucosa, (Figura. 12a; carriles 1 al 3) y estas diferencias fueron significativas. Como control positivo de amplificación para ambos genes usamos DNA genómico observándose los amplicones de *tv-catd* y *β-tubulina*, respectivamente. Además incluimos controles negativos como el RNA tratado con DNAsa, asegurando de esta manera que no hay restos de DNA genómico en el RNA. También, incluimos un control al cual no se le adicionó DNA (Figura. 12a). Flechas indican los tamaños mencionados en pares de bases (pb). Para corroborar este resultado se realizó un ensayo de PCR en tiempo real (qRT-PCR) utilizando los oligonucleótidos diseñados para este ensayo, obteniendo como resultado que la expresión del gen *tv-catd* fue de 2 veces más en la condición alta glucosa comparándola con la condición baja glucosa (Figura 12c). Los niveles de expresión de *tv-catd* en ≤ 1 mM (barra negra), 25 mM (barra gris) y 50 mM (barra gris oscura) (Figura 12b y 10c). El análisis estadístico muestra que las diferencias observadas entre los amplicones tuvieron un valor significativo $P < 0.05$ (señalado en *). La desviación estándar (DS) entre las réplicas de los experimentos hechos de manera independiente. Estos resultados nos muestran que la glucosa regula positivamente la expresión del transcrito *tv-catd*.

a



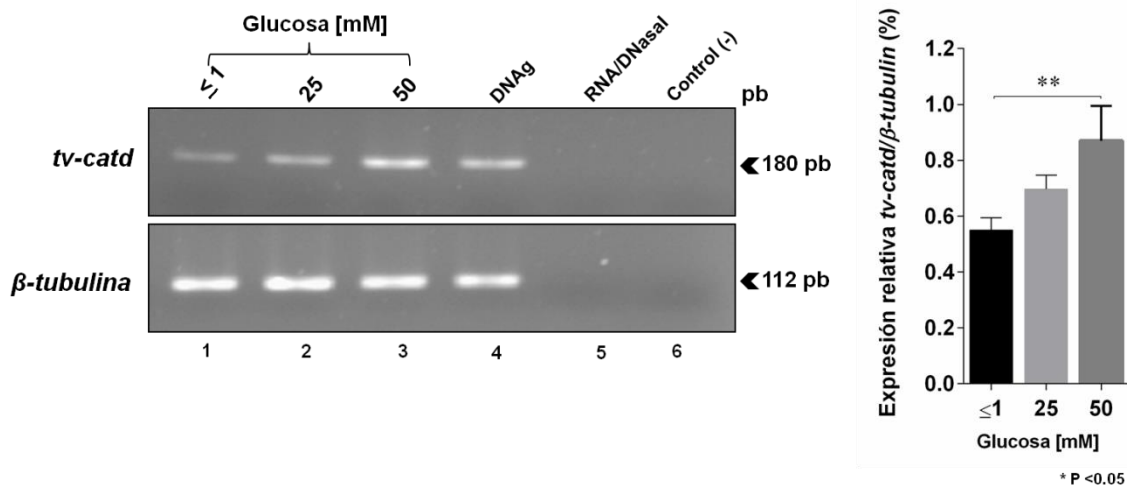


Figura 12. La expresión del gen *tv-catd* es regulada positivamente por glucosa. Mediante ensayos de RT-PCR semicuantitativa, a partir de cDNA de *T. vaginalis* de parásitos del aislado CNCD 188 crecidos en las tres condiciones de glucosa se amplificó un fragmento de ~180 pb de la región codificante usando oligonucleótidos específicos. (A) Expresión del gen *tv-catd* en diferentes concentraciones de glucosa. Carril 1, RG (≤ 1 mM); carril 2, NG (25 mM); carril 3, AG (50 mM). Como control de carga se amplificó el fragmento del gen de la β -tubulina (112 pb). Carriles 4, Como control positivo de expresión para ambos genes se usó DNase. Carriles 5 6, controles negativos, una reacción con RNA tratado con DNase I y otra sin DNA, respectivamente. Cabezas de flecha indican la banda correspondiente a los amplicones. (B) Análisis densitométrico de la expresión de *tv-catd* normalizada con β -*tubulina*. (C) Resultado gráfico del ensayo de qRT-PCR usado para cuantificar los diferentes niveles del RNAm de las condiciones de glucosa. El 2Ct (“threshold cycle”) se usó para cuantificar el número de veces que el gen cambia respecto a la condición analizada tomando como gen calibrador β -*tubulina*. Las líneas de las barras indica la DS de las variaciones de tres ensayos de manera independiente. El asterisco muestra las diferencias significativas $P < 0.05$ de la banda entre las condiciones de glucosa calculado por el programa ANOVA.

Amplificación del gen completo tv-catd y clonación en el vector de transición pGEMT Easy.

Para la obtención de la proteína recombinante, una herramienta primordial para la generación de anticuerpos policlonales para la caracterización de la proteasa en el parásito, se clonó el gen completo *tv-catd*. Para la amplificación del fragmento completo de ~1,100, pb se usó la concentración de 3 mM de MgCl₂ para la amplificación del fragmento esperado se tomó como molde cDNA de la condición NG, el amplicón se purificó y se clonó en el vector de transición pGEM-T Easy, se secuenció y se confirmó la amplificación del fragmento correspondiente al gen *tv-catd*. Para la caracterización de la clona positiva usamos la enzima de restricción *Apal* para linearizar el plásmido, esperando un tamaño de ~4,115 pb (Figura 13), sitio de restricción único presente en la secuencia del vector, así como las enzimas *Ndel* y *XhoI*, sitios de restricción añadidos a la secuencia clonada, nos permiten observar la liberación del fragmento esperado (Figura 13, carriles 3 al 5). La liberación del fragmento clonado *tv-catd* de ~1,100 pb se hizo tratando el DNAp con ambas enzimas de restricción (Figura 13, carril 6). Usamos como control negativo DNAp de una clona vacía tratada con la enzima *Apal* observando que el plásmido linearizado mantiene el tamaño del vector vacío de ~3,000 pb (Figura 13, carril 7). Finalmente, de esta clona se obtuvo la secuencia completa del gen *tv-catd*.

Al hacer el alineamiento comparativo de la secuencia clonada con la secuencia del genoma obtuvimos una identidad del 99.8% con dos cambios de base en la posición 256 C/T 534 G/A (Figura 14) estos cambios no alteran la secuencia a nivel de aa, conservando el 100% de identidad (Figura 14).

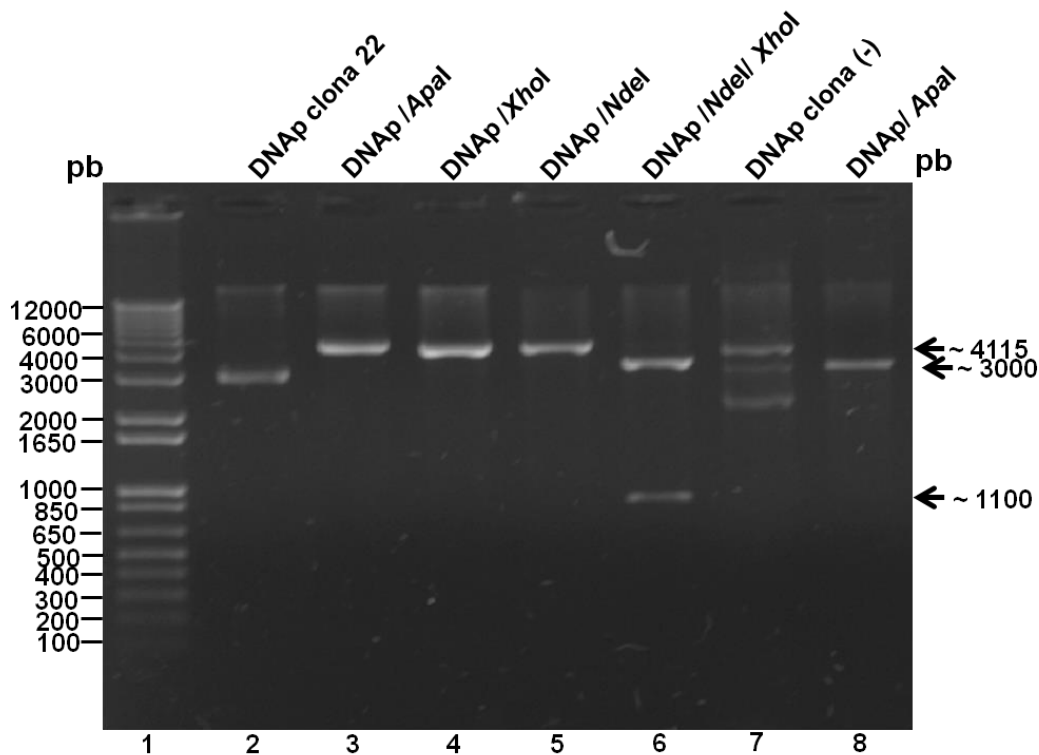


Figura. 13. Liberación del fragmento clonado de la región codificante del gen *tv-catd* en el vector de transición. Clonación del fragmento codificante *tv-catd* en el vector pGEMT-Easy. DNAP clona 22 (carril 2). DNAP linearizado tamaño ~4,115 pb tratado con enzimas de restricción *Apal*, *XhoI* y *NdeI* (carriles 3, 4 y 5). Liberación del fragmento clonado ~1,100 pb con las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI* así como el vector vacío ~3,000 pb (carril 6). Control negativo usamos una clona negativa DNAP (carril 7), tratamiento con la enzima *Apal* vector linearizado vacío ~3,000 pb. Marcadores de 1 kb (carril 1). Las flechas indican los tamaños mencionados en pares de bases (pb).

TVAG_33630	5'-----ATGCTAACTTCTTCTTCTTCTGCTTCTTCCAAGGCA	TVAG_33630	GGCATCCCACCGCCACTCCAGATCTTATACGAGCAOSGCGAAATGSAAGACTACACAGTT
Clona 22 S	GAATCACTAGTGATCCCATATGCTAACTTCTTCTTCTTCTGCTTCTTCCAAGGCA	Clona 22 S	GGCATCCCACCGCCACTCCAGATCTTATACGAGCAOSGCGAAATGSAAGACTACACAGTT
	*****		*****
TVAG_33630	ATTACAATGCCTCTCAAGGAGCAGATGTTCCCTTGAACAGGTGAGAAGSACAATCGAT	TVAG_33630	GCCTTCAAGCTCGGCCGTACATCCGGGSAAGTGGTGAATGACAATCGGTGGCTACAC
Clona 22 S	ATTACAATGCCTCTCAAGGAGCAGATGTTCCCTTGAACAGGTGAGAAGSACAATCGAT	Clona 22 S	GCCTTCAAGCTCGGCCGTACATCCGGGSAAGTGGTGAATGACAATCGGTGGCTACAC
	*****		*****
TVAG_33630	CGTTACCGCAAATGAATCGCGTTGATGGTGGATCCAGCGTCCACTCCACGATTTCTCT	TVAG_33630	CCAGATGCTTCTCCGGGSAATCACATGGTCAAOSITGCTAAGSAACTCTGGTGGTAC
Clona 22 S	CGTTACCGCAAATGAATCGCGTTGATGGTGGATCCAGCGTCCACTCCACGATTTCTCT	Clona 22 S	CCAGATGCTTCTCCGGGSAATCACATGGTCAAOSITGCTAAGSAACTCTGGTGGTAC
	*****		*****
TVAG_33630	GATGCACAGTACTACACAGAGATCACAAATCGGTACACCAGCTCAGAAATCAAAGTITGC	TVAG_33630	TTCGAGTTCGATGACGTCTCTGTTAAOSATGTTCTGCTGGTGTGCCAGCTGGCGGA
Clona 22 S	GATGCACAGTACTACACAGAGATCACAAATCGGTACACCAGCTCAGAAATCAAAGTITGC	Clona 22 S	TTCGAGTTCGATGACGTCTCTGTTAAOSATGTTCTGCTGGTGTGCCAGCTGGCGGA
	*****		*****
TVAG_33630	CCAGTACAGGCTCATCCAACCTCTGGGTTCCATCCAAGAGTGCAACTCAATGCTTGC	TVAG_33630	AAGTGCCTGCTATCCTTGATACAGGCACATCTATGCTCATTGGCCAGTCTCTGCTATG
Clona 22 S	CCAGTACAGGCTCATCCAACCTCTGGGTTCCATCCAAGAGTGCAACTCAATGCTTGC	Clona 22 S	AAGTGCCTGCTATCCTTGATACAGGCACATCTATGCTCATTGGCCAGTCTCTGCTATG
	*****		*****
TVAG_33630	TGGCTTCACACAGTTCAGACTCCTCCAAGTCATCCACATACACAGCTGATGGCCGTGAA	TVAG_33630	GATGTCATCATGAAGAACATCGATATOSAGCTCGTGGCCAGAACCTTGATCAGAACCA
Clona 22 S	TGGCTTCACACAGTTCAGACTCCTCCAAGTCATCCACATACACAGCTGATGGCCGTGAA	Clona 22 S	GATGTCATCATGAAGAACATCGATATOSAGCTCGTGGCCAGAACCTTGATCAGAACCA
	*****		*****
TVAG_33630	GTCGATATTCAATACGGATCTGGCTCCTGCAAGGCTTCGCTCCAGGATGAAGTCCAG	TVAG_33630	ACAGTCACCTTCGTCATCAAGGCGTCAAGTCCCACTTACACCAGAAGATTAGTCAAG
Clona 22 S	GTCGATATTCAATACGGATCTGGCTCCTGCAAGGCTTCGCTCCAGGATGAAGTCCAG	Clona 22 S	ACAGTCACCTTCGTCATCAAGGCGTCAAGTCCCACTTACACCAGAAGATTAGTCAAG
	*****		*****
TVAG_33630	ATTGCTGGCATCACAGACAAGATGACATTCGCTGAATGAAGGAAGAAGGTTCCATCTCC	TVAG_33630	AGAGTTAAGCAGGATCCTACGATCAGTGCCCTCCAGGTATGATGGGTGCTGACCTTGT
Clona 22 S	ATTGCTGGCATCACAGACAAGATGACATTCGCTGAATGAAGGAAGAAGGTTCCATCTCC	Clona 22 S	AGAGTTAAGCAGGATCCTACGATCAGTGCCCTCCAGGTATGATGGGTGCTGACCTTGT
	*****		*****
TVAG_33630	TTCATCGCTGCTAAGITGATGGTATCTTGGCCTTGTCTTCCAGAACATCTCGTTCCAG	TVAG_33630	CCATTCTTCATCCTCGGTGATACATCTCCGCAAGTACTACTCAATCTACGACATGAAC
Clona 22 S	TTCATCGCTGCTAAGITGATGGTATCTTGGCCTTGTCTTCCAGAACATCTCGTTCCAG	Clona 22 S	CCATTCTTCATCCTCGGTGATACATCTCCGCAAGTACTACTCAATCTACGACATGAAC
	*****		*****
		TVAG_33630	TACGTCAAOSGCGTGTCTAATCCAGTCTCGGCCCTTGCCTTGTCTAAGTGGTAA-----
		Clona 22 S	TACGTCAAOSGCGTGTCTAATCCAGTCTCGGCCCTTGCCTTGTCTAAGTGGTAACTCGAG
			*****3'

Sec. CNCND	MLTFFLSSASSKAITMPLKKHDVVSFEQVRRITIDRYRKLNRVDGGSSVPLHDFSDAQYYTE
TVAG_33630	MLTFFLSSASSKAITMPLKKHDVVSFEQVRRITIDRYRKLNRVDGGSSVPLHDFSDAQYYTE
Sec. CNCND	ITIGTPAQKFKVCPDTGSSNLWVPSKKCNISACWLHTRYDSSKSSTYTADGREVDIQYGS
TVAG_33630	ITIGTPAQKFKVCPDTGSSNLWVPSKKCNISACWLHTRYDSSKSSTYTADGREVDIQYGS
Sec. CNCND	GSCCKGFASQDEVQIAGITDKMTFAEMKEEGSISFIAAKFDGILGLAFQNISVQGIPPPPLQ
TVAG_33630	GSCCKGFASQDEVQIAGITDKMTFAEMKEEGSISFIAAKFDGILGLAFQNISVQGIPPPPLQ
Sec. CNCND	ILYEHGEIEDYTVAFKLGRTSGEDGEMTIGGYNPDAFSGEITWFNVAKELWWYFEFDDVL
TVAG_33630	ILYEHGEIEDYTVAFKLGRTSGEDGEMTIGGYNPDAFSGEITWFNVAKELWWYFEFDDVL
Sec. CNCND	VNDVSAGVCPAGGKCAAILDTGTSMILIGPVSAMDVIMKNIDIDARCQNLQNPVTFVIN
TVAG_33630	VNDVSAGVCPAGGKCAAILDTGTSMILIGPVSAMDVIMKNIDIDARCQNLQNPVTFVIN
Sec. CNCND	GVKFFLTPEDYVMRVNAGSYDQCLPGMMGADLVPFILGDTFLRKYYSIYDMNYVNGVAN
TVAG_33630	GVKFFLTPEDYVMRVNAGSYDQCLPGMMGADLVPFILGDTFLRKYYSIYDMNYVNGVAN
Sec. CNCND	PRLGLALAKW
TVAG_33630	PRLGLALAKW

Figura.14. Alineamiento de la secuencia clonada del gen *tv-catd* con la secuencia del genoma de *T. vaginalis*. Comparación de las secuencias de nucleótidos y amino ácidos del genoma con el TVAG_336300 y la clona 22 del aislado CNCND 188. (A) La secuencia de nucleótidos presentó dos cambios de bases C/T y G/A (cuadro gris). (B) A nivel de aa la secuencia no presentó cambios.

Subclonación de la región codificante del gen completo gen *tv-catd* en el vector de expresión.

Para continuar con la expresión de la proteína recombinante en un sistema procarionte, se hizo la subclonación del gen *tv-catd* en el vector de expresión pColdI. A partir de la construcción en el vector de transición se realizó una restricción masiva para obtener la cantidad requerida del fragmento de la secuencia codificante del gen *tv-catd* de ~1,100 pb. Para ligar en el vector de expresión pColdI, éste se desfosforiló con la finalidad de bajar la tasa de religación del vector de los grupos fosfatos de los extremos 3' y 5' del DNA. Este vector contiene una etiqueta de 6 Histidinas, permitiéndonos seguir a la proteína blanco

una vez expresada. El tamaño del vector ~4,407 pb más el inserto del gen completo ~1,100 pb generó un tamaño ~5,507 pb. La construcción se transformó en células JM109 de *E. coli*, se hizo la selección de clonas positivas 23 y 24, se trataron con las enzimas de restricción *NdeI* o *XhoI* observándose la linearización del plásmido con un tamaño de 5,507 pb (Figura 15, carriles 3, 4, 7 y 9). El tratamiento con ambas enzimas liberó el fragmento de ~1100 pb, dejando el vector vacío (Figura 15, carriles 5 y 9). También cargamos el DNAp de cada clona usada para observar su integridad (Figura 15, carriles 2, 6 y 10). Como control negativo usamos una clona negativa, observando que el tamaño del vector vacío se mantiene después de la digestión con las mismas enzimas (Figura 15, carriles 11 al 13). Ambas clonas se secuenciaron, obteniendo el cambio en las dos bases previamente mencionados. A nivel de identidad de aa fue del 100 % comparada con la secuencia del genoma para esta proteína.

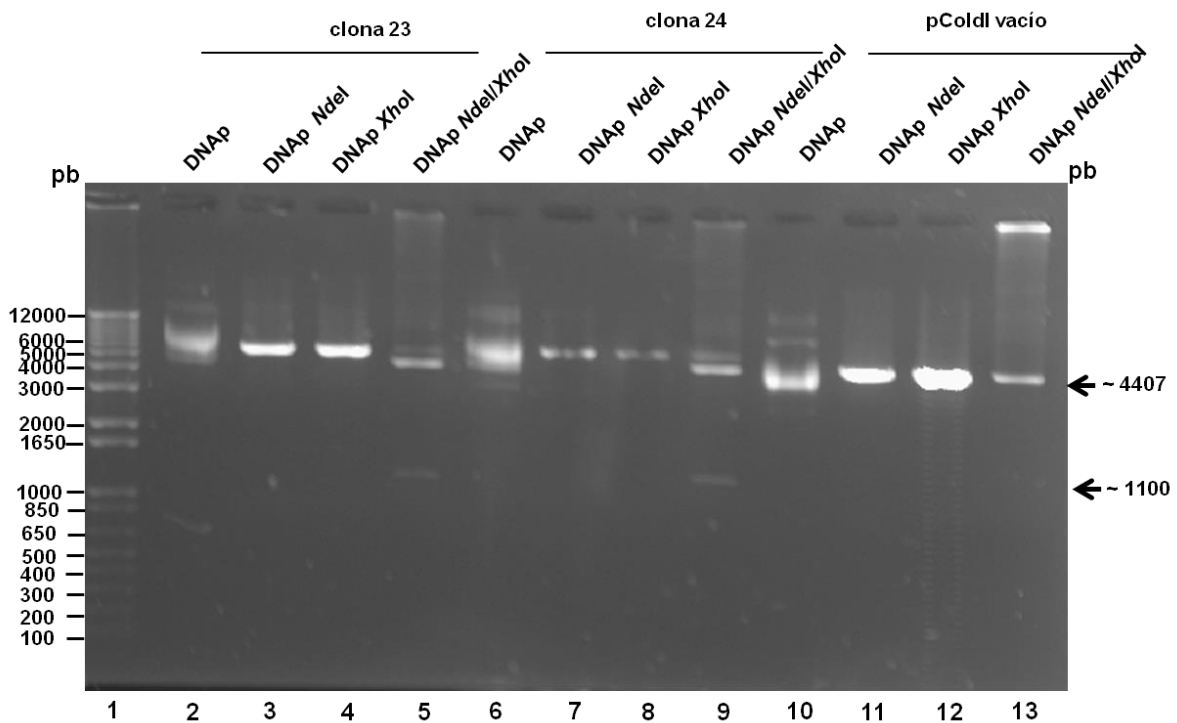


Figura 15. Liberación del fragmento clonado de la región codificante del gen *tv-catd* en el vector de expresión pColdI. Caracterización de las clonas positivas

mediante el uso de enzimas de restricción. DNAP clonas 23 y 24 (carril 2 y 6) tratado con las enzimas *XhoI* o *NdeI* linearización del plásmido tamaño de ~4115 pb con una sola enzima (carriles 3, 4, 7 y 8). Liberación del fragmento ~1100 pb con las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI* dejando el vector vacío 4407 pb (carriles 5 y 9). Como control negativo usamos una clona negativa DNAP tratado con las mismas enzimas vector linearizado vacío sin el inserto ~4407 pb (carriles 10 al 13). Marcadores de 1 kb (carril 1). Flechas indican los tamaños mencionados en pares de bases (pb).

Inducción de la proteína recombinante Tv-CatDr en el sistema de expresión procarionte.

El DNAP de la clona 23 se transformó en la cepa de *E. coli* de expresión BL21 (DE3), se indujo la expresión de la proteína Tv-CatD a una temperatura de 37 °C con la adición de IPTG 1 mM, activándose el operón lac el cual contiene el vector pColdI (Figura 16). Observamos la aparición de una banda de ~45 kDa. Debido a la cola de histidina se generó una proteína de mayor tamaño que el peso molecular hipotético de Tv-CatD de ~41 kDa (Figura 16, carriles 2 y 3). Al observar la inducción de la proteína blanco recombinante Tv-CatDr se determinó la fracción en la que se encontró la proteína recombinante. Los resultados muestran la presencia de una banda abundante en la fracción insoluble (FI) obtenida en cuerpos de inclusión (CI) y una banda poco abundante en la fracción soluble (Figura 16a, carriles 4 y 5). Además, se probó si la proteína Tv-CatDr se encontraba activa en un zimograma copolimerizado con gelatina, observando un resultado negativo (Figura 16b, carril 2). Para este ensayo, como control positivo usamos un extracto de *T. vaginalis*, observando bandas de actividad en el zimograma (Figura 16b, carril 3). Cabe mencionar que se amplificó el zimógeno, por lo que para estudios futuros se tendría que considerar este punto. Si el interés es la activación de la proteasa se requiere buscar las condiciones de activación de Tv-CatDr.

Los CI se solubilizaron para la purificación de Tv-CatDr por cromatografía de afinidad e intercambio iónico, observándose sólo la banda correspondiente a Tv-CatDr (Figura 17a). Con la proteína recombinante se hizo un ensayo de WB usando el anticuerpo anti-His para asegurar la pureza de la proteína purificada. El anticuerpo anti-His sólo reconoció la banda esperada (Figura 17b).

La proteína Tv-CatDr purificada se utilizó para la inmunización de ratones y conejos para la obtención de anticuerpos policlonales anti-Tv-CatD. Ambos tipos de anticuerpos anti-Tv-CatD reconocieron a la proteína recombinante (Figura 17c, carriles 2 y 4); como control negativo usamos los sueros preinmune que no tuvieron reacción contra la proteína recombinante (Figura 17c, carriles 3 y 5).

El anticuerpo α -Tv-CatDr en conejo nos permitió estandarizar la concentración de proteína requerida para el reconocimiento en extracto total de proteínas de *T. vaginalis* en las tres condiciones de glucosa, observando un mejor reconocimiento cuando usamos una concentración de 80 μ g del extracto de proteínas. El título de este anticuerpo fue muy bajo, es por ello que se utilizó el anticuerpo α -Tv-CatDr de ratón.

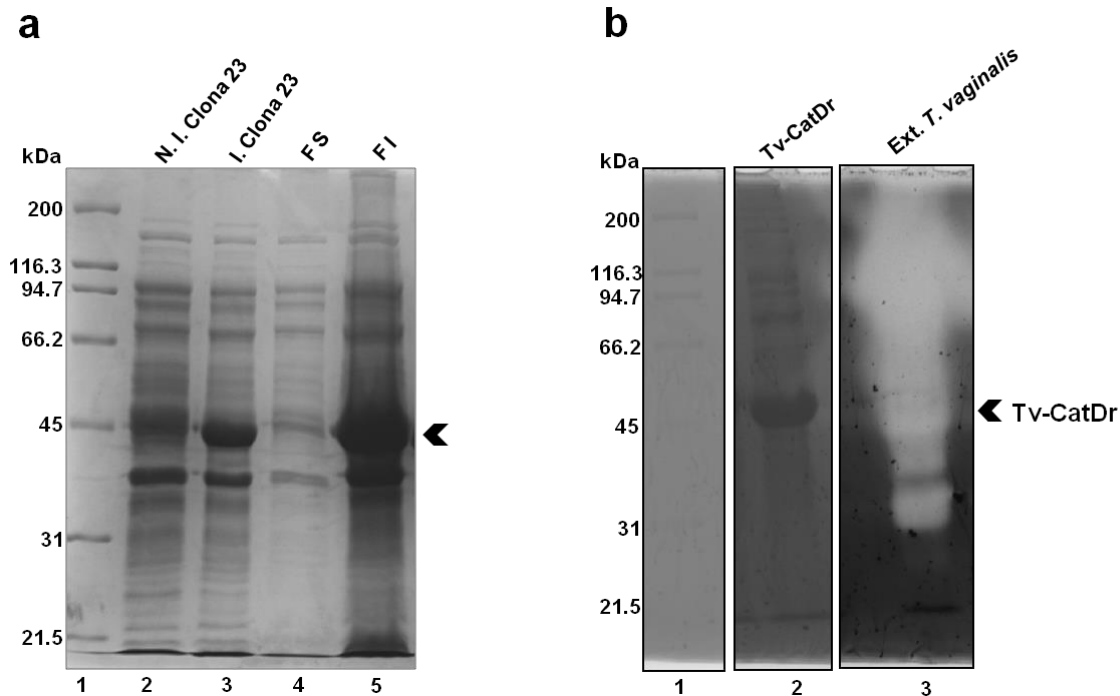


Figura 16. Expresión de la proteína Tv-CatD en el sistema procarionte. Inducción de la proteína Tv-CatDr con IPTG 1 mM clona 23. Patrón de proteínas

de extractos bacterianos en gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie. (a) Extracto total de *E. coli* BL21 no inducido (NI, carril 2). Extracto total de *E. coli* BL21 después de la inducción a 37°C (I, carril 3): Tv-CatDr concentrada en la fracción insoluble ó Cuerpos de inclusión (FI, carril 4). Fracción soluble (FS, carril 5). (b) Zimograma copolimerizado con gelatina. Extracto total de *E. coli* BL21 después de la inducción (carril 2). Extracto total de *T. vaginalis* como control positivo de actividad (carril 3): Cabeza de flecha señala la presencia de la proteína inducida cercana al marcador de ~45 kDa correspondiente a la Tv-CatDr. Carril 1: Marcador de peso molecular de amplio rango en kilodaltones (kDa) (Bio-Rad).

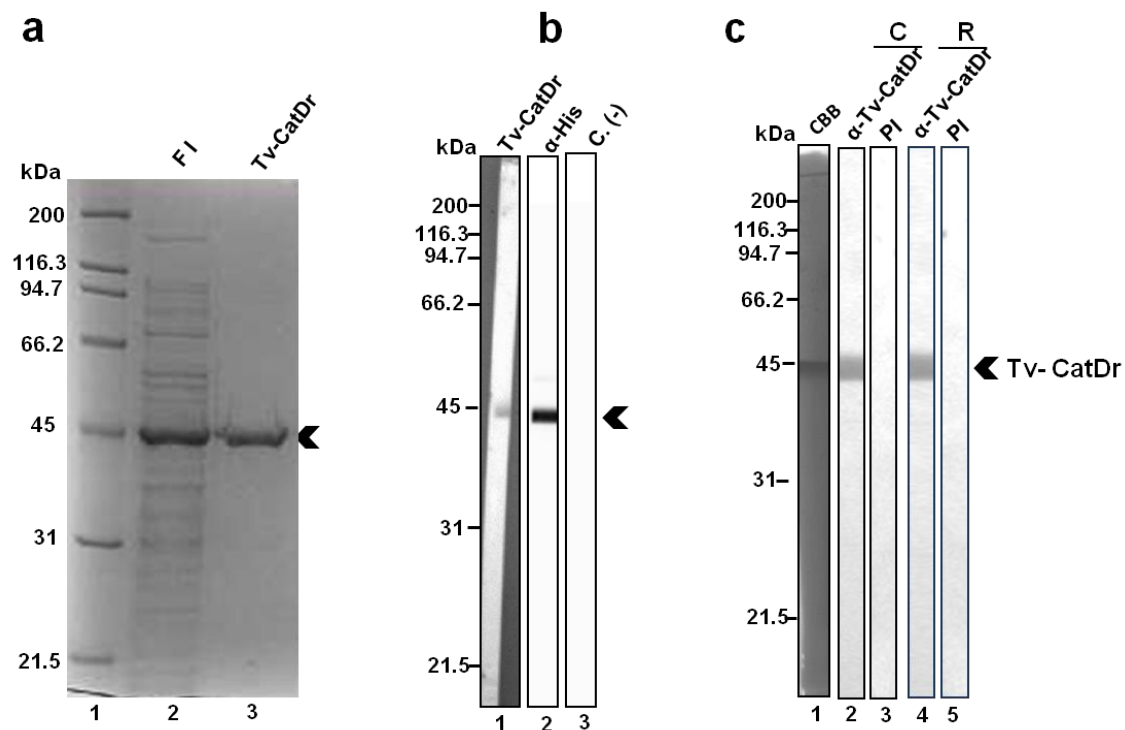


Figura 17. Purificación de la proteína Tv-CatD recombinante y obtención del anticuerpo α -Tv-CatDr. Obtención de la fracción insoluble (FI) de un extracto de *E. coli* BL21 inducido para la expresión de Tv-CatDr. (a) Lisis bacteriana para la obtención de CI solubilizados, banda intensa Tv-CatDr (carril 2). Proteína Tv-CatDr purificada después de las cromatografías de afinidad a níquel e intercambio iónico (carril 3). (b) Western blot usando el anticuerpo α -Histidinas (α -His) reconocimiento de Tv-CatDr purificada (carril 2). Control negativo suero preinmune (PI; carril 3). (c)

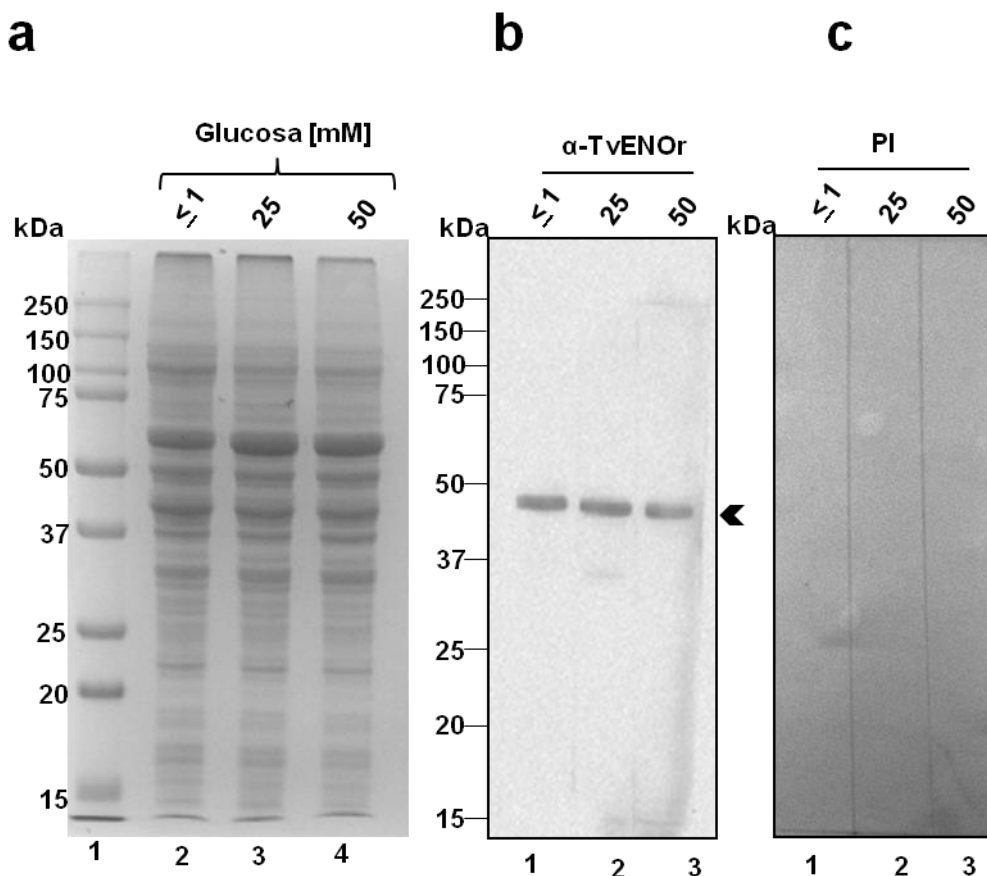
Western blot usando los anticuerpos policlonales generados anti-Tv-CatDr. Reconocimiento del anticuerpo anti-Tv-CatDr producidos en conejo (C) (carril 2) y ratón (R) (carril 4); ambos anticuerpos reconocen la proteína Tv-CatDr. Control negativo suero PI (carriles; 3 y 5). Patrón de proteína purificada teñida con azul de Coomassie (carril 1). Números indican los marcadores de peso molecular de amplio rango en kDa (Bio-Rad). La punta de flecha indica la banda de la proteína Tv-CatDr.

La glucosa aumenta la cantidad de Tv-CatD en extracto de proteínas de T. vaginalis.

Para determinar el efecto de la glucosa en la cantidad de Tv-CatD se realizaron ensayos de WB con el anticuerpo anti-Tv-CatDr y extractos de proteínas totales y resistentes a proteasas de los parásitos crecidos en las tres condiciones de glucosa. La figura 18a muestra el patrón de proteínas del extracto total de *T. vaginalis*. El anticuerpo anti-Tv-CatDr reconoció cuatro bandas (Figura 18d): la de ~35 kDa es regulada positivamente por glucosa, y por su peso sugerimos que se trata de la Tv-CatD madura; por debajo de ésta observamos dos bandas de ~32 y 28 kDa que podrían corresponder a productos de procesamiento de la Tv-CatD. Además, encontramos el reconocimiento de una banda de alto peso de ~80 kDa, cuya identidad se desconoce. Como control de carga utilizamos una proteína que no cambia la cantidad por la glucosa, como enolasa (TvENO) (Figura 18b). Como control negativo usamos suero PI el cual no tuvo ningún reconocimiento como se esperaba (Figura 18c). Estos ensayos se hicieron por triplicado de manera independiente lo que nos permitió hacer el análisis densitométrico de la banda de Tv-CatD madura de ~35 kDa normalizando con la proteína TvENO (Figura 18e), observándose diferencias significativas ($P < 0.05$) de la cantidad de proteína Tv-CatD entre ≤ 1 mM y 50 mM de glucosa.

La figura 19a muestra el patrón del extracto resistente a proteasas. El anticuerpo anti-Tv-CatDr reconoció dos bandas (Figura 19d): una de ~41 kDa que por el peso sugerimos se trata del zimógeno Tv-CatD y la banda de ~35 kDa de Tv-CatD de la enzima madura regulada positivamente por glucosa. En este extracto no se

observa el reconocimiento de la banda de ~80 kDa, lo que sugiere que sea susceptible a la degradación en estos extractos. Como control de una proteína regulada negativamente por glucosa se usó la proteasa TvCP2 (Figura 19b) observándose mayor cantidad en la condición ≤ 1 mM de glucosa (Tesis de maestría Rivera-Rivas, 2016). Como control negativo usamos suero PI, el cual no tuvo reconocimiento (Figura 19c). Estos ensayos se hicieron por triplicado de manera independiente y el análisis densitométrico de la banda de la Tv-CatD madura (Figura 19e), muestra diferencia significativa ($P < 0.05$) de la cantidad de proteína Tv-CatD entre la condición de ≤ 1 mM y la condición 50 mM de glucosa. Estos resultados muestran que la glucosa regula positivamente la cantidad de proteína Tv-CatD en *T. vaginalis*.



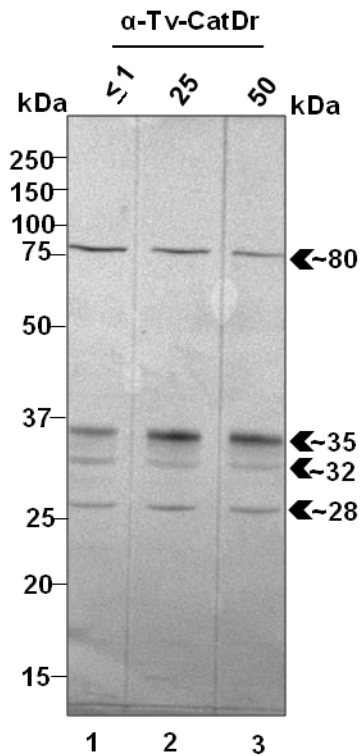
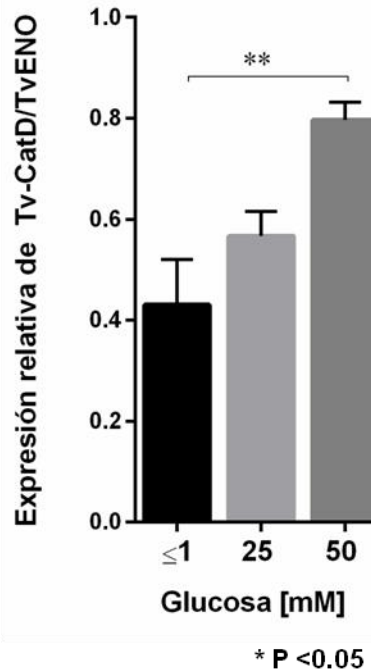
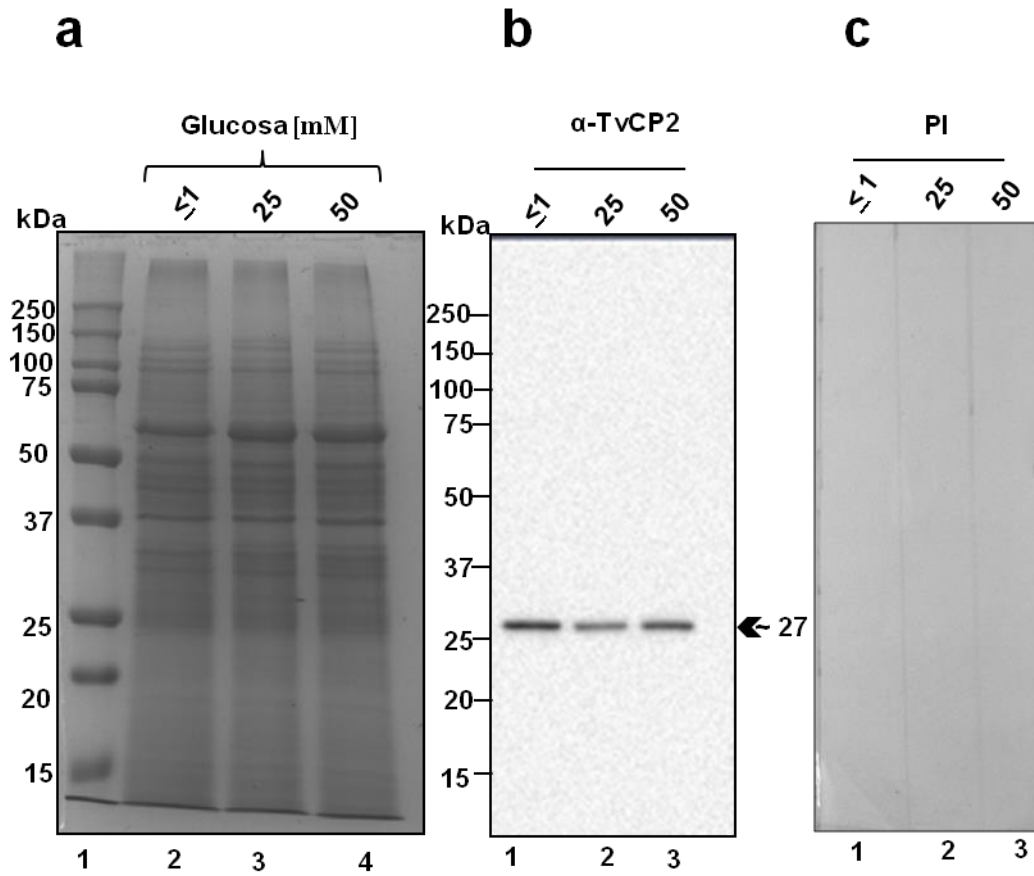
d**e**

Figura 18. Efecto de la glucosa en la cantidad de proteasa Tv-CatD en un extracto de proteína total de *T. vaginalis*. Extractos de proteína total de parásitos crecidos en las tres condiciones de glucosa. (a) Patrón de proteína total en las tres condiciones de glucosa (≤ 1 , 25 y 50 mM) (Carriles 2 al 4) teñidos con azul de Coomassie en geles de poliacrilamida al 10%. Geles duplicados se transfirieron a membranas de NC para WB. (b) Control de carga, Enolasa de *T. vaginalis* en las tres condiciones de glucosa, por reconocimiento con el anticuerpo anti-Tv-ENOr. (c) Control negativo, suero PI. (d) Reconocimiento del anticuerpo anti-Tv-CatD producido en ratón de cuatro bandas ~80, ~35, ~32, y ~28 kDa. (d) El análisis densitométrico muestra la cantidad relativa de Tv-CatD madura de ~35 kDa. Las líneas de las barras indican la desviación estándar (DS) de las variaciones de tres ensayos de manera independiente. El asterisco muestra las

diferencias significativas $P < 0.05$ de la banda entre las condiciones de glucosa por análisis estadístico ANOVA. Cabezas de flecha indican el reconocimiento de las bandas por los anticuerpos. Los números de la izquierda indican las posiciones de los marcadores de peso molecular en kDa.



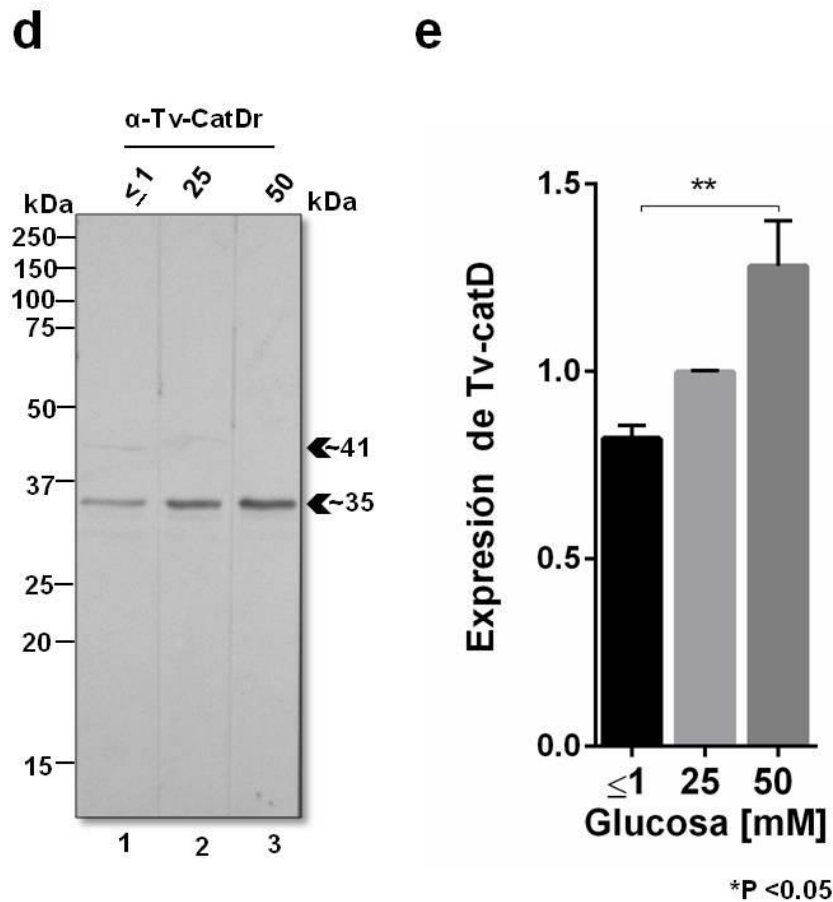


Figura 19. Efecto de la glucosa en la proteasa Tv-CatD en un extracto resistente a proteasas de *T. vaginalis*. El extracto resistente a proteasas de parásitos crecidos en las tres condiciones de glucosa. (a) Patrón del extracto resistente a proteasas en las tres condiciones de glucosa ≤ 1 , 25 y 50 mM (Carriles 2 al 4) teñidos con azul de Coomassie en geles de poliacrilamida al 10%. Geles duplicados se transfirieron a membranas de NC para WB. (b) Control positivo, anticuerpo anti-Tv-CP2r que reconoce una proteasa, TvCP2, regulada negativamente por glucosa. (c) Control negativo suero PI. (d) Reconocimiento del anticuerpo anti-Tv-CatDr producido en ratón reconoce dos bandas ~41 kDa y ~35 kDa. (e) Análisis densitométrico muestra la cantidad relativa de Tv-CatD madura. Las líneas de las barras indican la desviación estándar (DS) de las variaciones de tres ensayos de manera independiente. El asterisco muestra las diferencias significativas $P < 0.05$ de la banda entre las condiciones de glucosa por análisis estadístico ANOVA. Cabezas de flecha indican el reconocimiento de las bandas

por los anticuerpos. Los números de la izquierda indican la posición de los marcadores de peso molecular en kDa.

Identificación de Tv-CatD en el degradoma de T. vaginalis.

Para identificar la proteína reconocida por el anticuerpo anti-Tv-CatDr en extractos resistentes a proteasas realizamos geles de 2-DE en la condición de ≤ 1 mM y 50 mM de glucosa y se tiñeron con plata (Figura 20a). El patrón de proteínas en extractos se le conoce como degradoma activo. Por western blot (Figura 20b), el anticuerpo anti-Tv-CatD reconoció una mancha de ~ 35 kDa y otra de ~ 28 kDa en la condición de 50 mM de glucosa. En la condición de ≤ 1 mM sólo reconoció la mancha de ~ 35 kDa con menor intensidad y a un pl ácido, que coincide con el pl teórico de Tv-CatD de 4.6 (<http://trichdb.org/trichdb/>). La mancha de ~ 35 kDa del degradoma se cortó y se identificó para su identificación por espectrometría de masas (MS). Dado que la mancha de ~ 28 kDa no se observó en el gel, no se envió a identificar, pero se sugiere que sea un producto del procesamiento de la Tv-CatD madura.

Por MS se obtuvieron 8 péptidos (Cuadro 8) que se encuentran presentes en la secuencia de la Tv-CatD madura (Figura 21), con un porcentaje de cobertura del 25%. Este resultado confirmó que la banda y la mancha de 35 kDa reconocidas por el anticuerpo anti-Tv-CatDr corresponden a Tv-CatD madura.

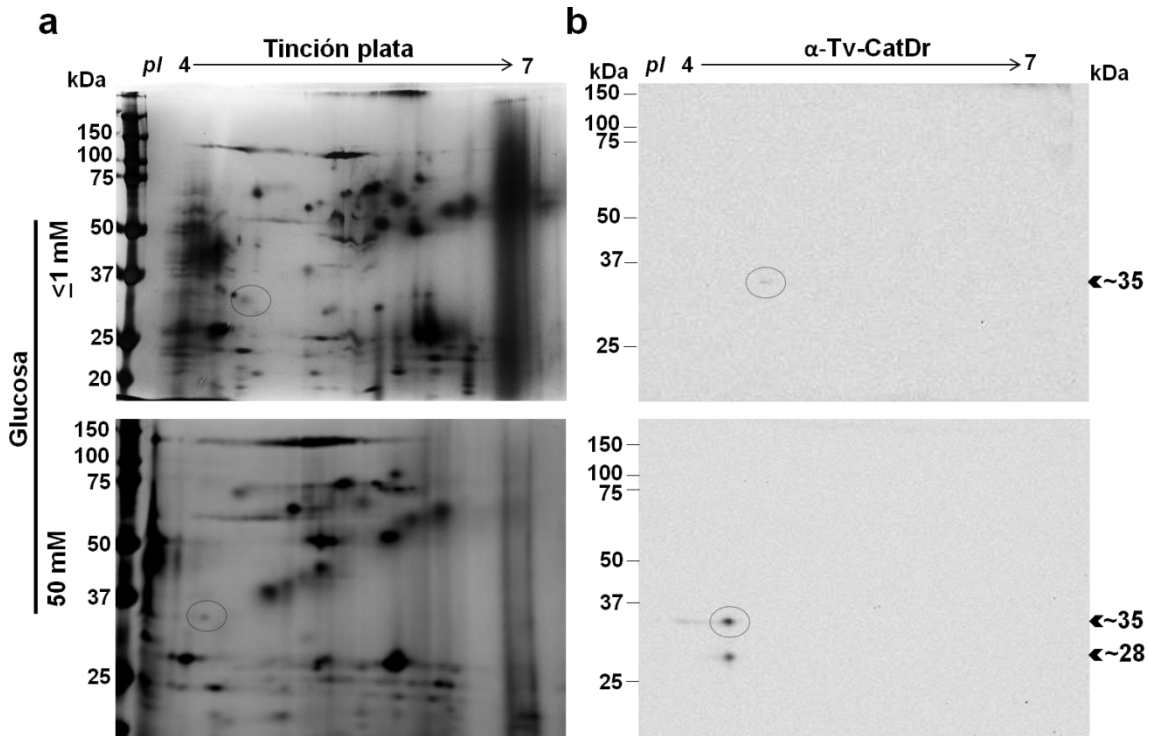


Figura 20. Identificación de la Tv-CatD en el degradoma activo de *T. vaginalis* en diferentes condiciones de glucosa. En geles de 2 DE se identificó la mancha de la Tv-CatD madura. (a) Patrón de proteínas de un extracto resistente a proteasas (degradoma activo) de *T. vaginalis* en ≤ 1 y 50 mM de glucosa, en geles de poliacrilamida en doble dimensión al 10% teñido con plata, (b) Geles duplicados transferidos a membranas de NC para WB con el anticuerpo anti-Tv-CatDr. Cabezas de flecha indican las manchas reconocidas por el anticuerpo. El círculo muestra la mancha de Tv-CatD ~ 35 kDa identificada por MS. Las flechas de la parte superior del gel indican el pH (4-7) de las tiras usadas para 2-DE. Los números de la izquierda indican la posición de los marcadores de peso molecular en kDa.

Cuadro 8: Péptidos identificados por MALDI-TOF-MS de la mancha de ~35 kDa de la proteína de *Trichomonas vaginalis* detectada por el anticuerpo anti-Tv-CatDr.

Número del Péptido ^a	Posición ^b	m/z (av) ^c	Secuencia de aminoácidos ^d
1	72-85	1647.31841	VCPDTGSSNLWVPSK
2	113-124	1343.88140	EVDIQYGSGSCK
3	125-140	1679.35112	GFASQDEVQIAGITDK
4	125-147	2518.52304	GFASQDEVQIAGITDKMTFAEMK
5	148-158	1153.10332	EEGSISFIAAK
6	279-285	816.39514	NIDIDAR
7	304-314	1384.10661	FPLTPEDYVMR
8	363-369	685.90459	LGLALAK

^aAsignación de numeración consecutiva de los péptidos identificados. ^bPosición de los residuos de aminoácidos (aa) de péptidos identificados en la secuencia de Tv-CatD del genoma de *T. vaginalis*. ^cPromedio de la masa peptídica " m/z (av) de los péptidos identificados por MALDI-TOF-MS después de la digestión de la mancha de proteína de 35 kDa obtenida a partir del extracto resistentes a proteasas en la condición de 50 mM de glucosa de *T. vaginalis* (Fig.18). ^dPéptidos obtenidos a partir de la secuencia de Tv-CatD. Porcentaje de cobertura fue de 25 %.

Pro-péptido

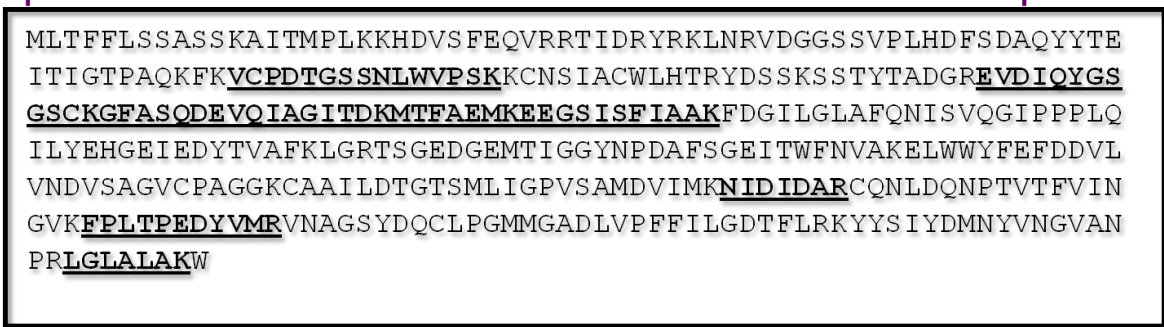


Figura 21. Péptidos identificados por MS en la secuencia Tv-CatD. Péptidos identificados a partir de MS representado en letra negro subrayado en la secuencia de Tv-CatD. La secuencia del propéptido indicado por la llave. Los aa siguientes corresponden a la secuencia madura.

Tv-CatD se encuentra activa en el extracto resistente a proteasas de *T. vaginalis*.

Para conocer si Tv-CatD está activa en el parásito, se usó un sustrato sintético fluorogénico específico para CatD/E (Yasuda y col., 1999) y presencia de extracto resistente a proteasas de parásitos crecidos en la condición de ≤ 1 mM y 50 mM de glucosa. En los ensayos de actividad enzimática se midió la fluorescencia emitida que se generó al digerir el sustrato por actividad de la Tv-CatD. La actividad enzimática de Tv-CatD probada a diferentes pHs mostró que el pH óptimo de actividad es a pH 3.5-4.5 en ambas condiciones de glucosa, la cual disminuye progresivamente a pH 5.5, 6.5 y 7.0. Además, se observó mayor actividad proteolítica en la condición ≤ 1 mM con respecto a las condición de 50 mM (Figura 22).

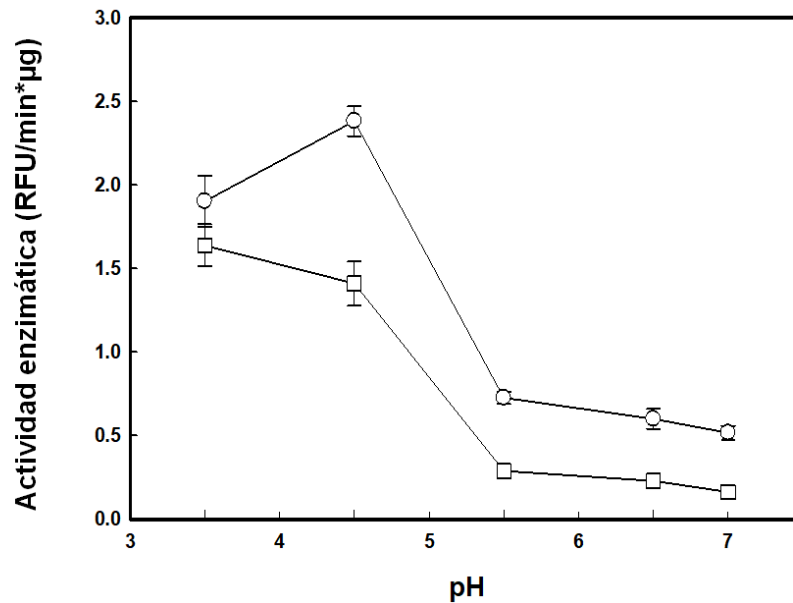


Figura 22. Actividad proteolítica de Tv-CatD a diferentes pHs en extractos resistente a proteasas de *T. vaginalis* en las diferentes condiciones de glucosa. Extractos resistentes a proteasas de parásitos crecidos en las condiciones de ≤ 1 y 50 mM de glucosa en presencia del sustrato fluorogénico específico para CatD/E. Actividad proteolítica a diferentes pHs (3.5, 4.5, 5.5, 6.5 y 7.0), la actividad fue calculada por la pendiente máxima de unidades relativas de fluorescencia (RFU) vs tiempo (Min) por cantidad de proteína en μg (RFU/ Min * μg del PREs). ≤ 1 mM glucosa (círculos) y 50 mM glucosa (cuadrados). La actividad enzimática se muestra en el eje Y y los pH de trabajo están en el eje X. Las líneas de las barras indica la DS de la variación de tres ensayos independientes por triplicado.

Efecto de los inhibidores para las proteasas de tipo Aspártico en la actividad proteolítica de Tv-CatD.

Efecto de Pepstatina A en la actividad proteolítica de Tv-CatD.

Para probar el efecto del inhibidor pepstatina A (inhibidor de proteasas de tipo aspártico) en la actividad proteolítica de Tv-CatD en presencia del sustrato fluorogénico, en zimogramas copolimerizados con gelatina (sustrato general para proteasas) o hemoglobina (sustrato específico para CatD). A partir de parásitos crecidos en ≤ 1 mM y 50 mM se obtuvieron extractos resistentes a proteasas para realizar ambos ensayos en presencia de diferentes concentraciones de Pepstatina A. Los ensayos de actividad con el sustrato fluorogénico no mostraron un efecto inhidor de la pepstatina A (40, 80 y 160 μ M) sobre la actividad proteolítica de la Tv-CatD (Figura 23). Por otra parte se hicieron zimogramas con gelatina como sustrato (Figura 24), en donde ninguna de las concentraciones de Pepstatina A mostró un efecto inhibitorio de la actividad proteolítica, comparado con la actividad de los extractos sin tratamiento (control positivo) o en presencia de DMSO (vehículo) (Fig. 24, carriles 2 y 4, respectivamente).

Con este resultado se consideró probar diferentes pHs de activación 4.0, 5.0, 5.5 y 6.0 en presencia de un inhibidor de proteasas de tipo cisteína y serina con la finalidad de inhibir principalmente las proteasas de tipo cisteína, por lo que se usó TLCK 1 mM (Hérendez-Gutiérrez y col., 2004) y Pepstatina A 300 μ M, usando las condiciones anteriores de temperatura y tiempo para ambas condiciones de glucosa (Figura 25). En estas condiciones se observó una disminución de la actividad proteolítica total a pH 4 y 6. Los pHs óptimos para la activación de catepsina D estan en el rango de interés entre pH 4.0 y 5.5. Por lo que consideramos con este resultado seguir trabajando con el pH 4.5 de activación. Además, este resultado nos mostró que en presencia de TLCK 1 mM se observó una disminución drástica de toda la actividad proteolítica y en presencia de pepstatina A seguimos sin encontrar inhibición significativa de la actividad en la región correspondiente a la Tv-CatD madura de 35 kDa (Figura 26).

Dado que la gelatina es un sustrato general para ver actividad proteolítica, se probó también hemoglobina (Hb), un sustrato específico para CatD. Los zimogramas 1D copolimerizados con Hb con extractos resistentes a proteasas en ambas condiciones de glucosa en presencia sólo de TLCK y TLCK y Pepstatina 300 μ M, se observó actividad proteolítica sólo del control de actividad extractos con DMSO (Figura 27 Carriles: 2 y 7). Este resultado mostró que la actividad proteolítica se inhibió completamente en presencia de TLCK y no permitió detectar actividad proteolítica de metalo o aspártico proteasas.

También se probó la inhibición de la actividad proteolítica en ambas condiciones de glucosa en presencia de Pepstatina A aumentando las concentraciones a 1 y 3 mM, usando las condiciones de activación previamente mencionadas (Figura 28). En ambas concentraciones de glucosa la pepstatina A concentraciones de ≤ 1 y 3 mM no mostró un efecto inhibitor de la actividad proteolítica. Sin embargo, la actividad proteolítica para la condición de 50 mM se observó reducción de la actividad proteolítica (Figura 28 carriles; 7 al 10), comparada con ≤ 1 mM (Figura 28 Carriles; 2 al 5).

Para buscar el pH óptimo de activación de proteasas con actividad de hemoglobinas se probaron diferentes pHs (4.0, 4.5, 5.0, 5,5 y 6.0) (Figura 29) en presencia y ausencia de Pepstatina A (1 y 3 mM). El rango de pH para la actividad de hemoglobina fue entre 4.0 y 5.5 en ambas condiciones de glucosa; sin embargo, la pepstatina A no inhibió la actividad proteolítica, de la banda de interés correspondiente a la Tv-CatD.

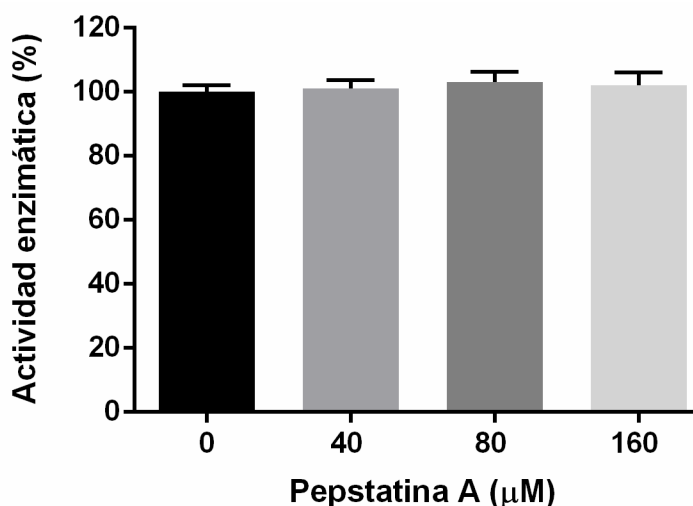


Figura 23. Efecto del inhibidor Pepstatina A en la actividad proteolítica de Tv-CatD en extractos resistente proteasas en alta glucosa en *T. vaginalis*. Extractos resistentes a proteasas de parásitos crecidos en la condición de 50 mM de glucosa a diferentes concentraciones en presencia de pepstatina A 0, 40, 80 y 160 μ M utilizando el sustrato fluorogénico específico para CatD/E. Los experimentos se hicieron a pH 4.5. La actividad de PRE con el vehículo DMSO se tomó como el 100 %. La actividad enzimática en porcentaje se muestra en el eje Y y las concentraciones de Pepstatina están en el eje X. Las líneas de las barras indican la desviación estándar (DS) de las variaciones de tres ensayos de manera independiente.

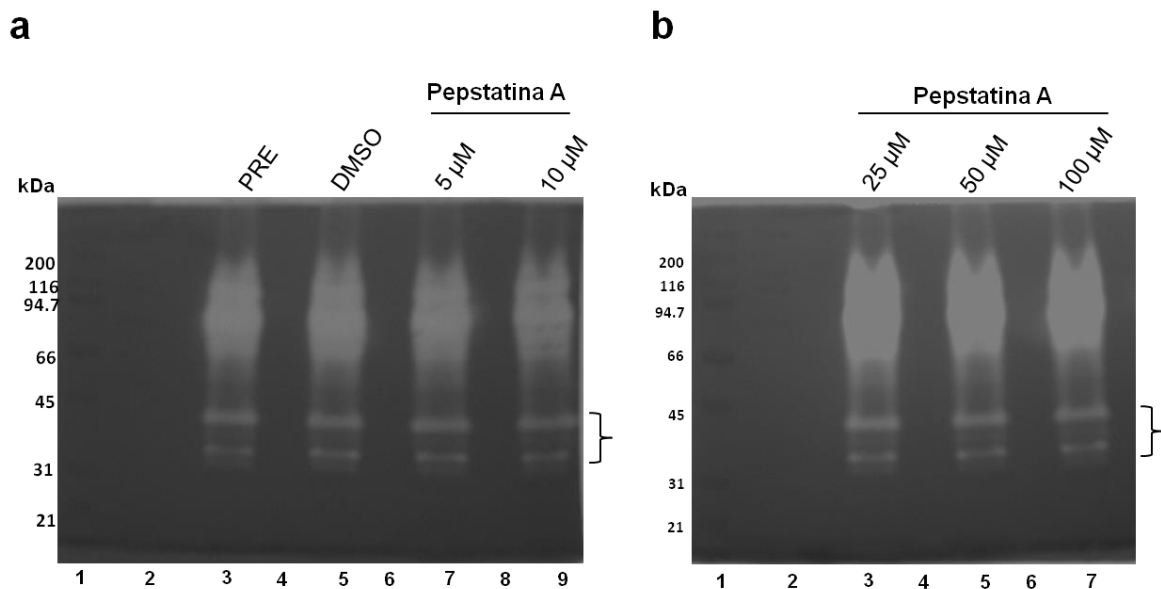


Figura 24. Efecto del inhibidor Pepstatina A en la actividad proteolítica en presencia de gelatina de extractos resistente a proteasas en alta glucosa en *T. vaginalis*. Extractos resistente a proteasas de parásitos crecidos en la condición de AG se incubaron con diferentes concentraciones de pepstatina A y se corrieron geles poliacrilamida al 10% copolimerizados con gelatina como sustrato teñidos con azul de Coomassie. (a) Concentraciones crecientes de pepstatina A: 5, 10 μ M. Control de actividad (carril 1) y del vehículo para Pepstatina A (carril 5). (b) Concentraciones 25, 50 y 100 μ M. Las bandas claras contra un fondo oscuro indican la actividad proteolítica en el sustrato. La llave en negro indica el rango de

actividad proteolítica de interés para Tv-CatD. Los números de la izquierda indican la posición de los marcadores de peso molecular de amplio rango en kDa.

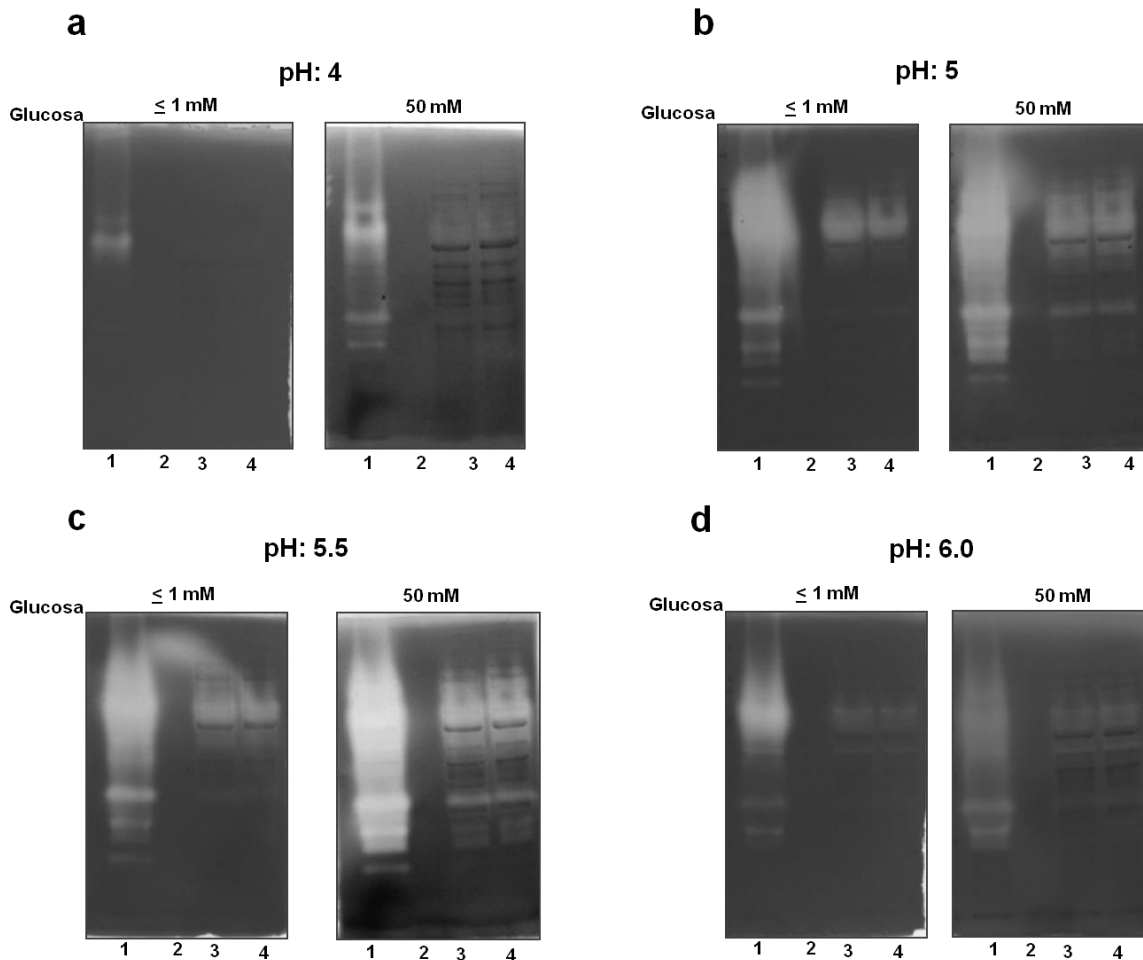


Figura 25. Efecto del pH en la actividad proteolítica de extractos resistente a proteasas en las diferentes condiciones de glucosa en *T. vaginalis* en presencia de inhibidores. Extractos resistente a proteasas de parásitos crecidos en las condiciones de ≤ 1 mM y 50 mM se incubaron con TLCK (Carriles 3) y con TLCK 1 mM + pepstatina A 300 μ M (Carriles 4), PREs sin inhibidores (Carril 1) se analizaron en geles de poliacrilamida al 10% copolimerizados con gelatina como sustrato teñidos con azul de Coomassie, y activados a diferentes pHs por ~20 h. Activación a (a) pH 4.0. (b) pH 5.0, (c) pH 5.5. (d) pH 6.0. Las bandas claras contra fondo oscuro indican la actividad proteolítica en el sustrato. Los números de la izquierda indican la posición de los marcadores de peso molecular de amplio rango en kDa.

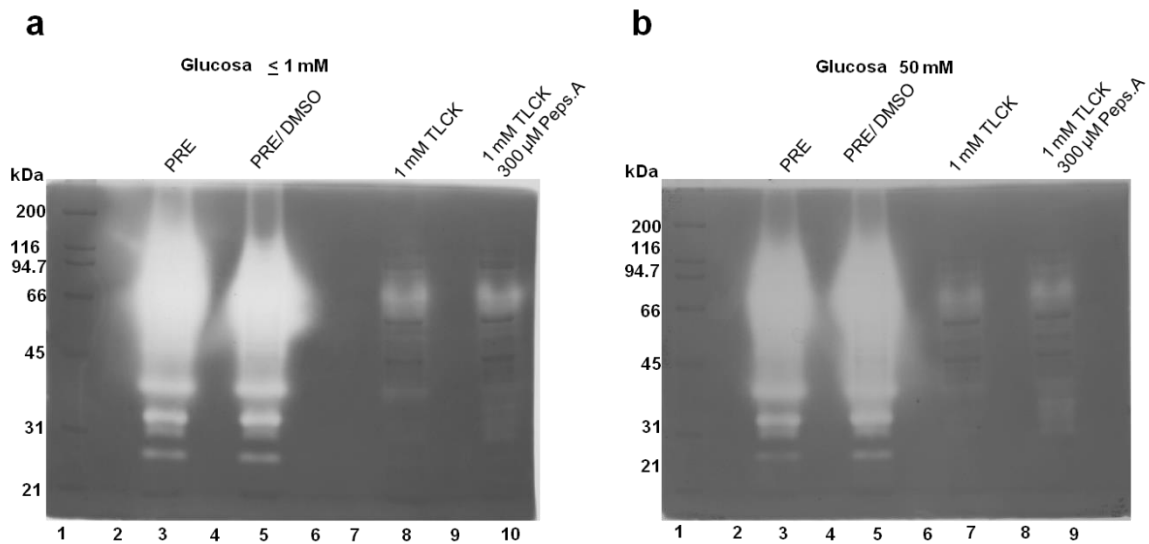


Figura 26. Actividad proteolítica de extractos resistente a proteasas en las diferentes condiciones de glucosa en *T. vaginalis* en presencia de inhibidores. Extractos resistente a proteasas de parásitos crecidos en ≤ 1 mM y 50 mM de glucosa se incubaron con los inhibidores TLCK 1 mM y pepstatina A 300 μ M se analizaron en geles de poliacrilamida al 10% copolimerizados con gelatina como sustrato teñidos con azul de Coomassie y activados a pH 4.5 por ~ 20 h. (a) Glucosa ≤ 1 mM. (b) Glucosa 50 mM. Control de actividad (carril 1) y con el vehículo (carril 2). Tratamiento con TLCK, (carril 8) y TLCK + pepstatina A (carril 9). Las bandas claras contra fondo oscuro indican la actividad proteolítica en el sustrato. Los números de la izquierda indican la posición de los marcadores de peso molecular de amplio rango en kDa.

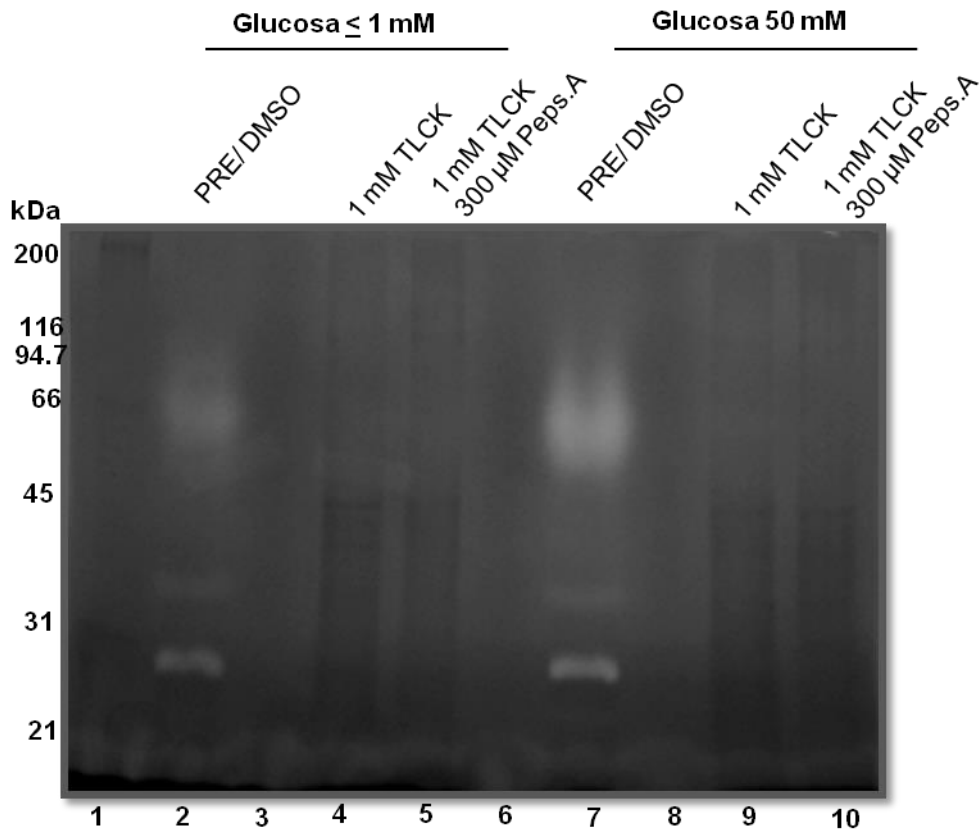


Figura 27. Efecto de Pepstatina A y TLCK en la actividad proteolítica de *T. vaginalis* utilizando hemoglobina como sustrato y extractos resistente a proteasas de parásitos crecidos en las diferentes condiciones de glucosa. Extractos resistente a proteasas de parásitos crecidos en ≤ 1 mM y 50 mM de glucosa incubados con los inhibidores TLCK 1 mM y pepstatina A 300 μ M y se analizaron en geles de poliacrilamida al 10% copolimerizados con hemoglobina como sustrato, teñidos con azul de Coomassie y activados a pH 4.5 por ~20 h. Glucosa ≤ 1 mM (carriles 2 al 5). Glucosa 50 mM (Carriles 7 al 10). Las bandas claras contra fondo oscuro indican la actividad proteolítica en el sustrato. Los números de la izquierda indican la posición de los marcadores de peso molecular de amplio rango en kDa.

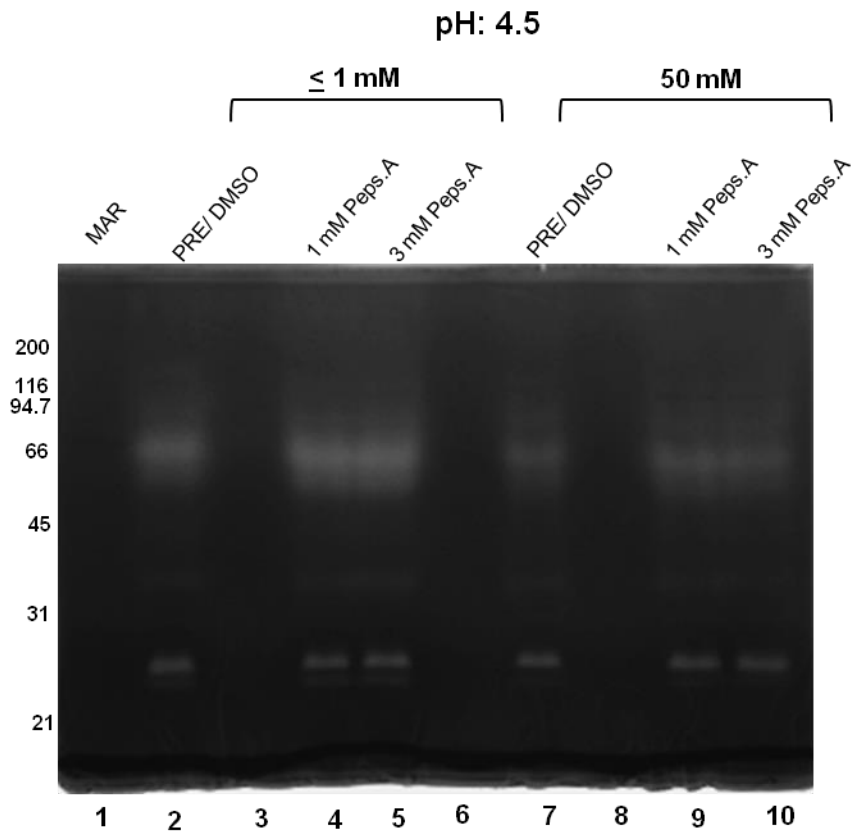


Figura 28. Efecto del inhibidor pepstatina A en la actividad proteolítica en hemoglobina como sustrato de extractos resistente a proteasas de parásitos crecidos en las diferentes condiciones de glucosa. Extractos resistente a proteasas de parásitos crecidos en $\leq 1 \text{ mM}$ y 50 mM se incubaron con pepstatina A 1 y 3 mM se corrieron en geles de poliacrilamida al 10% copolimerizados con hemoglobina como sustrato, teñidos con azul de Coomassie, activados a pH 4.5 por ~20 h. Glucosa en $\leq 1 \text{ mM}$ (carriles 2 al 5). Glucosa 50 mM (carriles 7 al 10). Las bandas claras contra fondo oscuro indican la actividad proteolítica en el sustrato. La llave de color negro nos indica la zona de interés para Tv-CatD. Los números de la izquierda indican la posición de los marcadores de peso molecular de amplio rango en kDa.

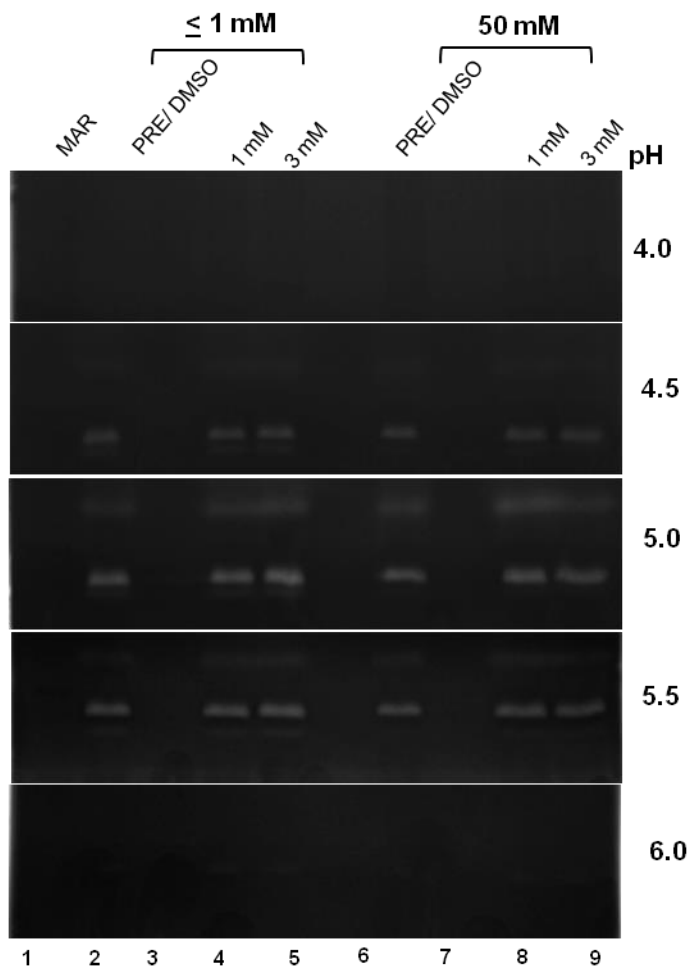


Figura 29. Efecto del pH en la actividad proteolítica de extractos resistente a proteasas de parásitos crecidos en las diferentes condiciones de glucosa en presencia de pepstatina A usando hemoglobina como sustrato. Extractos resistente a proteasas de parásitos crecidos en ≤ 1 mM y 50 mM se incubaron con pepstatina A 1 mM y 3 mM y se corrieron en geles de poliacrilamida al 10% con hemoglobina como sustrato, teñidos con azul de Coomassie, activados a diferentes pHs por ~20 h. (a) a pH 4.0. (b) a pH 4.5. (c) a pH 5.0. (d) a pH 5.5. (e) a pH 6.0. Las bandas claras contra fondo obscuro indican la actividad proteolítica en el sustrato. Los geles muestran la actividad proteolítica de la región de interés entre los peso < 45 a 25 kDa Los números de la izquierda indican la posición de los marcadores de peso molecular de amplio rango en kDa.

Efecto del inhibidor DAN en la actividad proteolítica de Tv-CatD.

Para probar el efecto del inhibidor DAN en presencia de Cu^{2+} (Rajagopalan y col., 1966) (otro inhibidor de proteasas de tipo aspártico) en la actividad proteolítica de Tv-CatD utilizando el sustrato fluorogénico. Los ensayos de actividad en presencia de sólo el inhibidor DAN a la concentración de 1 mM no mostraron un efecto inhibitorio, pero cuando se adicionó Cu^{2+} 1 mM junto con el DAN se observó un efecto significativo en la inhibición de la actividad y cuando se añadió sólo Cu^{2+} seguimos observando un efecto significativo de inhibición de la actividad de de Tv-CatD. Como control de la actividad se usó extractos resistentes a proteasas (PREs) en 50 mM de glucosa y ausencia de inhibidores, la cual se consideró como el 100% de actividad (Figura 30).

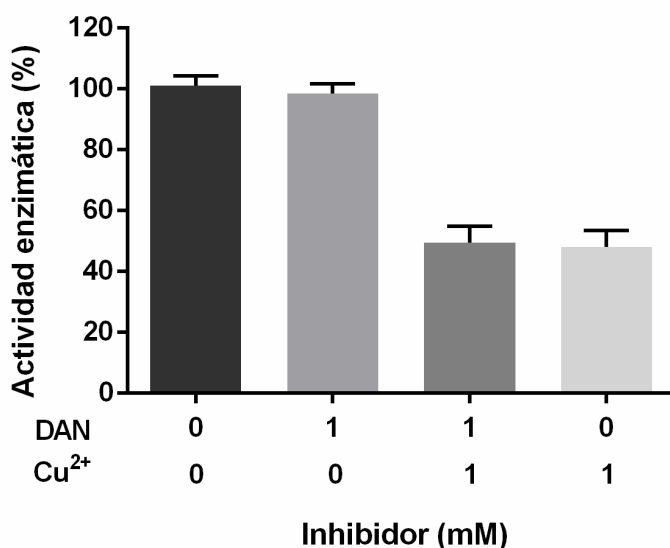


Figura 30. Efecto del inhibidor DAN en la actividad proteolítica de Tv-CatD en extractos resistente a proteasas en alta glucosa en *T. vaginalis*. Extractos resistentes a proteasas de parásitos crecidos en la condición de 50 mM de glucosa en presencia de DAN usando el sustrato fluorogénico específico para CatD/E. Actividad proteolítica en prrsencia de DAN 1 mM, DAN 1 mM con Cu^{2+} 1 mM, Cu^{2+} 1 mM. Los experimentos se hicieron a pH 4.5. La actividad de PRE sin

tratamiento se consideró como 100%. El eje de las Y indica el número de porcentaje de actividad y X las concentración de 1 mM de DAN y cobre. Las líneas de las barras indican la desviación estándar de las variaciones de tres ensayos independiente por triplicado.

Efecto del ion metal Cu^{2+} en la actividad proteolítica de *Tv-CatD*.

Con el resultado previo se probó el efecto de Cu^{2+} sobre la actividad proteolítica de *T. vaginalis* a diferentes concentraciones de cobre. El efecto observado en ambos extractos de PREs ≤ 1 mM y 50 mM de glucosa mostraron un efecto inhibidor del Cu^{2+} dependiente de la concentración (0.5, 1.0, 5.0 y 10 mM) (Figura 31), observando una inhibición cercana al 15% cuando se usó la concentración de 0.5 mM, del 40% con 1 mM, 70 al 80% con 5 mM y la máxima inhibición a la concentración de 10 mM de cobre en extractos de parásitos crecidos en ambas condiciones de glucosa.

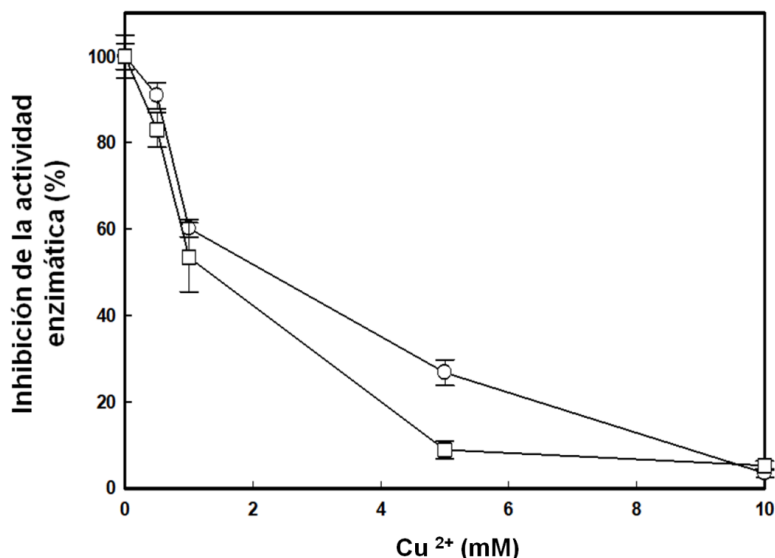


Figura 31. Efecto de inhibición del ion metal Cu^{2+} en la actividad proteolítica de *Tv-CatD* de extractos resistente a proteasas en glucosa en *T. vaginalis*. Extractos resistentes a proteasas de parásitos crecidos en ≤ 1 mM y 50 mM de glucosa y en presencia de diferentes concentraciones (0.5, 1.0, 5.0 y 10 mM) de cobre. La gráfica muestra el efecto inhibidor de Cu^{2+} en los PREs de ambas condiciones, los experimentos se hicieron a pH 4.5. La actividad PREs sin

tratamiento se tomó como el 100%. Condición de <1 mM (círculos) y condición de 50 mM (cuadrados). El eje de las Y indica porcentaje de actividad (%) y X las concentraciones (mM) de cobre. Las líneas de las barras indica la desviación estándar de la variación de tres ensayos independientes por triplicado.

El degradoma activo de *T. vaginalis* muestra que Tv-CatD tiene actividad de hemoglobinasas.

Para identificar la mancha de actividad de Tv-CatD en geles copolimerizados con hemoglobina por 2-DE en las condiciones ≤ 1 mM y 50 mM de glucosa, los geles se activaron por un largo período de ~60 h, observándose la degradación de Hb en la mancha correspondiente a Tv-CatD (Figura 32a). Este resultado nos muestra que Tv-CatD tiene actividad de hemoglobinasas. Duplicados de geles se trataron con Cu^{2+} a la concentración de 1 mM observando un efecto inhibitor sobre la mancha correspondiente a Tv-CatD así como de otras proteasas de tipo cistiena (Figura 32b).

Además, en este ensayo se usó nuevamente el inhibidor pepstatina A 1 mM para ver si lográbamos inhibir la mancha de actividad de Tv-CatD (Figura 33a). Como control usamos el vehículo en el cual se encuentra resuspendido el inhibidor, los resultados muestran que la actividad proteolítica no se afecta por pepstatina A (Figura 33b). Sin embargo, seguimos sin observar la inhibición de la actividad claramente, lo cual podría sugerir que la Tv-CatD es una AP resistente a pepstatina A como ocurre con algunas APs de parásitos (Valdivieso y col., 2007).

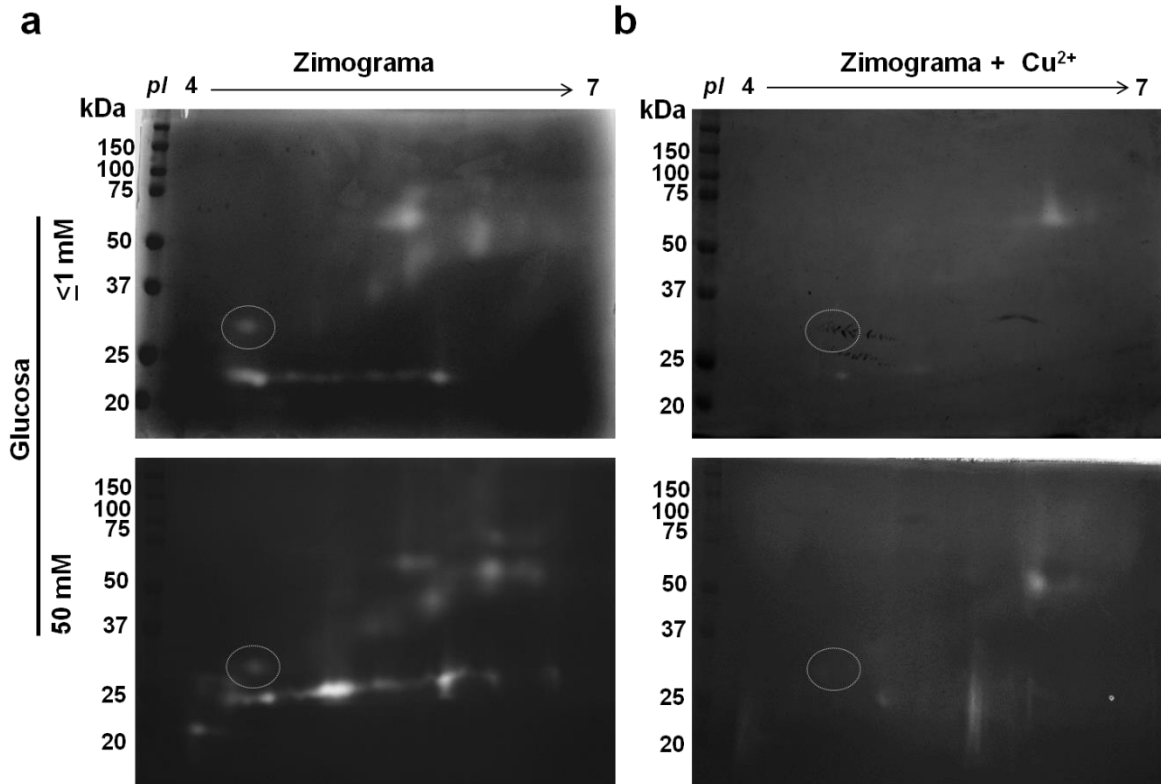
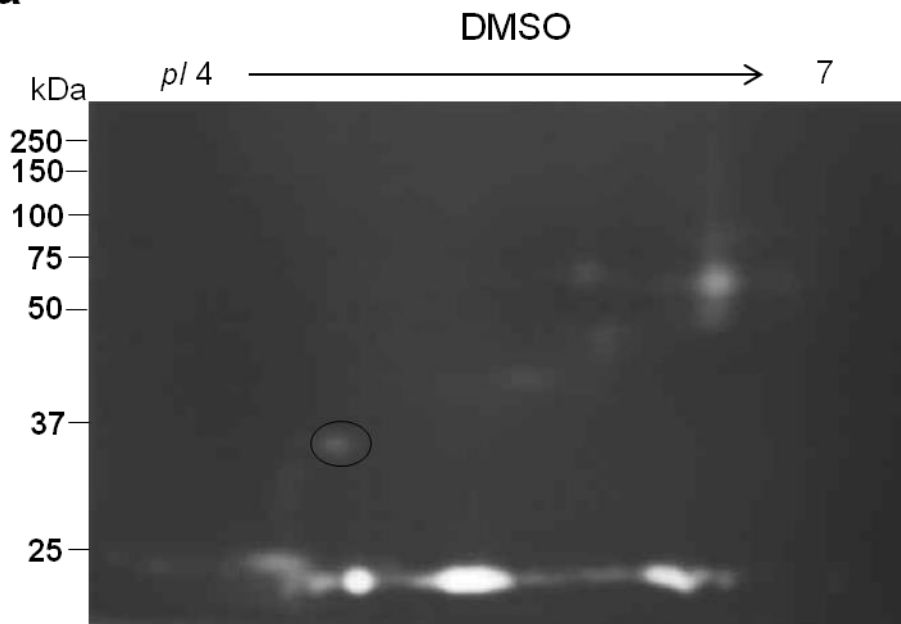


Figura 32. Actividad proteolítica usando Hemoglobina como sustrato en 2-DE en las condiciones glucosa en *T. vaginalis*. Extractos resistentes a proteasas en la condición de ≤ 1 mM y 50 mM separados por 2-DE en geles de poliacrilamida al 10% con hemoglobina como sustrato, teñidos con azul de Coomassie, activados a pH 4.5 por ~60 h. La mancha de actividad correspondiente a Tv-CatD (círculo). Las flechas de la parte superior del gel indican el pH (4-7) de las tiras usadas para las 2-DE. Geles de la parte superior corresponde a la condición de ≤ 1 mM y la parte inferior a la condición de 50 mM de glucosa. Las manchas claras contra fondo oscuro indican la actividad proteolítica en el sustrato. La mancha correspondiente a Tv-CatD (dentro del círculo). Los números de la izquierda indican la posición de los marcadores de peso molecular en kDa.

a



b

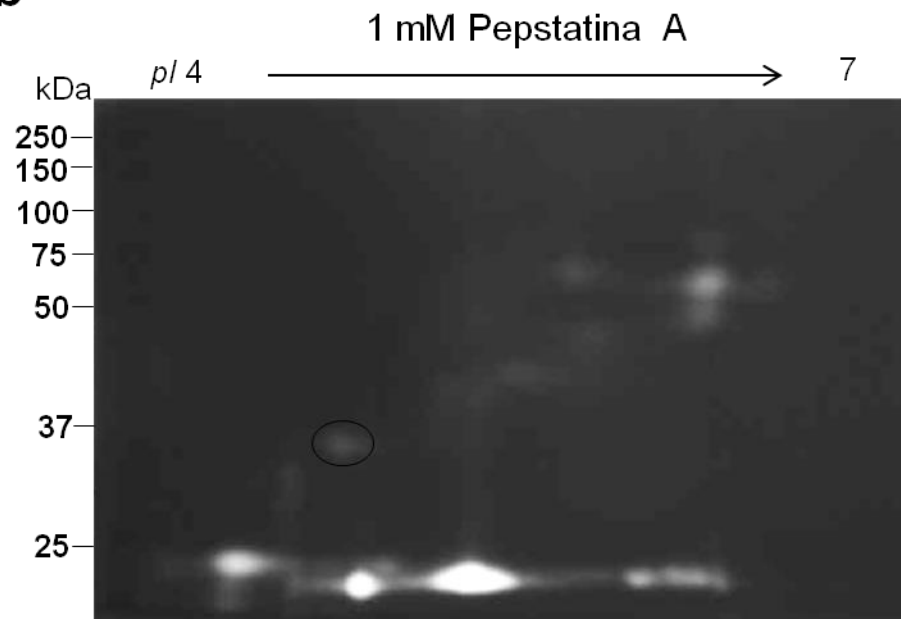


Figura 33. Actividad proteolítica usando hemoglobina como sustrato en 2-DE en *T. vaginalis* en la condición de AG en presencia de pepstatina A. Extractos resistente a proteasas en 2-DE se corrieron en geles de poliacrilamida al 10% con hemoglobina como sustrato, teñidos con azul de Coomassie, activados a pH 4.5 por ~60 h. (a) Actividad proteolítica en presencia del vehículo DMSO. (b) Actividad proteolítica en presencia de pepstatina A. La mancha de actividad correspondiente a Tv-CatD (círculo rojo). Las flechas de la parte superior del gel indican el pH (4-7) de las tiras usadas para la 2-DE. Las manchas claras contra el fondo oscuro indican la actividad proteolítica en el sustrato. Los números de la izquierda indican la posición de los marcadores de peso molecular en kDa.

Localización subcelular de Tv-CatD en parásitos de T. vaginalis crecidos en las tres condiciones de glucosa.

Para identificar la localización de Tv-CatD en *T. vaginalis*, se crecieron parásitos de 1 semana del aislado CNCD 188 para hacer ensayos de inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo anti-Tv-CatDr en parásitos permeabilizados, esperando una localización citoplasmática de esta proteasa como se sugiere para otras APs reportadas. El suero PI se usó como control negativo (Figura 34 a, b, c, d) y no se observó marca como era de esperarse.

La localización muestra un incremento de la señal de Tv-CatD en la condición 50 mM compara con la condición de ≤ 1 mM de glucosa (Figura 34). La intergridad de los parásitos crecidos en la tres condiciones de glucosa muestran la integridad celular (campo claro por Nomarsky, paneles: a, e, i). Para el caso de la condición ≤ 1 mM de glucosa se observa poca marca en el citoplasma, al hacer el traslape en el núcleo. En algunos parásitos se observó marca focalizada cercana al núcleo (paneles: f, g, h) que parece corresponder al aparato de Golgi. En 25 mM (paneles: j, k, l) la marca aumenta en el citoplasma y se observa alrededor del núcleo. Para la condición 50 mM la marca aumenta en el citoplasma, aparece marca perinuclear y se mantiene en el núcleo (paneles: ñ, o, p). Estos resultados nos permiten demostrar que Tv-CatD tiene múltiples localizaciones subcelulares

como es núcleo, la perinuclear podría tratarse del retículo endoplásmico, focalizada en el aparato de Golgi y localización citoplásmica en vesículas que podrían corresponder a lisosomas.

Para probar la hipótesis de que Tv-CatD es una proteína localizada en lisosomas se utilizó el marcador LysoTracker (color rojo). En ensayos de colocalización con LysoTracker se hizo para determinar si Tv-CatD se encuentra presente en lisosomas. Las condiciones de los parásitos fueron ≤ 1 mM y 50 mM observando localización de Tv-CatD (verde) y LysoTracker (rojo) en el citoplasma de *T. vaginalis* y al hacer el traslape de los canales se observó colocalización (amarillo) de Tv-CatD en algunas vesículas que corresponden a lisosomas (Fig. 34). A los datos de colocalización se les aplicó el coeficiente de correlación de Pearson's (valor > 0.5 indica colocalización de las marcas fluorescentes). Para la condición de ≤ 1 mM fue de 0.57 y la condición de 50 mM fue de 0.62. Este resultado muestra que Tv-CatD es una proteína que se encuentra en lisosomas (Figura 35).

Por medio de microscopía electrónica e inmunolocalización con oro coloidal con el anticuerpo anti-Tv-CatD se determinó la localización subcelular de Tv-CatD en parásitos crecidos en ≤ 1 mM y 50 mM de glucosa (Figura 36, paneles b, c, d, e y f). Observamos marca en el citoplasma, dentro de vesículas así como en aparato de Golgi, retículo endoplásmico y núcleo en ambas condiciones de glucosa.

Figura 34. Localización de la proteasa Tv-CatD de *T. vaginalis* crecidos en las tres condiciones de glucosa. Ensayos de inmunofluorescencia indirecta para determinar la localización de la proteína Tv-CatD de parásitos crecidos en las tres condiciones de glucosa ≤ 1 , 25 y 50 mM fijados con paraformaldehído 2% y permeabilizados. Las imágenes muestran la integridad de los parásitos del campo claro por Nomarsky (Paneles: a, e, i, m). Marcador de núcleo con DAPI (color azul; Paneles: b, f, j, ñ). Localización de Tv-CatD fluorescencia con FITC (color verde; Paneles g, k, o). Traslape de la fluorescencia (Paneles: h, i, p). Como control negativo se usó suero PI (Paneles: a-d). Las imágenes se observaron por microscopía confocal (Zeiss). La barra blanca indica la escala de medida 10 μm .

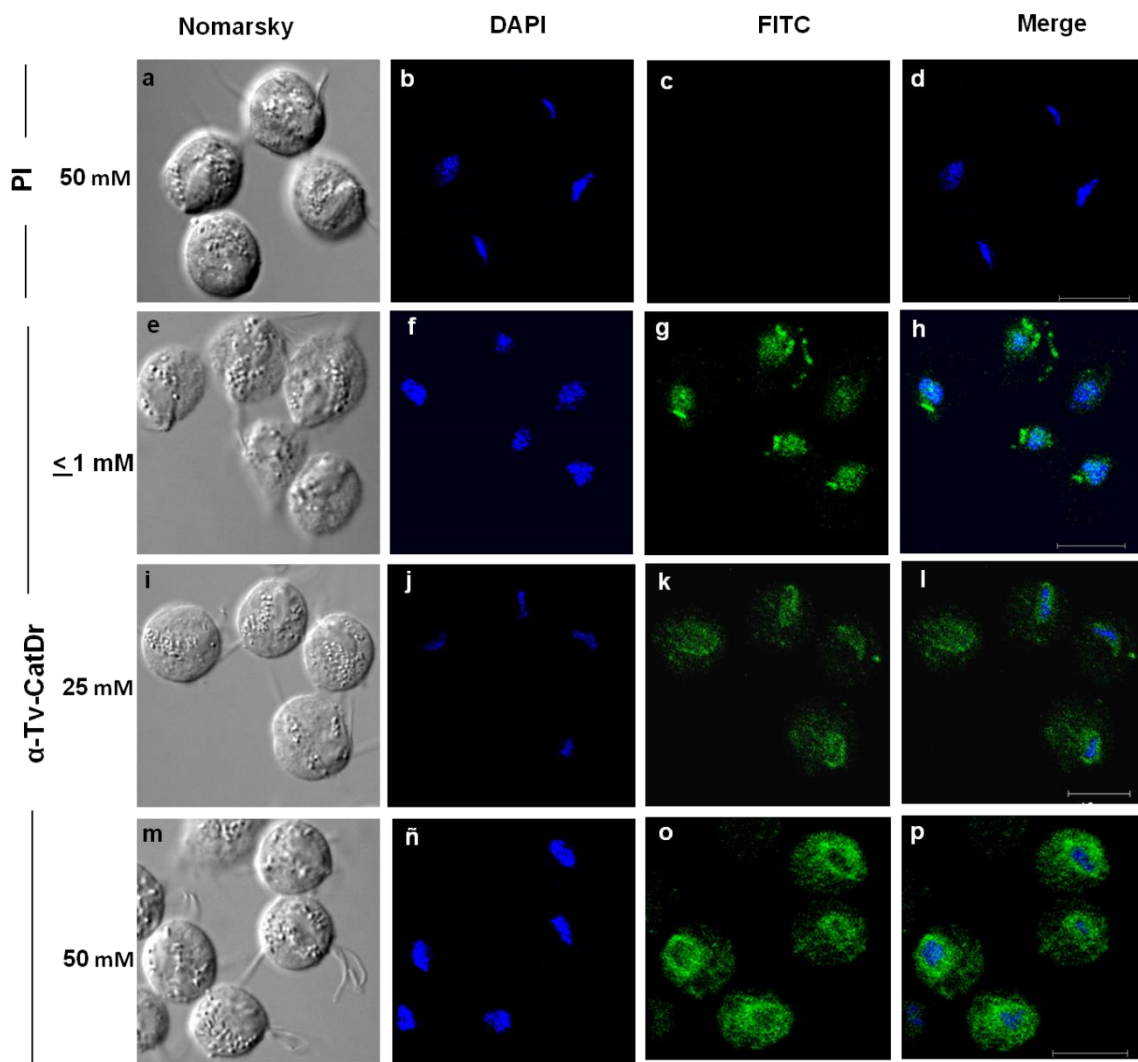


Figura 35. Colocalización de Tv-CatD en lisosomas de *T. vaginalis*. Ensayos de inmunofluorescencia indirecta de parásitos crecidos en condiciones de <1 mM y 50 mM fijados con formaldehído 4%. Las imágenes muestran la integridad de los parásitos del campo claro por Nomarsky (a). Tinción de núcleo con DAPI (color azul; panel b y g). Localización de Tv-CatD fluorescencia con FITC (color verde; Panel d, i). Marcador de lisosomas LysoTracker (color rojo; Panel c y h). Traslape de fluorescencia mostrando colocalización (color amarillo; Panel e y j). Las imágenes se observaron por microscopía confocal (Zeiss) La barra negra indica la escala de medida 10 μm .

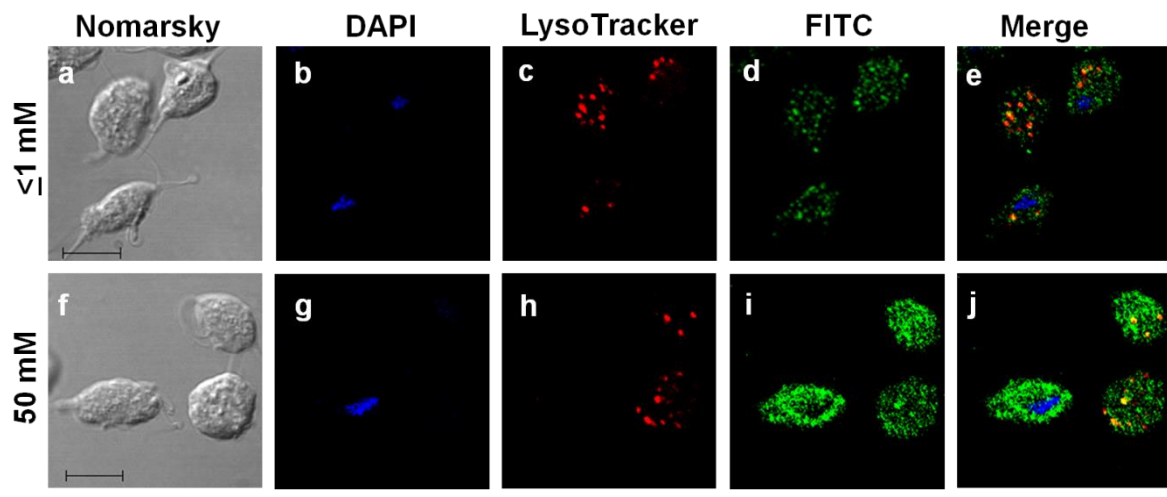
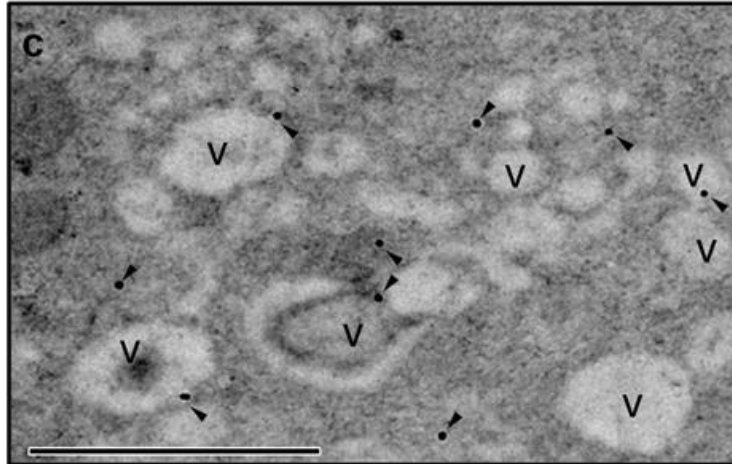
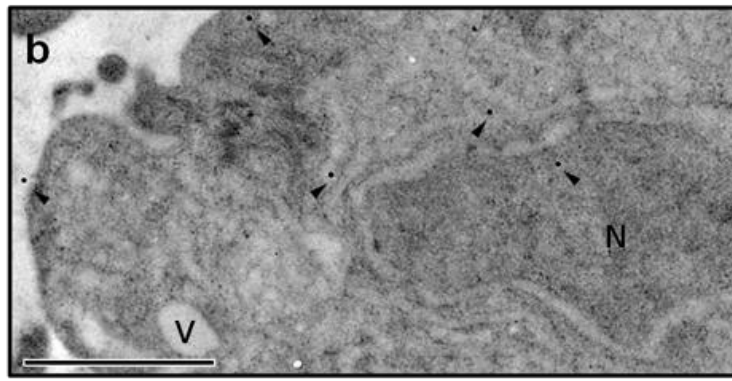
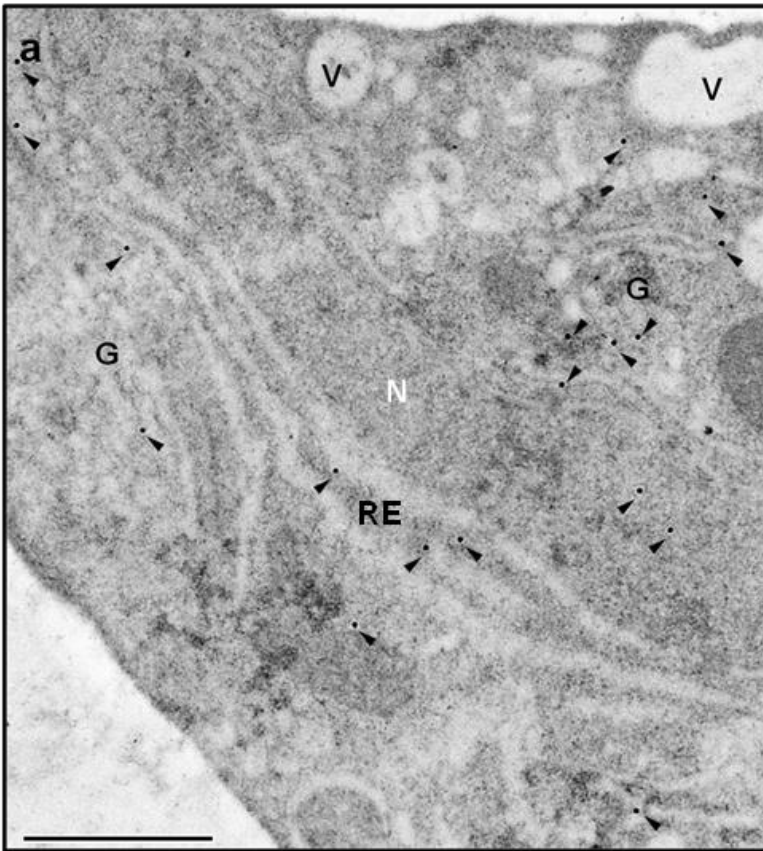
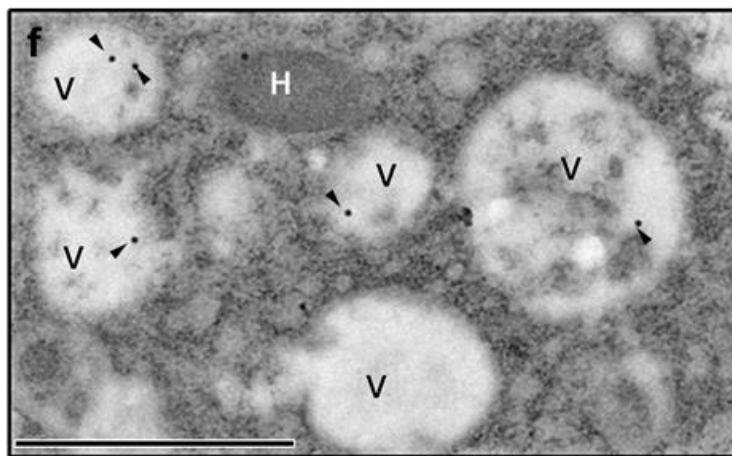
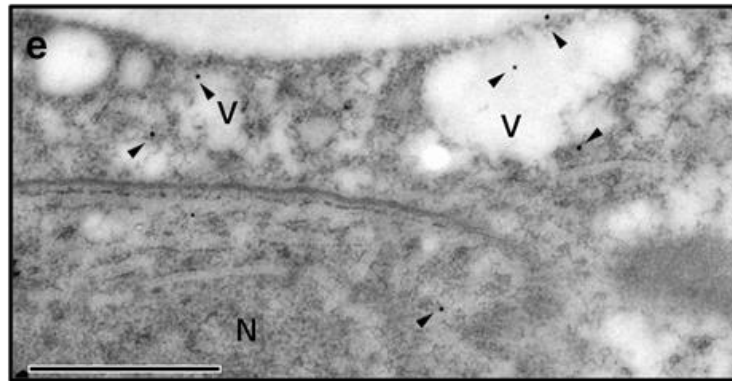
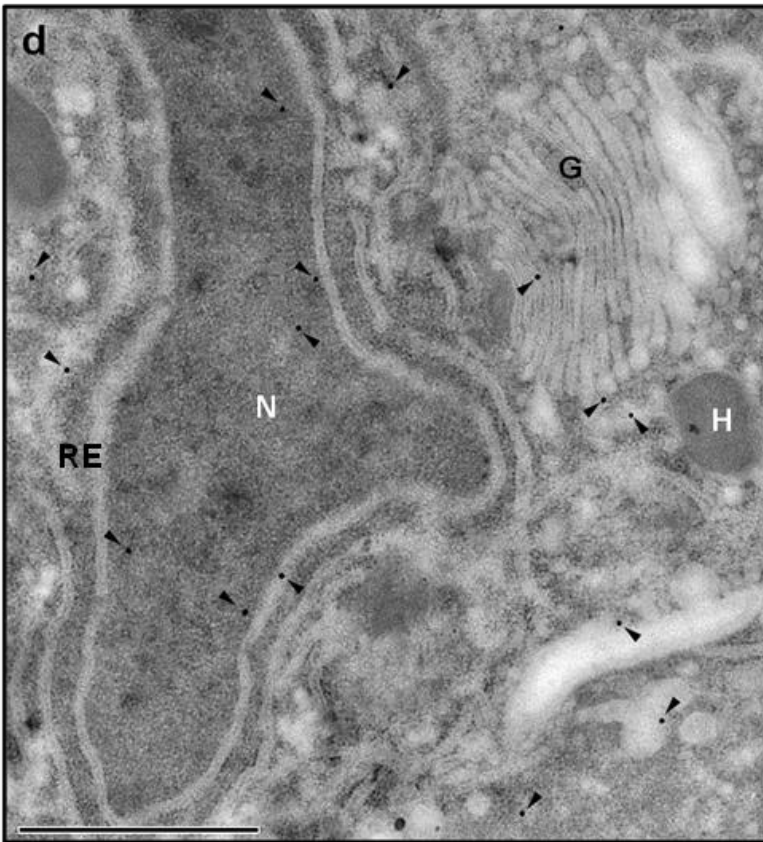


Figura 36. Localización subcelular citoplásmica de Tv-CatD en *T. vaginalis*. Inmunolocalización con oro por microscopía electrónica de transmisión. Parásitos fijados con paraformaldehído 4%-glutaraldehído 0.2% con medio sin glucosa y con 50 mM de glucosa sin suero por una 1 a 25 °C, embebidos en una resina LR white, polimerizados con luz UV a 4°C toda la noche. Obtención de cortes (60 nm), incubados con el anticuerpo anti-Tv-CatD (Dilución 1:10) seguido por un anticuerpo secundario acoplado a oro coloidal de 15 nm (Zymed; Dilución 1:25). Los cortes fueron analizados usando un microscopio electrónico de transmisión (JEOL JEM-1011). Encontramos marca citoplásmica en vesículas (V), aparato de Golgi (G), retículo endoplásmico (RE), y núcleo (N). Hidrogenosomas (H).

≤ 1 mM



50 mM



Secreción *in vitro* de Tv-CatD de *T. vaginalis* en las tres condiciones de glucosa.

El análisis *in silico* de la secuencia de la proteína sugería que posiblemente Tv-CatD se podría secretar, por lo que se procedió a probar la presencia de Tv-CatD en productos de secreción/excreción (PSE). Para determinar si Tv-CatD se secreta, se realizó un ensayo de secreción *in vitro* con parásitos crecidos en las tres condiciones de glucosa. La viabilidad de los parásitos se detectó con azul de tripano antes de poner a secretar por 1 h de incubación a 37°C, la cual fue ~100% y después de 1h de secreción fue del ~98% para las tres condiciones de glucosa ensayadas (Figura 36a).

El perfil del extracto total de proteínas de los parásitos antes y después de secreción (AS y DS) y el perfil de las proteínas de secreción precipitadas con TCA al 10% se observó en geles de poliacrilamida al 10% teñidos con azul de Coomassie (Figura 36b). Una réplica del gel se transfirió a membrana de NC y se incubó con varios anticuerpos. El anticuerpo anti-Tv-CatDr reconoció dos bandas en los productos de secreción, la banda de Tv-CatD madura (~35 kDa) y la de alto peso ~80 kDa (Figura 36d, carriles 7 al 9) en las tres condiciones de glucosa. Además se observó una relación inversa en cuanto a cantidad en ambas bandas sugiriendo una posible relación entre ellas. Para el caso del extracto total de proteínas AS y DS se observó el reconocimiento de las bandas mencionadas (Figura 36d, carriles 1 al 6). El reconocimiento del anticuerpo anti-EhHK de la hexoquinasa de *T. vaginalis*, una proteína citoplásmica (TvHK; ~50 kDa) fue utilizada como control en los extractos totales de proteínas AS y DS (Figura 36c, carriles 1 al 6) y como se esperaba no hubo reconocimiento en los productos de secreción, indicando que los parásitos no se lisaron durante el ensayo (Figura 36c, carriles 7 al 9). Además, incluimos como control positivo de secreción a la proteasa TvCP4 la cual se observó en los productos de secreción así como el extracto total (Figura 36c, carriles 1 al 9). Estos resultados muestran que la Tv-CatD es secretada por el parásito en las tres condiciones de glucosa.

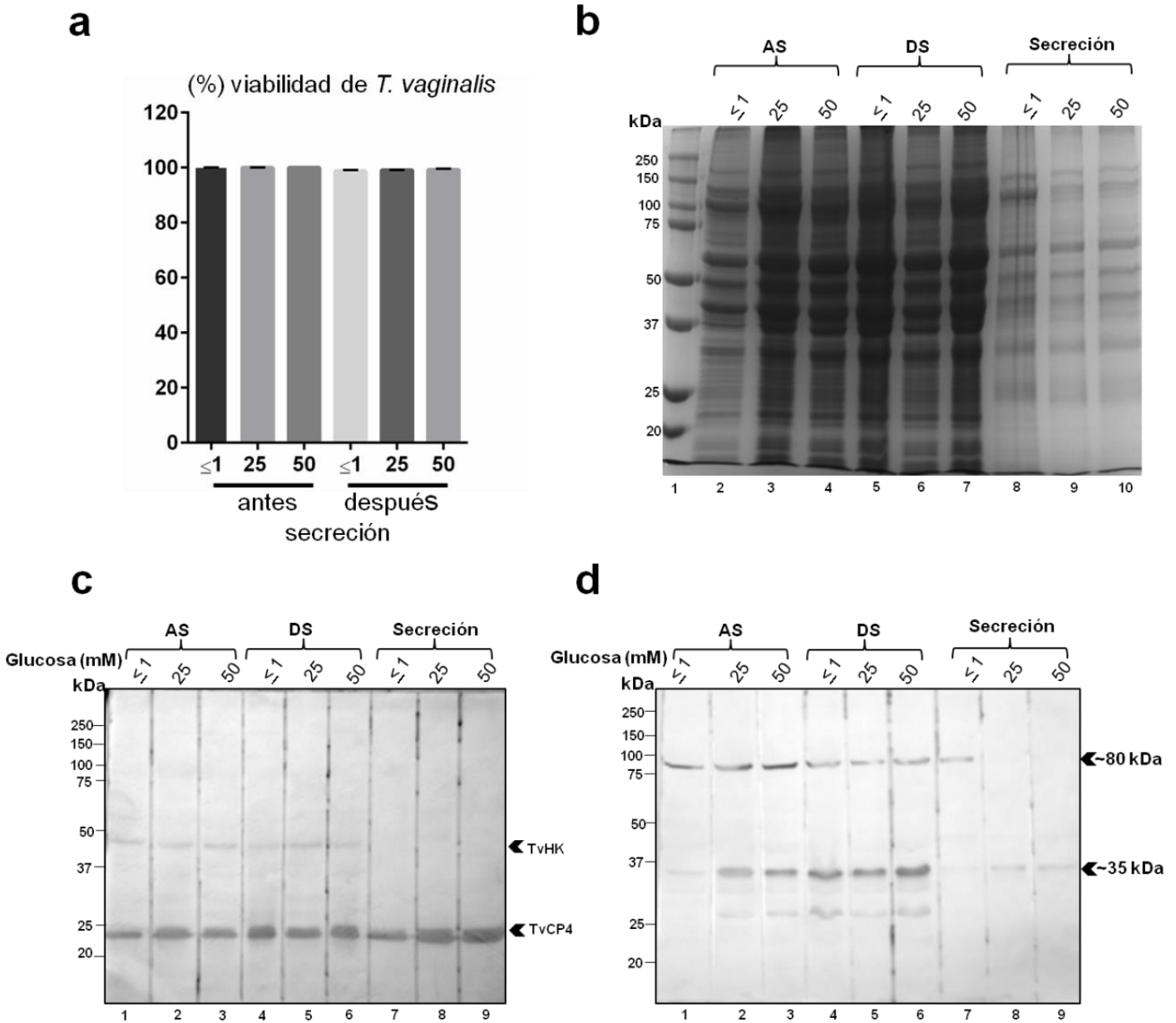


Figura 37. Secreción de Tv-CatD *in vitro* en parásitos crecidos en las tres condiciones de glucosa. La viabilidad de los parásitos se determinó por exclusión del azul de tripano. La gráfica muestra el porcentaje de viabilidad de los parásitos antes ~99% y después ~98% de la secreción (AS y DS) de los parásitos el eje de las Y corresponde al porcentaje (%) de viabilidad y el de las X indican las concentraciones (mM) de glucosa (a). Patrón del extracto total de proteínas de los

parásitos usados AS y DS y de los productos de secreción de *T. vaginalis* después de 1 h. Las proteínas se precipitaron por TCA al 10% y se separaron en gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie (b). Detección de la proteasa TvCP4 usada control positivo de secreción (carriles 2 al 9). Como control negativo de secreción se usó a la hexoquinasa (Tv-HK) (carriles 7 al 9) presente en el extracto total de proteínas pero no en las secreciones (carriles 2 al 6) (c). Reconocimiento con el anticuerpo anti-TvCatD de dos bandas de ~35 kDa y de ~80 kDa en los productos de secreción (d). Los números de la parte superior del gel y las membranas indican las concentraciones mM de glucosa. La punta de flecha indica el reconocimiento por el anticuerpo. Los números del lado izquierdo muestran el peso molecular de los marcadores (BIO-RAD).

Identificación de la proteína de 80 kDa de los productos de secreción en la condición de baja glucosa en T. vaginalis.

Para identificar la proteína correspondiente al peso molecular de 80 kDa se hicieron geles de 2-DE teñidos con el colorante azul de coomassie G-50 y duplicados de los geles se transfirieron a membranas de NC para hacer WB e incubar con el anticuerpo anti-Tv-CatDr. El anticuerpo reconoce un grupo de 4 manchas a la altura del tamaño esperado ~80 kDa con un pI ácido (Figura 38) por lo que se procedió a cortar las dos manchas más intensas. Las manchas se cortaron a partir del gel teñido con G-50 y se enviaron para su identificación por espectrometría de masas (MS). Para el caso de la mancha más pequeña no se logró identificar.

El análisis por MS de la mancha de 80 kDa mostró la identificación de un Factor Asociado a la Espermatogenesis (Tv-SAF; TVAG_318870) de *T. vaginalis* obteniendo 12 péptidos diferenciales para esta secuencia (Cuadro 9) con un pI experimental de 5.3 con porcentaje de cobertura del 15%. Obteniendo un resultado negativo de péptidos correspondientes a Tv-CatD.

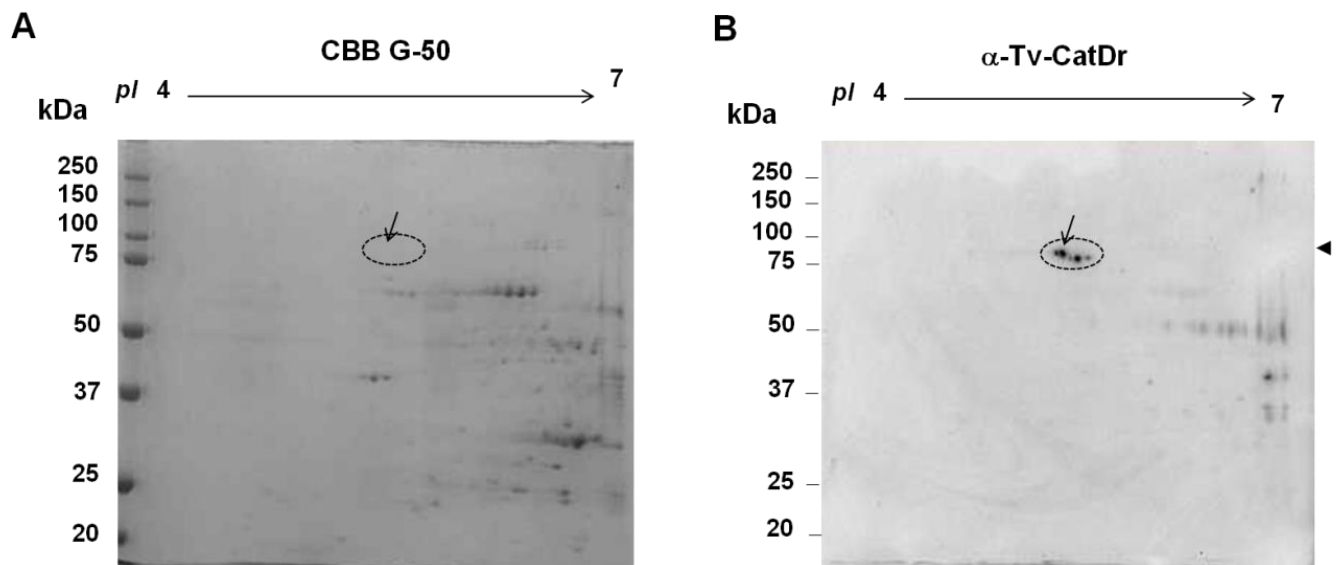


Figura 38. Identificación de la proteína de 80 kDa en productos de secreción de *T. vaginalis* en la condición de ≤ 1 mM de glucosa. Mediante el uso de geles de 2 DE se identificó la proteína de la mancha correspondiente al peso de 80 kDa. (A) Patrón de proteínas de productos de secreción de *T. vaginalis* en la condición de ≤ 1 mM de glucosa, en geles de poliacrilamida al 10% teñido con CBB-G50. (B) Geles duplicados transferidos a membranas de NC para WB con el anticuerpo anti-Tv-CatDr. Las cabezas de flecha indican el reconocimiento de las manchas por el anticuerpo. El círculo muestra la región de donde se cortaron las manchas para identificarlas por MS. La flecha dentro del círculo indica la mancha que se identificó por MS. Las flechas de la parte superior del gel indican el pH (4-7) de las tiras usadas para 2-DE. Los números de la izquierda indican la posición de los marcadores de peso molecular en kDa.

Cuadro 9. Péptidos identificados por análisis de MALDI-TOF-MS de la mancha de 80 kDa de *Trichomonas vaginalis* detectada por el anticuerpo anti-Tv-CatDr.

Número del Péptido ^a	Posición ^b	m/z (av) ^c	Secuencia de amino ácidos ^d
1	61-77	1709,05888	ATLVLVCSADTCDVGK
2	61-77	1709,05888	ATLVLVCSADTCDVGK
3	87-99	1339,66020	NLGVRPGDVVSVK
4	145-155	1137,26677	GDSFTVDALGR
5	194-205	1341,88713	NDVGYDDIGGCR
6	194-206	1468,89726	NDVGYDDIGGCRK
7	252-272	2226,97776	AIANETGAIFYLINGPEIMSK
8	252-272	2226,97776	AIANETGAIFYLINGPEIMSK
9	273-282	1095,45366	MSGESEGNLR
10	708-728	2335,84385	MAAIEKGEAVPEEDPDLYTIK
11	739-748	1033,78764	ASVSQADISR
12	739-750	1324,39006	ASVSQADISRYK

^aAsignación de numeración consecutiva de los péptidos identificados. ^bPosición de los residuos de aminoácidos (aa) de péptidos identificados en la secuencia de Tv-SAF en el genoma de *T. vaginalis*. ^c Promedio de la masa peptídica " m/z (av) identificados por MALDI-TOF-MS después de la digestión de la mancha de proteína de 80 kDa obtenida a partir de los productos de secreción en la condición de ≤ 1 mM de glucosa de *T. vaginalis* (Fig. 36). ^dPéptidos obtenidos a partir de la secuencia de Tv-SAF. El porcentaje de cobertura fue de 15%.

VIII._DISCUSIÓN

En el genoma de *T. vaginalis* se identificaron 446 genes que codifican para diferentes tipos de proteinasas, de los cuales 6 pertenecen a la familia de las aspártico proteinasas, un grupo muy pequeño (Carlton y col., 2007). El análisis de ESTs de las 6 APs en diferentes condiciones muestran un mayor número de ESTs para el gen *tv-catd* que codifica para una proteínasa de tipo catepsina D (Tv-CatD). Las condiciones ambientales como bajo hierro, baja glucosa y el contacto con las células epiteliales vaginales modulan la expresión génica en *T. vaginalis* (Figuroa-Angulo y col., 2012). Un estudio del transcriptoma de *T. vaginalis* en restricción de glucosa mostró que *tv-catd* se expresa mayoritariamente comparada con los genes para las otras APs (Huang y col., 2016). Estos datos sugieren que la concentración de glucosa puede ser un factor ambiental que regule diferencialmente la expresión del gen *tv-catd*.

La Tv-CatD pertenece al Clan AA de la Familia A1 cuyo gen se ha identificado con el TVAG_336300 y se ubica en el “contig” DS113816. La expresión de genes que codifican proteínas está altamente regulada por regiones promotoras reconocidas por la maquinaria de transcripción de la RNA polimerasa II (Johnson y Liston, 1999). La búsqueda de regiones río arriba 5' y 3' río abajo de este gen se realizó por análisis bioinformático del gen *tv-catd*, para identificar los posibles elementos reguladores descritos para los genes que codifican para proteínas en *T. vaginalis*. El núcleo promotor responsable de la transcripción basal es el elemento iniciador (Inr) con la secuencia consenso TCA+1 T/CTA que rodea al sitio de inicio de la transcripción (TSS;+1). El ~75% de los genes de *T. vaginalis* mantienen conservado este elemento ubicado 6 a 20 nt río arriba del codón de inicio de la traducción (ATG) (Johnson y Liston, 1999). El 25% restante pueden usar otros motivos: M3, M4 y M5 para direccionar al TSS (Smith y col., 2011).

El análisis de la región 5' río arriba tomando 70 nt río arriba del ATG del gen *tv-catd* muestra dos posibles elementos Inr: TCATG en la posición -7 al -11 y TCATT posición -47 al -52 río arriba del ATG. Además, se encontró un motivo M3 con la secuencia AACCGTTT en la posición -20 al -28 (Figura 10). Se propone que estos motivos pueden funcionar de manera individual o en conjunto con el elemento Inr

de manera sinérgica para la transcripción de genes direccionando el complejo de la RNA polimerasa II (RNAPol II) al TSS (Smith y Johnson, 2011; Smith y col., 2011). Hasta ahora no se han realizado más análisis de estos motivos para determinar su función en la regulación transcripcional de genes, como *tv-catd*. Además, la presencia y función de estos motivos deberá ser confirmada experimentalmente mediante ensayos funcionales permitiéndonos encontrar la región promotora del gen y ubicar el TSS por “primer extensión” o “5'-RACE”. La mayoría de los genes involucrados en la virulencia del parásito presentan una o dos copias del Inr, como encontramos en *tv-catd* en el cual el elemento más distal es generalmente el funcional (Smith y Johnson, 2011; Smith y col., 2011; Figueroa-Angulo y col., 2012). Lo que falta por investigar es si en alguna condición específica de cultivo o ambiental el gen pueda utilizar diferentes sitios de inicio de la transcripción y cuál sería la función biológica de tener TSS alternativos para este gen en el parásito.

La síntesis de un RNAm funcional en *T. vaginalis* implica la adición de la cola de poliA en el extremo 3', como ocurre en todos los eucariontes. Los motivos descritos para este mecanismo son la señal de poliadenilación (PS) con la secuencia UAAA que en algunos casos puede incluir el codón de paro de la traducción a una distancia 11 a 30 nt río arriba del sitio de corte, el sitio de corte para poliadenilación (Py(A)₀₋₃AAUU) y un elemento río abajo rico en U (DSE) ubicado a ≤ 30 nt río bajo del sitio de corte (Espinosa y col., 2002; Fuentes y col., 2012). Análisis de la región 3' regulatoria abarcando 70 nt río abajo del codón de paro nos permitió localizar los motivos descritos, *tv-catd* presenta la posible secuencia AUUU correspondiente a la PS la cual no incluye el codón de paro, el posible sitio de corte con la secuencia CAATT, así como la secuencia DSE rica en Ts (TTTTTTT) (Figura 10). La presencia de estos elementos reguladores en la región 3' regulatoria del RNAm contribuyen a la estabilidad del RNAm, la traslocación del núcleo al citoplasma y el inicio de la traducción (Fuentes y col., 2012). Sin embargo, no sabemos si las secuencias regulatorias encontradas en el RNAm de *tv-catd* son funcionales para proporcionar estabilidad al gen en ciertas condiciones ambientales.

La proteína Tv-CatD es codificada por un solo gen de un tamaño de 1113 nt que se traduce como una proteína precursora de 370 aa con un peso molecular de ~41 kDa. En el genoma esta proteína fue nombrada como una proteasa de tipo CatD por lo que abordamos la búsqueda de motivos característicos para este tipo de proteasas. La catepsina D es una proteasa con particularidades propias como la región de procesamiento. Al hacer el análisis comparativo con la CatD de humano (hCatD) la Tv-CatD tiene una identidad del ~35 %. Al hacer un alineamiento múltiple de secuencias de CatDs reportadas en otros organismos así como una proteína perteneciente a esta familia como es Pepsina A se observó que Tv-CatD parte del mismo ancestro común para la CatDs y tiene una relación más cercana filogenéticamente a la plasmepsina II de *Plasmodium falciparum* (Figura 9). Al hacer el comparativo de hCatD con Tv-CatD comparten algunas características pero carecen de otras; ambas son sintetizadas como zimógenos; sin embargo, Tv-CatD no presenta péptido señal (PS) consensado el cuál permite a las proteínas anclarse a la membrana del RE permitiendo el paso a través de éste, facilitando la entrada a la vía secretora (Nielsen y col., 1997). El PS se localiza en la secuencia N-terminal de la proteína formada por una secuencia hidrofóbica, secuencia h por aa hidrofóbicos y la secuencia de corte para la peptidasa señal caracterizada por AlaXAla formando una estructura α -hélice. Las secuencias PS pueden compartir la estructura α -hélice que les permite direccionar la llegada al RE (Walter y Johnson, 1994). Por lo que hicimos un análisis de los aa que presenta el propéptido de Tv-CatD presentando dos posibles α -hélices, a pesar de no cumplir con las características propias a nivel de secuencia de un PS, el propéptido podría funcionar como PS.

Tampoco Tv-CatD presenta la región de procesamiento, sugiriendo que no es procesada en esta región como se ha reportado en *Schistosoma sp*, *Plasmodium falciparum* o *Dictyostelium discoideum* (Wong *et al.*, 1997; Silva y col., 1999) Journet *et al.*, 1999). A pesar de no conservar todos los motivos descritos para hCatD, Tv-CatD presenta los dos residuos Asp que conforman el sitio catlítico (Figura 11), esto nos podría indicar funciones conservadas o cambios en la

funcionalidad de la proteína. El análisis de posibles modificaciones post-traduccionales mostró que esta proteína presenta dos posibles sitios de N-glicosilación. La importancia de las glicosilaciones en la hCatD es que éstas direccionan la llegada a los lisosomas. La presencia de los residuos de manosa-6-fosfato (M6P) en hCatD son reconocidos por los receptores para M6P presentes en los lisosomas donde posteriormente es procesada y activada (Zaidi y col., 2008).

En *T. vaginalis* se han descrito diferentes condiciones ambientales que modulan la expresión de genes, algunos de estos participantes en las diferentes propiedades de virulencia del parásito (Figuroa-Angulo y col., 2012). Recientemente, la glucosa ha sido incluida como un nuevo factor ambiental. El hábitat natural de *T. vaginalis* es el tracto genitourinario y se ha descrito que en secreciones vaginales la glucosa esta presente en diferentes concentraciones (Huang y col., 2014; Miranda-Ozuna y col., 2016). Sin embargo, estas concentraciones pueden verse afectadas en condiciones patológicas (Owen y Katz, 1999). La glucosa es la principal fuente de energía en los organismos pero no siempre está disponible. Por lo que los organismos se han adaptado a los cambios de concentraciones de glucosa para la supervivencia y patogenicidad. En *S. cerevisiae* la glucosa induce la expresión principalmente de genes involucrados en la glucólisis, permitiendo un aumento en la tasa de crecimiento y ciclo celular; mientras que en la condición de RG las células entran en un estado no proliferativo, disminuyendo fuertemente la transcripción de genes y síntesis de proteínas e induce la transcripción de genes de respuesta al estrés (Santangelo., 2006; Busti y col., 2010). En *C. albicans* la condición de restricción de glucosa sobrerregula la expresión de genes de respuesta al estrés, además incrementa la resistencia a fármacos antifungicos (Rodaki y col., 2009). In *P. falciparum* la condición de RG favorece la expresión de genes *var* participantes en la virulencia del parásito (Fang y col., 2004). En *E. histolytica* la condición de RG potencia el aumento en la virulencia del parásito (Tovy y col., 2011). Esto nos muestra que los organismos responden de manera diferencial a este factor ambiental.

T. vaginalis se encuentra expuesta a diferentes concentraciones de glucosa durante una infección vaginal (Miranda-Ozuna y col., 2016). La condición de AG aumenta la división celular, proliferación e interacción con la matriz extracelular; mientras que, la condición de RG aumenta la expresión de genes relacionados a la supervivencia celular, capacidad antioxidativa y autofagia (Huang y col., 2014; Miranda-Ozuna y col., 2016).

En base a lo anterior, nos interesó estudiar el efecto de la glucosa en la expresión y localización Tv-CatD por lo que identificamos y caracterizamos a la primera Aspártico proteasa de *T. vaginalis*. A nivel de expresión del transcrito observamos que se regula positivamente (Figura 12). Este resultado es diferente a lo encontrado por análisis de ESTs y transcriptómica en donde se reporta que la condición de RG regula su expresión. La diferencia observada en glucosa en respuesta a la expresión del gen *tv-catd* puede estar relacionada al tipo de aislado. Los aislados de *T. vaginalis* se encuentran genotipificados en dos grupos, Tipo 1 y Tipo 2, y algunos genes muestran expresión diferencial dependiendo del aislado (Conrad y col., 2012). El aislado usado en este trabajo es del tipo 2 y el aislado usado para la secuenciación del genoma, estudios de ESTs y el transcriptoma es de Tipo 1.

A partir de este resultado amplificamos la secuencia codificante del gen completo ~1113 pb para clonar en el vector de transición (Figura 13) con la finalidad de secuenciar el fragmento y posteriormente subclonar en el vector de expresión. La secuencia obtenida del aislado CNCD 188 de Tv presenta dos cambios de bases con la secuencia del genoma que no alteran la secuencia de aa (Figura 14); estos cambios los consideramos propios del aislado usado. El fragmento obtenido se subclonó en el vector de expresión (Figura 15) para obtener la proteína recombinante Tv-CatDr con un peso molecular mayor a ~41 kDa (zimógeno) por la adición de la cola de His (Figura 17), para obtener los anticuerpos policlonales anti-Tv-CatD (Fig. 17). Estos anticuerpos fueron la herramienta primordial de trabajo usada para la caracterización de Tv-CatD en el parásito.

Una vez demostrado que la glucosa regula positivamente la expresión de *tv-catd* a nivel de RNAm, se evaluó el efecto de la glucosa a nivel de proteína empleando el

anticuerpo anti-Tv-CatD en presencia de extractos totales de proteínas y extractos resistentes a proteasas. La diferencia entre estos extractos radica en la forma como se obtiene cada uno. En TPE, las proteínas de los parásitos son precipitadas inmediatamente con TCA al 10% inactivando rápidamente la actividad de enzimas hidrolíticas obteniendo un extracto total de las proteínas de *T. vaginalis*. En PRE, la obtención de las proteínas se hace en presencia de un detergente suave y en ausencia de inhibidores de proteasas, lo que permite la actividad de enzimas hidrolíticas que degradan a todas las proteínas susceptibles, y quedan sólo las proteínas que hayan resistido a la degradación de estas enzimas. El anticuerpo anti-Tv-CatD en TPE detecta 4 bandas (Figura 18); una banda regulada positivamente por glucosa de ~ 35 kDa que por el peso molecular sugerimos que se trata de Tv-CatD madura, dos bandas por debajo de este peso ~32 y ~28 kDa posiblemente se tratan de productos de su procesamiento. Además, encontramos una banda de mayor peso molecular ~80 kDa. Sin embargo, proteasas de esta familia en parásitos se propone que pueden dimerizarse como el caso para *A.aegypti* y *T.cruzi* (Cho y col., 1991; Pinho y col., 2009).

Para el caso de PRE el anticuerpo reconoce sólo dos bandas (Figura 19); la banda esperada de ~35 kDa regulada positivamente por glucosa y una banda ~41 kDa que por el peso molecular se propone corresponda al precursor de Tv-CatD. Ambos resultados mostraron que la banda de ~35 kDa, la cual proponemos que es la Tv-CatD madura, se regula positivamente por glucosa. Los niveles tanto de transcrito y cantidad de Tv-CatD correlacionan.

A partir de geles 2-DE en ≤ 1 mM y 50 mM de glucosa se hicieron WB, el anticuerpo α -Tv-CatDr reconoció una mancha de ~ 35 kDa para la condición ≤ 1 mM de glucosa y dos manchas una con el peso molecular de ~35 kDa y otra de ~28 kDa con el mismo *pI* ácido (Figura 20) correspondiente al *pI* teórico (4.6). Observando nuevamente mayor cantidad de proteína en la condición 50 mM de glucosa. Sólo la mancha de ~35 kDa se cortó, porque la mancha de ~28 kDa no se logró detectar en el degradoma (Fig. 20a), para enviar a identificar por MS (Cuadro 9). Los pesos de las CatD varia se pueden encontrar como zimogénos o

la forma madura (Zaidi y col., 2008). La CatD de *Aedes aegypti* se identificó como una sola mancha con un *pI* ácido demostrando que es una proteína monomérica (Cho y col., 1990) resultado similar se observó para Tv-CatD. Del análisis de MS se obtuvieron 8 péptidos diferenciales para esta proteasa (Cuadro 9) los cuales se localizaron en la secuencia de aa de la región madura (Figura 21). Este resultado nos corrobora que la banda y mancha de ~35 kDa que reconoce el anticuerpo anti-Tv-CatD corresponden a la Tv-CatD madura con un *pI* experimental de 5.0.

Las CatDs participan en eventos importantes del sistema de degradación intracelular (Zaidi y col., 2008). Hasta este momento desconocíamos si Tv-CatD tiene actividad proteolítica en el parásito, por lo que se probó si se encontraba activa en los extractos resistentes a proteasas mediante el uso de sustratos para CatD. Probamos el sustrato específico fluorogénico para CatD/E con extractos de tricomonas a diferentes pH (Figura 22) detectando actividad proteolítica en las dos condiciones de glucosa en el rango de pH de 3.5 a 4.5 para Tv-CatD; este resultado es similar con lo reportado para la activación de CatDs (Minarowska y col., 2008). Detectamos variaciones respecto a la actividad entre ambas condiciones de glucosa a pH 4.5, la actividad es ligeramente mayor en la condición ≤ 1 mM de glucosa, comparada con 50 mM de glucosa (Figura 22) pero estas diferencias no son significativas con los otros pHs probados. Sin embargo, al comparar cantidad de proteasa y actividad proteolítica se encontró una relación inversa, ya que la cantidad de Tv-CatD se encuentra disminuida mientras que la actividad proteolítica está aumentada en la condición de < 1 mM de glucosa. Existen pocos reportes con este comportamiento, tal es el caso de la CatD de *P. sicula* (lagarto) se reportó una relación inversa entre la cantidad de transcrito y la actividad proteolítica (Stasio y col., 1999). Además, las modificaciones post-traduccionales como las N-glicosilaciones tienen un efecto en la actividad de la pepsina, una proteasa perteneciente a la familia CatD. La presencia de carbohidratos añade rigidez a la estructura de la proteína reduciendo la movilidad y confiriéndole un incremento en la estabilidad de la proteína (Yoshimasu y col., 2004). Tv-CatD presenta dos posibles sitios de N-glicosilación por lo que

consideramos la posibilidad de que este evento podría estar influenciando la actividad.

Por ahora manejamos las siguientes hipótesis respecto al aumento en la actividad proteolítica de Tv-CatD en ≤ 1 mM de glucosa. 1) CatD se asocia con la degradación de cistatinas, inhibidores endógenos de CPs (Železnik *et al.*, 2015). *T. vaginalis* tiene 3 inhibidores endógenos de tipo cistatina (tricocistatinas) los cuales podrían ayudar a controlar la actividad de las CPs del parásito (Figueroa-Angulo y col., 2012). Por lo que el incremento de la actividad de Tv-CatD podría estar asociado a proteinasas las cuales se modulan diferencialmente respecto a la condición ambiental, como lo vemos en los geles de actividad de 2-DE donde detectamos la actividad de hemoglobinasa (Figura 32) una mayor actividad en el rango de los marcadores 75 kDa-50 kDa mientras que se observa una disminución de la actividad por arriba del marcador de 20 kDa, sin embargo para la condición de 50 mM de glucosa el comportamiento es inverso. Una mayor actividad proteolítica de CPs, representaría mayor degradación de las tricocistatinas por Tv-CatD, entonces las CPs tendrán mayor actividad proteolítica para degradar diferentes componentes celulares.

2) La autofagia es un proceso celular de supervivencia celular usado en condiciones de estrés celular, al cual se ha asociado la participación de la actividad de CatD en la última etapa de degradación en el autolisosoma (Alves y col., 2014). Recientemente se reportó que en la condición de RG se induce la autofagia en *T. vaginalis* (Huang y col., 2014) por lo que se el aumento observado de la actividad proteolítica de la Tv-CatD podría estar relacionado con la necesidad de esta actividad en la última etapa degradativa en la autofagia inducida en RG. Por lo que surgen las siguientes preguntas: ¿Cuál es la regulación a nivel de actividad proteolítica? ¿Cómo la glucosa regula la actividad de Tv-CatD? Son preguntas que en un futuro podríamos explorar respecto a la relación entre la actividad proteolítica de Tv-CatD y la glucosa.

Para seguir con la caracterización de la molécula a nivel de actividad usamos inhibidores para la familia de las APs como Pepstatina A y DAN (Kay, 1985; Rajagopalan y col., 1966). El efecto de la pepstatina A, el inhibidor típico de APs,

en la actividad proteolítica de Tv-CatD se midió la actividad proteolítica en presencia y en ausencia de la pepstatina A utilizando un sustrato fluorogénico y zimografía. Los ensayo de actividad usando el sustrato fluorogénico en presencia de pepstatina A (40, 80 y 160 μM) no mostraron un efecto inhibitor de la actividad de Tv-CatD (Figura 23). En las zimografías mas probamos concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 μM de pepstatina A en zimogramas copolimerizados con gelatina como sustrato (Figura 24) y activados a pH 4.5. Nuestros resultados mostraron que la Tv-CatD no se inhibía por pepstatina A, además de que la actividad de CPs era mayor, por lo que se complicaba observar el efecto de inhibición. Por lo que se usó TLCK como un inhibidor de CPs, que dejara libre la actividad de las APs. Sin embargo, cuando combinamos ambos inhibidores esperabamos apagar la actividad de las proteasas por completo. El resultado no fue el esperado, ya que TLCK abatió la actividad de todas las bandas con actividad proteolítica a los diferentes pHs de activación probados (Figura 26 y 27). La variable que consideramos cambiar para los siguientes experimentos fue el sustrato de gelatina por hemoglobina (Hb), uno de los sustratos para CatD (Sun y col., 2013). Los resultados mostraron que en presencia de TLCK y pepstatina A (Figura 28), la inhibición de la actividad proteolítica fue casi completa. El pH óptimo para la actividad proteolítica de las hemoglobinasas fue a pH 4.5 (Figura 29). A partir de este resultado consideramos trabajar sólo con el inhibidor de pesptatina A aumentando la concentración de 300 μM a 1 y 3 mM (Figura 28 y 29).

Tomando en cuenta que para el reconocimiento de la Tv-CatD en los los extractos de *T. vaginalis* aumentamos la concentración de proteínas (~80 μg) de estos extractos, prácticamente 3 veces a las usadas para otras proteínas (30 μg) estudiadas en el laboratorio, nos sugiere que Tv-CatD es una proteína poco abundante y posiblemente por ello en geles de 1 D no observamos la actividad proteolítica en la región esperada.

Estos resultados sugerían que, Tv-CatD era una AP resistente a pepstatina A como la AP de *L. mexicana* (Valdivieso y col., 2007) ó bien que el reactivo usado no estuviera funcionando y por ello no observamos inhibición. Por lo que se probó un nuevo lote de pepstatina A y tampoco se observó inhibición ni con el

sustrato fluorogénico ni en los zimogramas. Adicionalmente se probó otro inhibidor de APs, el DAN. Los resultados fueron similares, tampoco Tv-CatD es sensible a la inhibición por este inhibidor (Figura 30) a pesar de conservar el sitio catalítico característica importante perteneciente a esta familia. Existen reporte de APs insensibles a pepstatina pero sensibles a DAN en bacterias y parásitos (Toogood y col., 1995; Valdivieso y col., 2006). Lo interesante es que Tv-CatD es resistente a ambos inhibidores. Hasta la fecha no es claro como es el mecanismo de inhibición respecto a la insensibilidad de un inhibidor respecto al otro.

Tv-CatD mostró sensibilidad a Cu^{2+} en ensayos donde se utilizó el extracto fluorogénico como en zimogramas de 2DE con Hb (Figura 31 y 32). Con estos experimentos identificamos la actividad de hemoglobinasa de Tv-CatD en el degradoma (Figura 32), por otro lado, volvimos a confirmar que pepstatina A no tiene un efecto inhibidor sobre la actividad de hemoglobinasa de Tv-CatD (Figura 33).

El resultado obtenido del efecto inhibidor de Cu^{2+} en la actividad proteolítica en *T. vaginalis* específicamente para la familia de APs hasta el momento no existen reportes por lo que se vuelve novedoso para su estudio en la virulencia del parásito.

Se conoce que el Cu^{2+} en APs induce a una condición de estrés provocando una disminución en la actividad proteolítica (Karmous y col., 2012). La plasmepsina II considerada homóloga de CatD en *Plasmodium falciparum* es inhibida por Cu^{2+} sugiriéndolo como un tratamiento antimalaria (Mohapatra y col., 2010). Nuestro resultado mostró una característica propia de Tv-CatD en la actividad proteolítica en presencia de Cu^{2+} .

Conociendo que la glucosa regula positivamente la cantidad de Tv-CatD determinamos la localización de esta en parásitos crecidos en las tres condiciones de glucosa por inmunofluorescencia indirecta y microscopía electrónica. En el análisis por microscopía confocal se observó que la glucosa regula positivamente la localización de Tv-CatD en el parásito; además, encontramos marca focalizada

cercana al núcleo (posiblemente aparato de Golgi) en la condición RG así como en núcleo. Mientras que en la condición de AG observamos localización perinuclear muy marcada pero con menor intensidad en la condición de NG, aunque en ambas condiciones se sigue observando señal en el núcleo (Figura 34). Para probar la hipótesis de que Tv-CatD es una proteasa lisosomal, usamos un marcador de este organelo en la condiciones de baja y alta glucosa. Los resultados de colocalización mostraron que Tv-CatD se encuentra en lisosomas (Figura 35). Mediante el uso de microscopía electrónica encontramos marca en el citoplasma, vesículas (algunas corresponden a lisosomas), aparato de Golgi (AG), y núcleo (Figura 36) en las condiciones de glucosa analizadas. Encontrar marca en algunos de estos organelos era esperado (Vidonio y col., 2016), la marca perinuclear sugerimos que podría tratarse de retículo endoplásmico cuando se encuentra en la etapa inicial de procesamiento de Tv-CatD, en Aparato de Golgi sitio dónde las proteínas sufren modificaciones post-traduccionales algunas de las cuales se encontraron en el análisis *in silico* para Tv-CatD como fosforilaciones y glicosilaciones. La localización en vesículas como lisosomas es la ruta de transporte en compartimentos endolisosomales para finalmente llegar a lisosomas. Posiblemente en este organelo Tv-CatD puede ser procesada a su forma madura a través de la vía autocatalítica a pH ácido ó la participación de otras proteasas para remover el péptido dejando expuesto el sitio catalítico de Tv-CatD (Masa *et al.*, 2006; Fusek and Vetvicka, 2005).

La localización en el núcleo fue sorprendente; sin embargo, mediante el análisis bioinformático se encontró una señal de localización nuclear en la secuencia del propéptido (Trabajo en revisión; Miranda-Ozuna, 2017). Algunos reportes muestran que CatD se localiza en el núcleo; generando el corte de la Histona 3 lo cual se asocia a la diferenciación celular que participa en el proceso involutivo durante la cesación de la lactancia. El importe nuclear se favorece por modificaciones postraduccionales como nitración (Khalkhali-Ellis *et al.*, 2014). Por otro lado, en células de cáncer de mamá CatD interactúa con factor de transcripción como el TRSP1, actuando como un represor transcripcional

independiente de su actividad proteolítica y promoviendo la progresión del ciclo celular y metástasis de células cancerígenas (Bach y col., 2015). No existen reportes de CatD nuclear en parásitos por lo que esto abre una ventana para explorar la función de Tv-CatD en el núcleo.

El análisis *in silico* usando el servidor (Secretome P 2.0) predijo que Tv-CatD puede ser una proteína que se secrete, por lo que recurrimos a investigar esta posibilidad. Mediante ensayos de secreción *in vitro* se determinó que Tv-CatD se secreta en las tres condiciones de glucosa (Figura 37). En gusanos parásitos del hombre, la CatD que se secreta participa en la degradación de proteínas del suero y macromoléculas de la piel (Williamson y col., 2002). En algunas células cancerígenas hay una hipersecreción de CatD la cual participa en la degradación de quimiocinas que involucradas en el reclutamiento de células efectoras al sitio del tumor (Wolf y col., 2003) durante la respuesta inflamatoria. Por lo que se considera que CatD contribuye a la progresión y metástasis del cáncer de ovario y próstático (Pruitt y col., 2013; Minarowska *et al.*, 2008). Curiosamente, la tricomonosis se considera un factor de riesgo para la susceptibilidad al cáncer cérvicouterino y prostático, aunque todavía se desconoce el mecanismo. Por lo que surge una nueva pregunta. ¿Será Tv-CatD una de las moléculas que participan en este mecanismo?

Finalmente identificamos la proteína del peso de ~80 kDa reconocida por el anticuerpo α -Tv-CatDr (Figura 38) en los productos de secreción en la condición de baja glucosa ya que observamos una mayor cantidad de esta proteína.

Los péptidos identificados (Cuadro 9) corresponde a la proteína SAF una proteína miembro de la familia CD48 participantes en procesos celulares como degradación de proteínas, formación del huso mitótico durante la meiosis y el desensamble de microtúbulos (Coles y col., 1999). A pesar de obtener un resultado negativo para identificar péptidos correspondientes a la proteína Tv-CatD consideramos la baja abundancia de esta proteína. El reconocimiento de SAF con el anticuerpo generado contra Tv-CatDr podría indicar una relación entre estas proteínas. Coles

y col., 1999 demostraron una relación evolutiva a nivel estructural presente entre la familia de SAF y las APs se trata de un dominio tipo barril $\beta\beta\alpha\beta$. Estudios futuros son necesarios para responder esta hipótesis.

IX. CONCLUSIONES

1. El gen *tv-catd* podría tener dos sitios Inr funcionales y presentar un motivo 3' alternativo para la regulación transcripcional del gen. Además, la región 3' regulatoria presenta los posibles motivos consenso para la señal de poliadenilación en *T. vaginalis*. A nivel de secuencia de aa, Tv-CatD presenta algunos cambios con respecto a lo reportado para la proteasa hCatD.

2. La glucosa regula positivamente la expresión del gen y la cantidad de proteína Tv-CatD. Sin embargo, la cantidad de proteína no correlaciona con actividad proteolítica a pH 4.5.

3. Identificamos la mancha correspondiente a Tv-CatD madura por WB y MS, la cual está activa y presenta actividad de hemoglobinasas.

4. La glucosa regula la localización subcelular de Tv-CatD en las diferentes organelas del citoplasma (vesículas, RE, aparato de Golgi, lisosomas), en el núcleo y además se secreta *in vitro*.

5. El pH óptimo de la actividad proteolítica de la Tv-CatD se encuentra en el rango de 3.5-4.5. Una característica novedosa es que esta AP de Tv es resistente a la inhibición por pepstatina A y DAN y susceptible a la inhibición por cobre.

X. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO

- ✓ Identificar la región promotora del gen *tv-catd* de respuesta a Glucosa.
- ✓ Determinar si participa en la activación de otras proteasas en *T. vaginalis*.
- ✓ Demostrar si Tv-CatD tiene como blanco la degradación de inhibidores endógenos (tricocistatinas) para proteasas de tipo cisteínas.
- ✓ Determinar la participación de Tv-CatD en propiedades de virulencia de *T. vaginalis* como es la citotoxicidad.
- ✓ Investigar si Tv-CatD participa en el proceso de autofagia en *T. vaginalis*
- ✓ Identificar si Tv-CatD se encuentra en el núcleo participando en algún proceso.
- ✓ Investigar si existe una relación entre Tv-Cat y Tv-SAF en *T. vaginalis*.
- ✓ Investigar si Tv-CatD es un nuevo factor de virulencia en hemólisis ya que se encuentra degradando hemoglobina.
- ✓ Investigar si Tv-CatD esta implicada en la susceptibilidad al cáncer cérvico-uterino y prostático.

XI. REFERENCIAS

Alderete JF, Garza GE. 1985. Specific Nature of *Trichomonas vaginalis* Parasitism of host cell surfaces. *Infect Immun* 50 (3):701-708.

Alderete JF, Garza GE. 1988. Identification and properties of *Trichomonas vaginalis* proteins involved in cytoadherence. *Infect Immun.* (56):28–33.

Alderete JF, Demes A, Gombosova P, Valent M, Fabusova M, Janoska A, Stefanovit A, Arroyo R. (1988). Specific parasitism of purified vaginal epithelial cells by *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun.* 56 (10):2558–62.

Alderete JF, Engbring JA. 1998. Characterization of *Trichomonas vaginalis* AP33 adhesin and cell surface interactive domains. *Microbiol.* 144 (11):3011-3018.

Alderete JF, Newton E, Dennis C, Engbring J, Neale KA. 1991. Vaginal antibody of patients with trichomoniasis is to a prominent surface immunogen of *Trichomonas vaginalis*. *Genitourin Med.* 67 (3):220-225.

Alderete JF, Provenzano D, Lehker, MW. 1995. Iron mediates *Trichomonas vaginalis* resistance to complement lysis. *Microb Pathog.* 19 (2):93–103.

Alderete JF. 1999. Iron modulates phenotypic variation and phosphorylation of P270 in double-stranded RNA virus-infected *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun.* 67 (8): 4298-302.

Alvarez-Sánchez ME, Avila-González L, Becerril-García C, Fattel-Facenda LV, Ortega-López J, Arroyo R. 2000. A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity. *Microb Pathog.* 28 (4) 193-202.

Alves S, Cormier-Dequaire F, Marinello M, Marais T, Muriel MP, Beaumatin F, Charbonnier-Beaupel F, Tahiri K, Seilhean D, El Hachimi K, Ruberg M, Stevanin G, Barkats M, den Dunnen W, Priault M, Brice A, Durr A, Corvol JC, Sittler A. 2014. The autophagy/lysosome pathway is impaired in SCA7 patients and SCA7 knock-in mice. *Acta Neuropathol.* 128(5) 705-722.

Arroyo R, Alderete JF. 1989. *Trichomonas vaginalis* Surface Proteinase Activity Is Necessary for Parasite Adherence to Epithelial Cells. *Infect Immun.* 57 (10):2991-2997.

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

Arroyo R, Gonzalez-Robles A, Martinez-Palomo A, Alderete JF. 1993. Signaling of *Trichomonas vaginalis* for amoeboid transformation and adhesin synthesis. follows cytoadherence. *Mol Microb.* 7 (2):299-309.

Arroyo R, Ortega-López J. 2010. Efecto del hierro en la biología de *Trichomonas vaginalis* y *Trichomonas foetus*. Capítulo 16. 1 Edición. Patógenos vs hospedero. 424-445.

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 (3):279-285.

Bach AS, Derocq D, Laurent-Matha V, Montcourrier P, Sebti S, Orsetti B, Theillet C, Gongora C, Patingre S, Ibing E, Roger P, Linares L, Reinheckel T, Meurice G, Kaiser FJ, Gespach C, Liaudet-Coopman E. 2015. Nuclear cathepsin D enhances TRPS1 transcriptional repressor function to regulate cell cycle progression and transformation in human breast cancer cells. *Oncotarget.* 6 (29). 28084-28103.

Bailly E, Savel J, Mahouy G, Jaureguiberry G. 1991. *Plasmodium falciparum*: .isolation and characterization of a 55-kDa protease with a cathepsin D-like activity from *P. falciparum*. *Exp Parasitol.* 72 (3) 278-284.

Baldwin ET, Bhat TN, Gulnik S, Hosur MV, Sowder RC, Cachau RE, Collins J, Silva AM, Erickson JW. 1993. Crystal structures of native and inhibited forms of human cathepsin D: implications for lysosomal targeting and drug design. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90 (14.) 6796-6800.

Barrett Alan J. 1999. Peptidases: a view of classification and nomenclature. MCBU Molecular and Cell Biology Updates. P. 1-12.

Barrett AJ. 1997. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NCIUBMB). EnzymeNomenclature. Eur J Biochem. 15;250 (1):1-6.

Benchimol M. 2004. Trichomonads under microscopy. Microsc Microanal. 10 (5):528–550.

Benes P, Vetvicka V, Fusek M. 2008. Cathepsin D many functions of one aspartic protease Crit Rev Oncol Hematol. 68 (1) 12-28.

Boonacker EP, Wierenga EA, Smits HH, Van Noorden CJ. 2002. CD26/DPPIV signal transduction function, but not proteolytic activity, is directly related to its expression level on human Th1 and Th2 cell lines as detected with living cell cytochemistry. J Histochem Cytochem. 50 (9) 1169-1177.

Brindley PJ, Kalinna BH, Wong JY, Bogitsh BJ, King LT, Smyth DJ, Verity CK, Abbenante G, Brinkworth RI, Fairlie DP, Smythe ML, Milburn PJ, Bielefeldt-Ohmann H, Zheng Y, McManus DP. 2001. Proteolysis of human hemoglobin by schistosome cathepsin D. Mol Biochem Parasitol. 112 (1) 103-112.

Brinkworth RI, Prociv P, Loukas A, Brindley PJ. 2001. Hemoglobin-degrading, aspartic proteases of blood-feeding parasites: substrate specificity revealed by homology models. J Biol Chem. 276 (42) 38844-38851.

Busti S, Coccetti P, Alberghina L, Vanoni M. 2010. Glucose signaling-mediated coordination of cell growth and cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. Sensors (Basel). 10 (6) 6195-6240.

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(13):958-68.

Carlton JM, Hirt RP, Silva JC. *et al.* 2007. Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis* *Science*, 315 (5809) 207–212.

Cho WL, Dhadialla TS, Raikhel AS. 1991. Purification and characterization of a lysosomal aspartic protease with cathepsin D activity from the mosquito. *Insect Biochem.* 21 (2) 165-176.

Coles M, Diercks T, Liermann J, Gröger A, Rockel B, Baumeister W, Koretke KK, Lupas A, Peters J, Kessler H.1999. The solution structure of VAT-N reveals a 'missing link' in the evolution of complex enzymes from a simple $\beta\alpha\beta\beta$ element. *Curr Biol.* 9 (20)1158–1168.

Conrad MD, Gorman AW, Schillinger JA, Fiori PL, Arroyo R, Malla N, Dubey ML, Gonzalez J, Blank S, Secor WE, Carlton JM. 2012. Extensive genetic diversity, unique population structure and evidence of genetic exchange in the sexually transmitted parasite *Trichomonas vaginalis*. *PLoS Negl Trop Dis.* 6 (3) e1573.

Coombs GH, Goldberg DE, Klemba M, Berry C, Kay J, Mottram JC. 2001. Aspartic proteases of *Plasmodium falciparum* and other parasitic protozoa as drug targets. *Trends Parasitol.* 17 (11) 532-537.

Dailey DC, Chang TH, Alderete JF. 1990. Characterization of *Trichomonas vaginalis* haemolysis. *Parasitology.* 101 (2):171-5.

Davies DR. 1990. The structure and function of the aspartic proteinases. *Annu Rev Biophys Chem.* 19 189-215.

Espinosa N, Hernández R, López-Griego L, López-Villaseñor I. 2002. Separable putative polyadenylation and cleavage motifs in *Trichomonas vaginalis* mRNAs. *Gene.* 289 (1-2) 81-86.

Fang J, Zhou H, Rathore D, Sullivan M, Su XZ, McCutchan TF. 2004. Ambient glucose concentration and gene expression in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* 133 (1).125-129.

Figuroa-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 effects of environmental factors on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. *Microbes Infect.* 14 (15) 1411-1427.

Fiori P.L, Rappelli P, Filippa M.A. 1999. The flagellated parasite *Trichomonas vaginalis*: new insights into cytopathogenicity mechanisms. *Microbiol Infec.* 1 (2):149–156.

Fusek M, Vetvicka V. (2005). Dual role of cathepsin D: ligand and protease. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 149 (1) 43-50.

Garcia AF, Chang TH, Benchimol M, Jichaek KD, Lehker MW, Alderete JF. 2003. Iron and contact with host cells induce expression of adhesins on surface of *Trichomonas vaginalis*. *Mol Microbiol.* 47 (5):1207–1224.

Gillin FD, Sher A. 1981. Activation of the alternative complement pathway by *Trichomonas vaginalis*. *Infec Immun.* 34 (1): 268-273.

Goswami T, Rolfs A, Hediger MA. 2002. Iron transport: emerging roles in health and disease. *Biochem Cell Biol.* 80(5):679-89.

Harlow D, Lane E. 1988. *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, NY, USA.

Harp DF, Chowdhury I. 2011. Review Trichomoniasis: evaluation to execution. *Obs Gynecol Reprod Biol.* 157 (1):3–9.

Hernández H, Sariago I, Garber G, Delgado R, López O, Sarracent J. 2004. Monoclonal antibodies against a 62 kDa proteinase of *Trichomonas vaginalis* decrease parasite cytoadherence to epithelial cells and confer protection in mice. *Parasite immunol.* 26 (3):119-25.

Hernández-Gutiérrez R, Avila-González L, Ortega-López J, Cruz-Talonia F, Gómez-Gutierrez G, Arroyo R. 2004. *Trichomonas vaginalis*: characterization of a 39-kDa cysteine proteinase found in patient vaginal secretions. *Exp Parasitol.* 107 (3-4) 125-135.

Hirt RP, de Miguel N, Nakjang S, Dessi D, Liu YC, Diaz N, Rappelli P, Acosta-Serrano A, Fiori PL, Mottram JC. 2011. *Trichomonas vaginalis* pathobiology new insights from the genome sequence. *Adv Parasitol.* 7:87-140.

Hrdý I, Müller M. 1995. Primary structure and eubacterial relationships of the pyruvate: ferredoxin oxidoreductase of the amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *J Mol Evol.* 41 (3):388-396.

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 (1) 53-64.

Journet A, Chapel A, Jehan S, Adessi C, Freeze H, Klein G, Garin J. 1999. Characterization of *Dictyostelium discoideum* cathepsin D. J Cell Sci. 112 (21). 3833-3843.

Kang JH, Song HO, Ryu JS, Shin MH, Kim JM, Cho YS, Alderete JF, Ahn MH, Min DY. 2006. *Trichomonas vaginalis* promotes apoptosis of human neutrophils by activating caspase-3 and reducing Mcl-1 expression. Parasite Immunol. 28 (9):439-46.

Kay J, Tyas L, Humphreys MJ, Hill J, Dunn BM, Berry C. 1996. Aspartic proteinases from parasites. Adv Exp Med Biol. (389):247-50.

Kay J. 1985. Aspartic proteinases and their inhibitors. Biochem Soc Trans. 13 (6) 1027-9.

Karmous I, Khadija J, Chaoui A, El Ferjani E. 2012. Proteolytic activities in *Phaseolus vulgaris* cotyledons under copper stress. Physiol Mol Biol Plants. 18 (4) 337-43.

Khalkhali-Ellis Z, Goossens W, Margaryan NV, Hendrix MJ. 2014. Cleavage of Histone 3 by Cathepsin D in the involuting mammary gland. PLoS One. 9 (7). e103230.

Krieger JN, Rein MF. 1982. Zinc sensitivity of *Trichomonas vaginalis*: in vitro studies and clinical implications. J Infect Dis. 146 (3):341-5.

Lehker MW, Arroyo R, Alderete JF. 1991. The Regulation by Iron of the Synthesis of Adhesins and Cytoadherence Levels in the Protozoan *Trichomonas vaginalis*. J Exp Med. 174 (2):311-318.

Lehker MW, Alderete JF. 2000. Biology of trichomonosis. *Curr Opin Infect Dis.* 13 (1) 37-45.

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(6)2165-2170.

Lehker MW, Sweeney D. 1999. Trichomonad invasion of the mucous layer requires adhesins, mucinases, and motility. *Sex Transm Infect.* 75(4) 231-238.

Madico G, Quinn TC, Rompalo A, McKee KT Jr, Gaydos CA. 1998. Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection by PCR using vaginal swab samples. *J Clin Microbiol.* 36 (11) 3205-3210.

Mása M, Maresová L, Vondrásek J, Horn M, Jezek J, Mares M. 2006. Cathepsin D propeptide: mechanism and regulation of its interaction with the catalytic core. *Biochemistry.* 45 (51) 15474-15482.

McKerrow JH, Caffrey C, Kelly B, Loke P, Sajid M. 2006. Proteases in parasitic diseases. *Annu Rev Pathol.* (1)497-536.

McKerrow JH, Sun E, Rosenthal PJ, Bouvier J. 1993. The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. *Annu Rev Microbiol.* (47): 821-53.

Mendoza-López MR, Becerril-García C, Fattel-Facenda L, Avila-Gonzalez L, Ruíz-Tachiquín M, Ortega-López J, Arroyo R. 2000. CP30, a Cysteine Proteinase Involved in *Trichomonas vaginalis* Cytoadherence. *Infect Immun.* 68 (9):4907–4912.

Metcalf P, Fusek M. 1993. Two crystal structures for cathepsin D: the lysosomal targeting signal and active site. *EMBO J.* 12 (4) 1293-1302.

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(Pt 12) 3469-3482.

Minarowska A, Gacko M, Karwowska A, Minarowski Ł. 2008. Human cathepsin D. *Folia Histochem Cytobiol*. 46(1) 23-38.

Miranda-Ozuna JF, 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(10) 2878-2894.

Mohapatra SC, Tiwari HK, Singla M, Rathi B, Sharma A, Mahiya K, Kumar M, Sinha S, Chauhan SS. 2010. Antimalarial evaluation of copper (II) nanohybrid solids: inhibition of plasmepsin II, a hemoglobin-degrading malarial aspartic protease from *Plasmodium falciparum*. *J Biol Inorg Chem*. 15 (3) 373-85.

Morales ME, Rinaldi G, Gobert GN, Kines KJ, Tort JF, Brindley PJ. 2008. RNA interference of *Schistosoma mansoni* cathepsin D, the apical enzyme of the hemoglobin proteolysis cascade. *Mol Biochem Parasitol*. 157 (2) 160-168.

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 (2):245–258.

Müller M. 1988. Energy metabolism of protozoa without mitochondria. *Annu Rev Microbiol.* (42): 465-88.

NaB K, Lee EG, Lee HW, Cho SH, Bae YA, Kong Y, Lee JK, Kim TS. 2004. Aspartic proteases of *Plasmodium vivax* are highly conserved in wild isolates. *Parasitol.* 42 (2):61-6.

Neurath H, Walsh KA. 1976. Role of proteolytic enzymes in biological regulation (a review). *Proc Natl Acad Sci.* 73 (11) 3825-3832

Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G. 1997. A neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Int J Neural Syst.* 8 (5-6) 581-599.

Ovcinnikov NM, Delektorskij VV, Kosmacheva SA. 1974. Ultrastructural characteristics of *Trichomonas vaginalis*. *Vener Dis.* 50 (1):22-39.

Owen DH, Katz DF. 1999. A vaginal fluid simulant. *Contraception.* 59 (2) 91-95.

Park JN, Park SK, Cho MK, Park MK, Kang SA, Kim DH, Yu HS. 2012. Molecular characterization of 45 kDa aspartic protease of *Trichinella spiralis*. *Vet Parasitol.* 190 (34):510-8.

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

Pinho RT, Beltramini LM, Alves CR, De-Simone SG. 2009. *Trypanosoma cruzi*: isolation and characterization of aspartyl proteases. *Exp Parasitol.* vol. 122 (2) 128-133.

Poole DN, McClelland RS. 2013. Global epidemiology of *Trichomonas vaginalis*. *Sex Transm Infect.* 89 (6) 418-422.

Pruitt FL, He Y, Franco OE, Jiang M, Cates JM, Hayward SW. 2013. Cathepsin D acts as an essential mediator to promote malignancy of benign prostatic epithelium. *Prostate.* 73 (5) 476-488.

Ramón-Luing LA, Rendón-Gandarilla FJ, Cárdenas-Guerra RE, Rodríguez-Cabrera NA, Ortega-López J, Avila-González L, Angel-Ortiz C, Herrera-Sánchez CN, Mendoza-García M, Arroyo R. 2010. Immunoproteomics of the active degradome to identify biomarkers for *Trichomonas vaginalis*. *Proteomics.* 10 (3) 435-444.

Rawlings ND, Barrett AJ. 1992. Evolutionary families of peptidases. *Biochem.* (290):205-218.

Rawlings ND, Barrett AJ, Finn R. 2016. Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.* 44(D1) D343-350.

Rendón-Gandarilla FJ, Ramón-Luing 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.

Richo GR, Conner GE. 1994. Structural requirements of procathepsin D activation and maturation. *J Biol Chem.* 269 (20) 14806-14812.

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 (22). 4845-4855.

Santos LO, Garcia-Gomes AS, Catanho M, Sodre CL, Santos AL, Branquinha MH, d'Avila-Levy CM. 2013. Aspartic peptidases of human pathogenic trypanosomatids: perspectives and trends for chemotherapy. Curr Med Chem. 20 (25) 3116-3133.

Schwebke JR, Burgess D. 2004. Trichomoniasis. Clin Microbiol. Rev. 17 (4):794-803.

Shafir SC, Sorvillo FJ, Smith L. 2009. Current Issues and considerations Regarding Trichomoniasis and Human Immunodeficiency Virus in African-Americans. Clin. Microbiol. Rev. 22 (1):37-45.

Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. 2016. <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/boletin/indice-2017.html>

Smith AJ, Chudnovsky L, Simoes-Barbosa A, Delgadillo-Correa MG, Jonsson ZO, Wohlschlegel JA, Johnson PJ. 2011. Novel core promoter elements and a cognate transcription factor in the divergent unicellular eukaryote *Trichomonas vaginalis*. Mol Cell Biol. 31 (7). 1444-1458.

Sojka D, Franta Z, Frantová H, Bartosová P, Horn M, Váchová J, O'Donoghue AJ, Eroy-Reveles AA, Craik CS, Knudsen GM, Caffrey CR, McKerrow JH, Mares M, Kopáček P. 2012. Characterization of gut-associated cathepsin D hemoglobinase from tick *Ixodes ricinus* (IrCD1). J Biol Chem. 287 (25). 21152-21163.

Sommer U, Costello EC, Hayes RG, Beach HD, Gilbert OR, Lucas JJ, Singh NB. 2005. Identification of *Trichomonas vaginalis* Cysteine Proteases That Induce Apoptosis in Human Vaginal Epithelial Cells Biol Chem. 280 (25):23853–23860.

Sun H, Lou X, Shan Q, Zhang J, Zhu X, Zhang J, Wang Y, Xie Y, Xu N, Liu S. 2013. Proteolytic characteristics of cathepsin D related to the recognition and cleavage of its target proteins. PLoS One. 8 (6) e65733.

Suttiyapra S, Mulvenna J, Huong NT, Pearson MS, Brindley PJ, Laha T, Wongkham S, Kaewkes S, Sriya B, Loukas A. 2009. Ov-APR-1, an aspartic protease from the carcinogenic liver fluke, *Opisthorchis viverrini*: functional expression, immunolocalization and subsite specificity. Biochem Cell Biol. 41 (5):1148-56.

Swygard H, Seña AC, Hobbs MM, Cohen MS. 2004. Trichomoniasis: clinical manifestations, diagnosis and management. Sex Transm Infect. 80 (2):91-5.

Szecsí PB, Scand J. 1992. The aspartic proteases. Clin Lab Invest Suppl. 210 5-22.

Tcherepanova I, Bhattacharyya L, Rubin CS, Freedman JH. 2000. Aspartic proteases from the nematode *Caenorhabditis elegans*. Structural organization and developmental and cell-specific expression of asp-1. Biol Chem. 275 (34):26359-69.

Theron LW, Divol B. (2014). Microbial aspartic proteases: current and potential applications in industry. Appl Microbiol Biotechnol. 98 (21):8853-68.

Tovy A, Hertz R, Siman-Tov R, Syan S, Faust D, Guillen N, Ankri S. 2011. Glucose starvation boosts *Entamoeba histolytica* virulence. PLoS Negl Trop Dis. 5 (8) e1247.

Veerapandian B, Cooper JB, Sali A, Blundell TL, Rosati RL, Dominy BW, Damon DB, Hoover DJ. (1992). Direct observation by X-ray analysis of the tetrahedral "intermediate" of aspartic proteinases. Protein Sci. (3):322-8.

Vidoni C, Follo C , Savino M, Melone MA, Isidoro C. 2016. The Role of Cathepsin D in the Pathogenesis of Human Neurodegenerative Disorders. Med Res Rev. 36(5) 845-70.

Watanabe J, Sasaki M, Suzuki Y, Sugano S. 2002. Analysis of transcriptomes of human malaria parasite *Plasmodium falciparum* using full-length enriched library: identification of novel genes and diverse transcription start sites of messenger RNAs. Gene. 9291 (1-2):105-13.

Walter P, Johnson AE. 1994. Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. Annu Rev Cell Biol. 10. 87-119.

Williamson AL, Brindley PJ, Abbenante G, Prociv P, Berry C, Girdwood K, Pritchard DI, Fairlie DP, Hotez PJ, Dalton JP, Loukas A. 2002. Cleavage of hemoglobin by hookworm cathepsin D aspartic proteases and its potential contribution to host specificity. FASEB J. 16(11) 1458-1460.

Williamson AL, Brindley PJ, Loukas A. 2003. Hookworm cathepsin D aspartic proteases: contributing roles in the host-specific degradation of serum proteins and skin macromolecules. Parasitology. 126 (2) 179-185.

Wolf M, Clark-Lewis I, Buri C, Langen H, Lis M, Mazzucchelli L. 2003. Cathepsin D specifically cleaves the chemokines macrophage inflammatory protein-1 alpha,

macrophage inflammatory protein-1 beta, and SLC that are expressed in human breast cancer. *Am J Pathol.* 162 (4) 1183-1190.

Wong JY, Harrop SA, Day SR, Brindley PJ. 1997. Schistosomes express two forms of cathepsin D. *Biochim Biophys Acta.* 1338 (2) 156-160.

World Health Organization. 2008. Global Prevalence and Incidence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections Overview and Estimates.

Wutthisathapornchai A, Vongpipatana T, Muangsawat S, Boonsaen T, MacDonald MJ, Jitrapakdee S. 2014. Multiple E-boxes in the distal promoter of the rat pyruvate carboxylase gene function as a glucose-responsive element. *PLoS One.* 9 (7).e102730.

Yasuda Y, Kageyama T, Akamine A, Shibata M, Kominami E, Uchiyama Y, Yamamoto K. 1999. Characterization of new fluorogenic substrates for the rapid and sensitive assay of cathepsin E and cathepsin D. *J Biochem.* 125 (6) 1137-1143.

Yoshimasu MA, Tanaka T, Ahn JK, Yada RY. 2004. Effect of N-linked glycosylation on the aspartic proteinase porcine pepsin expressed from *Pichia pastoris*. *Glycobiology.* 14 (5) 417-429.

Zaidi N, Maurer A, Nieke S, Kalbacher H. 2008. Cathepsin D: A cellular roadmap. *Biochem Biophys Res Commun.* 376(1). 5-9.

Železnik TZ, Kadin A, Turk V, Dolenc I. 2015. Aspartic cathepsin D degrades the cytosolic cysteine cathepsin inhibitor stefin B in the cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 465 (2) 213-217.